



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Distribución y función de las subunidades GABA(A) ρ
en el neocórtex e hipocampo de ratón (*Mus musculus*)

Tesis para la obtención del grado de
Doctor en Ciencias Biomédicas

Presenta:

Abraham Rosas Arellano

Director de Tesis:

Dr. Ataúlfo Martínez Torres

Juriquilla-Querétaro, 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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





Comité tutorial

Dr. Ataúlfo Martínez Torres (tutor)

Dr. Rogelio Arellano Ostoia

Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar

La presente tesis fue realizada gracias al apoyo de:

Beca Nacional de Doctorado

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

No. de Becario 189290

PAPIIT-UNAM

202609-21

205308-21

CONACYT

101851

Resultado del trabajo de varios años de aislamiento en un micrómetro del universo, analizando regiones neoestriatales e hipocampales...

Enero 2012

DEDICATORIAS

A:

La memoria de mis estimados padres **Nelly Arellano Martínez y Abraham Rosas Castillo**.

Mis queridos hermanos, **Miguel Ángel, Ilse Nelly, Julio César, Fernando y Eduardo Salvador Rosas Arellano**.

Especialmente a mi sobrina, **Abril Josefina Rosas Madrigal**, que tu luz no cese y sigas alumbrando caminos.

Martha Arellano Moreno, familia Castillo Ramírez y Arellano Arriaga.

Dr. Ataúlfo Martínez Torres y Dr. Ricardo Miledi, sinceramente una especial dedicatoria para ustedes, no tengo palabras con las cuales agradecer adecuadamente todo el apoyo y la motivación que recibí para lograr terminar esta meta.

AGRADECIMIENTOS

A las siguientes instituciones, por brindarme esta invaluable oportunidad de desarrollo.

Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Neurobiología y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Al comité tutor, por sus atinados consejos académicos que sin duda fueron los cimientos de la presente tesis.

Dr. Ataúlfo Martínez Torres (Tutor), Dr. Rogelio Arellano Ostoa y Dr. Rafael Gutiérrez Aguilar.

Jurado de examen, por la valiosa aportación para la conclusión de la presente tesis.

Dr. Alfonso Cárabez Trejo, Dr. Ataúlfo Martínez Torres, Dra. María Elvira Galarraga Palacio, Dr. Julio Eduardo R. Morán Andrade, Dra. Ana B. Clorinda Arias Álvarez.

Personal académico, gracias a los diferentes apoyos y consejos este trabajo pudo realizarse.

Dr. Ricardo Miledi, Dr. Alfonso Cárabez Trejo, Dr. Daniel Reyes Haro, Dr. Lenin David Ochoa de la Paz, Dr. Mauricio Díaz Muñoz, Dra. Sofía Díaz Miranda, Dra. Edith Garay Rojas, Dr. Hugo Merchant Nancy, Dr. Víctor Ramírez Amaya y Dr. Alfredo Varela Echevarría.

Compañeros de laboratorio, extraño esos días de trabajo arduo, los desvelos, los logros que obteníamos, seguro que más extraño aquellos buenos momentos que hicieron del postgrado una etapa que no olvidaré.

Adriana Petri-z Reyes, Alejandra González González, Argel R. Estrada Mondragón, Arturo I. Machuca Parra, Elizabeth Cabrera Ruiz, Ernesto Mora Loyola, Fernando Rosas Sánchez, Gustavo Martínez Delgado, Jorge Parodi Rivera, Miriam Edith Amaro Lara, Néstor N. Jiménez Vargas, Patricia Juárez Mercado.

Personal técnico, cada uno de ustedes fue una pieza fundamental para este logro.

Edith Espino Saldaña, Efrén Ruiz Alcibar, Irma Alicia Martínez Dávila, Azucena Aguilar Vázquez, Lourdes Palma Tirado, Elsa Nidia Hernández Ríos, Guadalupe Martínez Lorenzana.

Unidades de apoyo, como reconocimiento a la invaluable labor que realizan.

Bioterio

José Martín García Servín

Enseñanza

Leonor Casanova Rico y María del Carmen Vázquez Rodríguez

Biblioteca

Pilar Galarza Barrios, Francisco Javier Valles Valenzuela, Rafael Silva Cruz, Román Pacheco Barrita.

Video Conferencia

María de Lourdes Lara Ayala (INB) y Ana María Escalante Gonzalbo (IFC)

Ivonne Araceli García Almaguer, un especial agradecimiento para ti por la compañía, importante ayuda y ser una luz en el camino cuando la oscuridad no cesaba.

Amigos, que sería la vida sin ustedes...

Azucena Aguilar Vázquez, María del Carmen Maldonado Fernández, Anita Halina Markowicz, Antonio Arriaga Rojas, Celina García Meléndez, Georgina del Rocío Guerrero Obregón, Cinthya Córdoba Manilla, María Eugenia Garín Aguilar, Gustavo Valencia del Toro, Betsabé Erendira Barbosa Morales, Paola Meini Reza, Perla C. Reyes Fernández, Adriana Sánchez Gutiérrez, Víctor Hugo Jiménez Arcos, Eric Centenero Alcalá, Irma Alicia Martínez Dávila, Pilar Galarza Barrios, María Clara Soriano Arista, Sandra Castellanos Ortiz, Mindy Yesenia Mendoza Maqueda, Marina Bernabé Arredondo, María Magdalena Esquivel Salgado, Blanca Lilia Rosas García, Alfonso Beltrán Hernández, Rey César Cervantes Navarrete, Fabiola Carmona Aburto, Evelyn Palafox Hernández, Leticia Robles Martínez, Ismael Gimete Baños...



PDCB/grad/041Jur/2011

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
DIRECTOR GENERAL DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR, UNAM
Presente.

Nos permitimos informarle que con base al Artículo 31 del RGEPE el Comité Académico de **DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**, en su reunión 278 del 06 de abril de 2011, designó el siguiente jurado para examen grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** de **ABRAHAM ROSAS ARELLANO**, con número de cuenta **90413500**, con la tesis titulada "**DISTRIBUCIÓN Y FUNCIÓN DE LAS SUBUNIDADES GABA (A) ρ EN EL NEOESTRIADO E HIPOCAMPO DE RATÓN (*MUS MUSCULUS*)**" dirigida por el Dr. Ataúlfo Martínez Torres.

Dr. Alfonso Cárabez Trejo	Presidente
Dr. Ataúlfo Martínez Torres	Secretario
Dra. María Elvira Galarraga Palacio	Vocal
Dr. Julio Eduardo R. Morán Andrade	Vocal
Dra. Ana B. Clorinda Arias Álvarez	Vocal

Atentamente

"Por mi raza hablará el espíritu"

Cd. Universitaria, a 24 de junio de 2011

DRA. MARICELA LUNA MUÑOZ
RESPONSABLE
DEL INST. DE NEUROBIOLOGÍA

DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA

C.c.p Lic. Balfred Santaella Hinojosa, Coordinador de la Unidad de Administración Escolar del Posgrado, UNAM
Tutor (a) Dr. Ataúlfo Martínez Torres
Coordinación de PDCB

RCC/MLM/cvr

INDICE

Resumen	1
Abstract	3
Abreviaciones	5
Introducción	8
Receptor GABA-B	9
Receptor GABA-A	10
Receptor GABA-C (Subunidades GABA ρ)	12
Distribución de las subunidades GABA ρ	15
Expresión de las subunidades GABA ρ fuera de la retina	17
Caudado putamen – neocóstriado	29
Región hipocampal	37
Planteamiento del Problema	42
Preguntas a contestar	43
Hipótesis	43
Objetivos	44
Estrategias y métodos	45
Hibridación <i>in situ</i> (síntesis de sondas de ARN)	45
Hibridación <i>in situ</i>	45
Western blot	46
Inmunofluorescencia y doble inmunofluorescencia	47
Inmuno-oro	49

Resultados	51
Expression of GABA ρ receptors in the neostriatum: localization in aspiny, medium spiny neurons and GFAP positive cells	54
The GABA(A) ρ receptors in hippocampal spontaneous activity and their distribution in hippocampus, amygdala and visual cortex	100
Compendio de resultados	107
Discusión	112
Conclusiones	119
Otros resultados	119
Perspectivas	120
Otros artículos publicados	122
Dynamics of GABA ρ 2 receptors in retinal bipolar neurons and cerebellar astrocytes	123
Expression of GABA ρ subunits during rat cerebellum development	129
Apéndice	135
Referencias	145

Resumen

Estudios electrofisiológicos en diversas estructuras del Sistema Nervioso demostraron que el ácido γ -aminobutírico (GABA) juega un papel fundamental como neurotransmisor. El GABA funciona mediante la activación de receptores de membrana plasmática con diversas propiedades electrofisiológicas, farmacológicas, estructurales y génicas. Los receptores han sido divididos en dos tipos de receptores GABA-A y GABA-B. El receptor GABA-B es un receptor acoplado a proteínas G, mientras que los receptores GABA-A forman proteínas canal en las membranas celulares. El receptor GABA-A forma pentámeros que están compuestos por combinaciones de 19 subunidades. Entre estas se encuentran las subunidades GABA ρ (ρ 1-3). Los receptores formados por las subunidades GABA ρ muestran una alta sensibilidad por el GABA, presentan mayores tiempos de apertura del canal y una baja conductancia al ion Cl⁻ respecto al resto de las subunidades GABA-A; además, son activados selectivamente por el CACA y presentan como antagonista principal al TPMPA. Las subunidades GABA ρ fueron descritas inicialmente en la retina de diversas especies; sin embargo, también se les ha localizado en diferentes estructuras cerebrales como la amígdala, bulbo olfativo, cerebelo, colículo superior, corteza visual, cuerpo calloso, hipocampo, médula espinal, núcleo supraquiasmático, sistema óptico, tálamo y tallo cerebral.

Además, estudios previos realizados en nuestro laboratorio han sugerido que las subunidades GABA ρ son expresadas en el núcleo caudado bovino y que los ARNm de GABA ρ 1 y ρ 2 son expresados en el neocórtex de ratón; también se mostró que en neuronas en cultivo aisladas de la formación hipocampal se encuentra un componente GABAérgico insensible a la bicuculina y sensible al TPMPA. Un componente similar se encontró en registros electrofisiológicos de neuronas hipocampales registradas en cortes de cerebro.

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la expresión y localización de las subunidades GABA ρ 1 y ρ 2 en el neocórtex e hipocampo de ratón. Ensayos cuantitativos mediante qRT-PCR indican que los ARNm de estos receptores son

expresados en menor proporción en el neocóstriado respecto a la retina y que GABA ρ 2 en el neocóstriado es más abundante que GABA ρ 1. También, mostramos que las subunidades GABA ρ 1 y ρ 2 se expresan en interneuronas que contienen calretinina y calbindina, además de que GABA ρ 2 se localiza en una subpoblación de neuronas medianas espinosas que expresan receptores D2 de dopamina. Además, análisis electrofisiológicos en cortes de cerebro mostraron evidencia de la presencia de receptores activados por el CACA y que fueron sensibles al TPMPA, características farmacológicas que indican la presencia funcional de los receptores GABA ρ . Mediante microscopía electrónica de transmisión acoplado al uso de inmuno-oro, localizamos a los receptores principalmente en regiones peri y extrasinápticas. Finalmente, sugerimos que GABA ρ 1 y ρ 2 pueden participar en la gliotransmisión debido a que células positivas a la proteína gliofibrilar ácida (GFAP), expresan GABA ρ .

Respecto a la formación hipocámpal sugerimos que el componente GABAérgico insensible a la bicuculina e involucrado en la actividad sináptica espontánea corresponde a la presencia de las subunidades GABA ρ 1 y ρ 2. Además localizamos por hibridación *in situ* e inmunofluorescencia la expresión del receptor en neuronas de diversas estructuras hipocámpales como el subiculum, hipocampo propio y el giro dentado. Mediante microscopía electrónica de transmisión acoplada al uso de inmuno-oro mostramos que en esta estructura los receptores se ubican de manera preferencial en regiones extrasinápticas. Adicionalmente encontramos la expresión de los receptores en las áreas anteriores y posteriores de los núcleos basomedial y posteromedial cortical de la amígdala y en el área medio-medial y medio-lateral de la corteza visual secundaria de ratón.

Con estos resultados se describe una nueva población de neuronas que expresan receptores GABA ρ que pueden conferir una actividad inhibitoria tónica y que puede contribuir a una diversidad funcional no descrita hasta el momento.

Abstract

Electrophysiological studies in several structures of the Central Nervous System have shown that the γ -aminobutyric acid (GABA) plays a fundamental role as neurotransmitter.

GABA acts through receptors located in the plasma membrane that display differential electrophysiological, pharmacological, structural and genetic properties. The receptors have been divided in two types: GABA-A and GABA-B. The GABA-B receptor is a G-protein-coupled receptor; whereas GABA-A receptors form ligand-gated ion channels. GABA-A receptors are heteropentamers made up by 19 known subunits including GABA ρ subunits (ρ 1-3). GABA ρ subunits have higher affinity to GABA, longer medium channel-opening time and lower chloride conductance than other GABA-A subunits. These receptors are activated by CACA and antagonized by TPMPA. GABA ρ subunits were originally described in the retina of several species; nevertheless, they also have been found in several brain structures such as amygdala, olfactory bulb, cerebellum, superior colliculus, visual cortex, corpus callosum, hippocampus, spinal cord, supraquiasmatic nucleus, visual pathway, thalamus, and brainstem.

Previously, in our laboratory we described that the GABA ρ subunits are expressed in bovine caudate nucleus and that their mRNA are expressed in mouse neostriatum. *In situ* hybridization disclosed that the receptor mRNAs are distributed to the dorso-caudal region of the neostriatum, whereas some label was found in rostral and ventral regions, and scarcely in other regions. The immunohistochemical analysis showed that GABA ρ 1 and ρ 2 are expressed in all the calretinin positive neurons examined and in population of calbindin positive interneurons. Additionally, GABA ρ 2 was observed in a few medium spiny neurons that express dopamine D2 receptors. Using immunogold labeling coupled with transmission electron microscopy; we located the receptors in peri- and extrasynaptic sites. Finally, we have found that GABA ρ 1 and ρ 2 express in fibrillary acidic protein (GFAP) positive cells, suggesting their presence in glial cells.

In addition, we showed the presence of a bicuculline-resistant TPMPA-sensitive GABAergic component in hippocampal neurons in culture. A similar component was described in electrophysiological recordings of hippocampal pyramidal neurons in brain slices. By means of *in situ* hybridization and immunofluorescence we located the GABA ρ subunits in several hippocampal structures such as subiculum, hippocampus proper and dentate gyrus. Immunogold labeling coupled with transmission electron microscopy indicated that the GABA ρ receptors are located preferentially in extrasynaptic regions. Finally, our results indicate that GABA ρ are expressed in anterior and posterior areas of the basomedial and posteromedial cortical nuclei of the amygdala, as well as in the medio-medial and medio-lateral areas of the secondary visual cortex.

These results describe a new population of neurons expressing GABA ρ receptors that may confer inhibitory tonic activity and contribute to the functional diversity of the GABAergic system.

Abreviaciones

3-APMPA: ácido 3-aminopropil-metilfosfínico

3-APPA: ácido 3-aminopropil fosfínico

Act: β -actina

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

BAC: cromosoma artificial bacteriano

bic: bicuculina

BSA: albúmina sérica bovina

CA: *Cornu Ammonis*

CACA: ácido 4-cis-aminocrotónico

CAMP: (\pm)-cis-2-ácido aminometilciclopropanocarboxílico

CI: Cápsula interna

CNQX: 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2-3, diona

CPu: neocóstriado

CuN: núcleo cuneiforme

DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindol

DMEM: medio Eagle modificado por Dulbecco

GABA: ácido γ -aminobutírico

GADPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GAD: descarboxilasa del ácido glutámico

GFAP: proteína gliofibrilar ácida

GFP: proteína verde fluorescente

GPe: globo pálido segmento externo

GPI: globo pálido segmento interno

HEPES: ácido 2-[4-(2-Hidroxietil)-1-Pireracilil-Etanosulfónico

I4AA: ácido acético-4-imidazol

IHQ: inmunohistoquímica

LGIC: ligand gated ion channel

MABT: ácido maléico

NTMT: NaCl, tris, MgCl₂, Tween20

ON: núcleo olivar

P4S: ácido piperidin-4-sulfónico

PBS: amortiguador de fosfatos

PBS-T20: amortiguador de fosfatos con Tween20

PFA: paraformaldehído

qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa cuantitativa

R-GABA-A: Receptor GABA-A

R-GABA-B: Receptor GABA-B

RN: núcleo reticular

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa

s-GABA ρ : subunidades GABA ρ

SNC: sistema nervioso central

SNc: sustancia *nigra pars compacta*

SNr: *sustancia nigra pars reticulata*

SSC: sodio más citrato de sodio

TACA: ácido 4-trans-aminocrotónico

TAMP: ácido carboxílico 2-trans-aminometil ciclopropano

TBS: amortiguador tris salino

THIP: hidrocloreuro 4,5,6,7-tetrahidroisoxazol [5,4-c] oiridin-3-ol

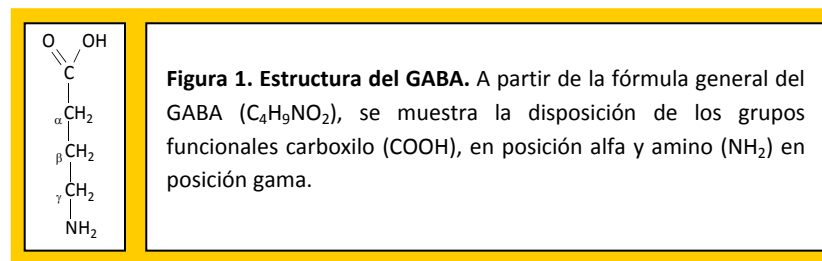
TPMPA: ácido 1,2,5,6 tetrahidropiridin -4- metilfosfínico

TTX: tetradoxina

ZAPA: Z-3-[(aminoiminometil)tio] propil-2-ácido enoico)

Introducción

El ácido γ -aminobutírico (GABA), es un aminoácido que no conforma proteínas. Su estructura está constituida por tres carbonos, un grupo carboxilo y un grupo amino (Fig. 1). Se ha descrito su existencia en bacterias, plantas, invertebrados y vertebrados. El GABA es sintetizado a partir del α -cetoglutarato, derivado del ciclo de Krebs, por medio de una reacción de transaminación por la enzima α -oxoglutarato transaminasa; el α -cetoglutarato es convertido a glutamato y a partir de este aminoácido es producido el GABA, mediante la acción de la enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD); la cual se encuentra exclusivamente en neuronas GABAérgicas en el sistema nervioso. La GAD tiene dos variantes, la GAD65 y la GAD67. (D'Hulst *et al.*, 2009; Olsen y Seighart, 2008; Zigmond *et al.*, 1999).



El GABA fue descrito por primera vez por Roberts y Frankel en 1950 como un constituyente de la población de aminoácidos libres en el cerebro. En los siguientes años se demostró que el GABA tenía actividad inhibitoria en el SNC. Por ejemplo, Krnjevic y Phillis en 1963, mediante análisis electrofisiológico indicaron que la actividad excitadora en células corticales inducida por glutamato, era inhibida por la aplicación del GABA.

En 1974 Bowery y Brown, reportaron que la actividad contráctil generada por la aplicación de noradrenalina en el ganglio superior cervical de rata y ratón, era eliminada con la aplicación del GABA. De manera especial indicaron que esta respuesta inhibitoria fue antagonizada por la exposición a la bicuculina, recuperándose así la respuesta contráctil. Evidencias experimentales posteriores demostraron la existencia de un sitio insensible a la bicuculina pero sensible al GABA y su análogo estructural el baclofeno (Bowery *et al.*, 1979).

Hill y Bowery en 1981, propusieron designar con el nombre de receptor GABA-A (R-GABA-A) a aquellos sitios sensibles al GABA y a la bicuculina y como receptor GABA-B (R-GABA-B), a aquellos que respondían al GABA y al baclofeno. Actualmente se sabe que ambos receptores presentan claras diferencias funcionales, moleculares y farmacológicas (ver recuadro 1).

Receptor GABA-B

El R-GABA-B está conformado por siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G; este tipo de receptor se le puede ubicar tanto a nivel pre como postsináptico. En la primera condición funcionan como un autorreceptor que produce una activación de canales de K⁺ y una inhibición dependiente de voltaje de los canales de Ca²⁺ tipo N (Ca_v2.2) o tipo P/Q (Ca_v2.1). La activación de estos canales promueve la liberación de neurotransmisores desde la presinapsis. Postsinápticamente la activación del receptor produce una hiperpolarización a través de una corriente inhibitoria dada por la activación de los canales de potasio rectificadores entrantes (GIRK o Kir3) (Bettler *et al.*, 2004).

La clonación del R-GABA-B, reveló que tiene una secuencia altamente homóloga con los receptores de glutamato metabotrópicos, sin embargo muestra menor similitud con otros receptores acoplados a proteínas G (Kerr y Ong, 1995; Kaupmann *et al.*, 1997).

Existen dos isoformas de este receptor denominadas R1 y R2, las cuales forman heterodímeros en la membrana plasmática y son codificadas por dos genes (GABABR1 y GABABR2). Se ha demostrado que la expresión de GABABR1 no forma receptores funcionales; sin embargo cuando se co-expresa con la isoforma GABABR2, se generan receptores con las características farmacológicas y funcionales propias de este receptor (Jones *et al.*, 1998). Esto es debido a que la isoforma R2 permite que la isoforma R1

Recuadro 1. Receptores al GABA

R-GABA-A (Ionoatrópico).

- Sensibilidad al GABA $\cong 10\mu\text{M}$ (EC₅₀), $\rho \cong 1-5\mu\text{M}$ (EC₅₀).
- A su activación permiten el paso del ión cloruro.
- Subunidades: α , β , γ , δ , ϵ , π , ρ y θ .
- Agonistas: Muscimol, TACA, isoguvacina, I4AA, THIP, Zolpidem, TAMP, CACA (ρ y α -6), P4S, ácido isopecotico y 3APS.
- Antagonistas: Bicuculina, estricnina, TPMPA (ρ) y SR95531.

R-GABA-B (Metabotrópico).

- Su activación modula canales de K⁺ y Ca²⁺.
- Subunidades: R1 y R2
- Agonistas: Baclofeno, 3-APPA, 3-APMPA
- Antagonistas: Faclofeno

alcance la membrana plasmática y contiene el sitio de unión con la proteína G, mientras que la isoforma R1 contiene el sitio de unión del agonista (Bettler *et al.*, 2004). La formación de dímeros se ha comprobado mediante estudios de inmuno-oro y microscopía electrónica (Charara *et al.*, 2005).

Farmacológicamente el R-GABA-B presenta al baclofeno como agonista selectivo y es antagonizado por el flaclofeno, saclofeno, CGP64213 y SGS742 (Gage, 1992; Froestl *et al.*, 2004; Helm *et al.*, 2005).

Receptor GABA-A

El receptor activado por el GABA que se encuentra distribuido más ampliamente es el R-GABA-A; pertenece a la superfamilia de receptores pentaméricos *cys loop* LGIC (*ligand gated ion channel*) junto con los receptores ionotrópicos de acetilcolina, glicina y serotonina (5HT₃) (Barnard, 1992). La unión de GABA a este receptor permite el paso selectivo del ión cloruro a través de la membrana plasmática (Miledi *et al.*, 1982; Bormann *et al.*, 1987).

El R-GABA-A está compuesto por 19 subunidades (α [1-6], β [1-3], γ [1-3], δ , ϵ , π , ρ [1-3] y θ), las cuales son codificadas por el mismo número de genes. Dichas subunidades se combinan de diversas formas para conformar una proteína pentamérica funcional en las membranas plasmáticas de las células.

Mediante diversos análisis como inmunoprecipitación y estudios de localización por microscopía confocal, se ha determinado que las subunidades GABA-A más abundantes son α 1, β 2/3 y γ 2, las cuales representan alrededor del 60 al 90% en el cerebro adulto y de las cuales se presume que recombinen de la siguiente manera dos α 1, una β 2 y dos γ 2 (Benke *et al.*, 1991b; 1994; Duggan *et al.*, 1992; Ruano *et al.*, 1994; Fritschy y Moller, 1995); mientras que las subunidades α 2, α 3, α 5, β 3 y δ son moderadamente abundantes con el 15 al 30%; de ellas se ha reportado que receptores pentaméricos conformados por subunidades α 2/ β 3/ γ 2 son la segunda combinación más predominante en el cerebro adulto (Duggan y Stephenson, 1990; Benke *et al.*, 1991a,

1994; McKernan *et al.*, 1991; Endo y Olsen, 1993; Marksitzer *et al.*, 1993; Mertens *et al.*, 1993; Fritschy y Moller, 1995). Finalmente, un porcentaje menor al 10% corresponde a las subunidades $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\gamma 1$ y $\gamma 3$ (Fritschy *et al.*, 1993; Quirk *et al.*, 1994; Togel *et al.*, 1994).

A nivel estructural cada subunidad contiene un segmento amino terminal, en donde se encuentra el sitio de reconocimiento al neurotransmisor, un corto extremo carboxilo extracelular ambos hidrofílicos, dos asas citoplasmáticas y cuatro regiones transmembranales. Con base en la secuencia aminoacídica se predice que cada subunidad tiene un peso molecular de entre 48 a 64kDa. Las subunidades del R-GABA-A se ensamblan alrededor de un poro central que forma el canal iónico, se considera que el pentámero tiene un peso aproximado de 275kDa (Barnard, 1992).

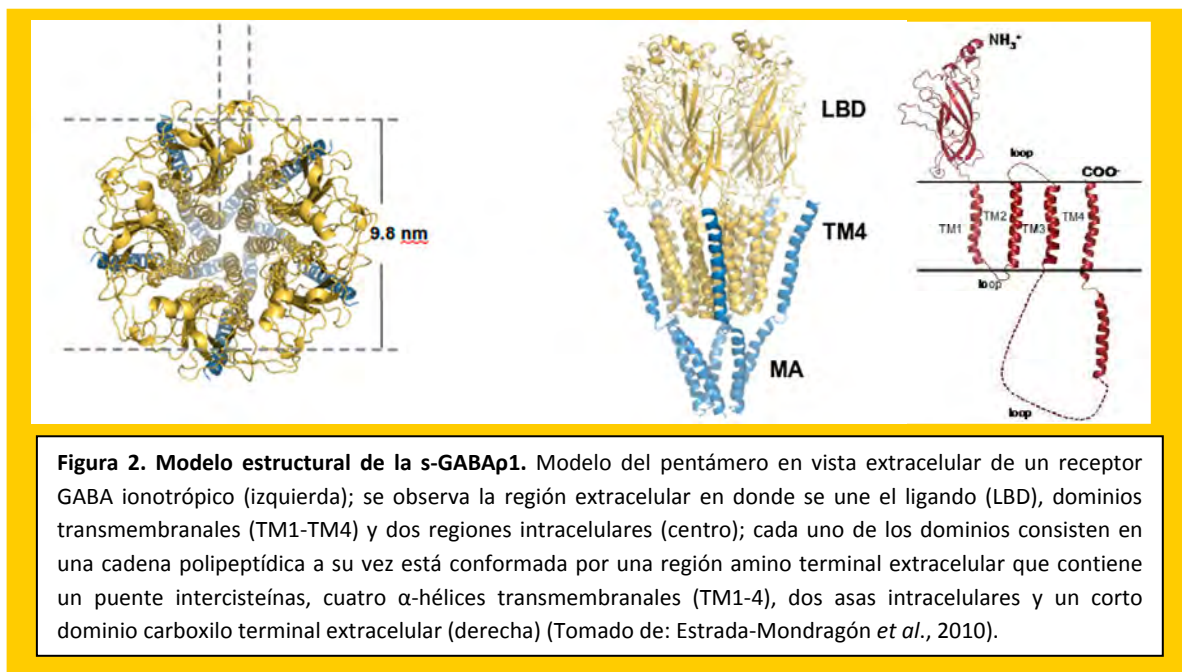
Las subunidades del R-GABA-A tienen sitios de unión para benzodiazepinas, barbitúricos, neuroesteroides y alcohol etílico (Bormann, 1988; Doble, 1992; Macdonald y Olsen, 1994). La activación de los R-GABA-A puede ser dada por muscimol, ácido 4-trans-aminocrotónico (TACA) (Johnston, 1997), isoguvacina, ácido 4-imidazol-acético (IAAA), hidrocloruro 4,5,6,7-tetrahidroisoxazol [5,4-c] oiridin-3-ol (THIP), Zolpidem, ácido 2-trans-aminometil ciclopropano carboxílico (TAMP) además del GABA; y es antagonizada por bicuculina y por SR95531 (GABAzina) (Storustovu y Ebert, 2005; Pan *et al.*, 2005; Madsen *et al.*, 2007).

Existe evidencia temprana donde se reconoce un tercer sitio altamente sensible al GABA con características que lo distinguen de los R-GABA-A y R-GABA-B. Este sitio fue reportado por Johnston y cols., en 1975 en interneuronas de la médula espinal del gato. Este receptor presenta características ionotrópicas y se distingue por su insensibilidad a la bicuculina y al baclofeno, pero sensible al ácido 4-cis-aminocrotónico (CACA), análogo del GABA. En 1984 Drew y colaboradores, mostraron que en el cerebelo de rata también se encuentra un receptor sensible al GABA e insensible a la bicuculina y al baclofeno; sugiriendo en ese momento el nombre de receptor GABA-C (R-GABA-C).

Receptor GABA-C (subunidades GABA ρ)

El R-GABA-C está conformado por tres subunidades denominadas $\rho 1$, $\rho 2$ y $\rho 3$ las cuales son codificadas por los genes *GABRR1*, *GABRR2* y *GABRR3*, respectivamente (Cutting *et al.*, 1991, 1992; Ogurusu y Shingai, 1996). Estas subunidades forman homopentámeros en la retina y heteropentámeros fuera de esta estructura. Sin embargo también se ha demostrado su heterodimerización con otras subunidades del R-GABA-A e incluso con la subunidad $\alpha 1$ del receptor de glicina (Pan *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2004; Milligan *et al.*, 2004; Frazao *et al.*, 2007). Debido a estas características Olsen y Sieghart en 2008 han sugerido designar como subunidades GABA ρ (s-GABA ρ) y pertenecientes al R-GABA-A en lugar de la designación de R-GABA-C.

Se piensa que a nivel estructural las s-GABA ρ son similares al resto de las del R-GABA-A; presumiblemente conforman una proteína pentamérica con un poro central, cada una de las cinco subunidades presentan un segmento amino terminal, un extremo carboxilo extracelular, dos asas citoplasmáticas y cuatro regiones transmembranales (Estrada-Mondragón *et al.*, 2010). Recientemente se ha propuesto un modelo estructural para las s-GABA ρ (Fig. 2).



En el ratón (*Mus musculus*) se ha reportado que la s-GABA ρ 1 está conformada por 474 aminoácidos que le confieren un peso aproximado de 50kDa; por otra parte la s-GABA ρ 2 se conforma por 490 aminoácidos con un peso aproximado de 56kDa, mientras que la s-GABA ρ 3 está conformada por 464 aminoácidos que le confieren un peso de 53kDa (Greka *et al.*, 1998; Ekema *et al.*, 2002).

A nivel funcional las s-GABA ρ muestran propiedades electrofisiológicas especiales; por ejemplo tiene una alta sensibilidad por el GABA y el canal se caracteriza por mayores tiempos de apertura y baja conductancia a Cl⁻ cuando se le compara con el resto de las subunidades del R-GABA-A (Feigenspan *et al.*, 1993; Feigenspan y Bormann, 1994).

Los más potentes agonistas (además del GABA), son el muscimol y el TACA. Como se mencionó TACA también es agonista de los R-GABA-A, sin embargo se observa una gran diferencia en este efecto con el enantiómero de TACA, el ácido 4-cis-aminocrotónico (CACA), que activa únicamente a las s-GABA ρ (Johnston *et al.*, 1975), aunque existe evidencia de que la subunidad α 6 del R-GABA-A puede ser activada con este fármaco (Wall, 2001). Los enantiómeros *cis* y *trans* del ácido carboxílico 2-aminometil-ciclopropano (CAMP y TAMP) son también análogos al GABA. Las s-GABA ρ son activadas por CAMP de manera específica, mientras TAMP es agonista tanto de R-GABA-A como de las s-GABA ρ (Bormann y Feigenspan, 1995). Estudios recientes han demostrado que la expresión de la s-GABA- ρ 1 en ovocitos de *X. laevis* producen corrientes con altas concentraciones de taurina (Ochoa-de la Paz *et al.*, 2008).

Por otra parte existen antagonistas de las s-GABA ρ como la isoguvacina, ácido 3-aminopropil-hidroxi-oxofosfanio (3-APPA), ácido 3-aminopropil-metilfosfínico (3-APMPA), ácido piperidin-4-sulfónico (P4S) y el ZAPA: Z-3-[(aminoiminometil)tio] propil-2-ácido enoico). Se distinguen los 4,5,6,7-tetrahidroisoxazolo[5,4-c]piridin-3-ol (THIP) y el ácido acético 4-imidazol (I4AA) como fuertes antagonistas; sin embargo el ácido 1,2,5,6-tetrahidropiridin-4-metilfosfínico (TPMPA) es el antagonista específico (Ragozzino *et al.*, 1996; Hanrajan *et al.*, 2001).

Es importante mencionar que las s-GABA ρ no responden a todos los moduladores del R-GABA-A como las benzodiazepinas, barbitúricos y neuroesteroides (Polenzani *et al.*, 1991); en este sentido, se ha reportado que la pregnanolona, el alfaxolone y alopregnanolona tienen actividad sobre las s-GABA ρ (Morris *et al.*, 1999; Calvo y Goutman *et al.*, 2004), y también se ha reportado que algunos esteroides presentan actividad sobre la s-GABA ρ 1 (Li *et al.*, 2010). El cinc inhibe sus respuestas a GABA (Calvo *et al.*, 1994). El canal es bloqueado por la picrotoxina y el 5-biciclofosforotionato-t-butílico (Bormann y Feigenspan, 1995; Woodward *et al.*, 1992; 1993).

Una extensa caracterización funcional de las corrientes generadas por las s-GABA ρ fue reportada por Polenzani y colaboradores en 1991. En dicho estudio se aisló ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de corteza y retina de bovino, que a su vez microinyectaron en ovocitos de *Xenopus laevis*; las respuestas obtenidas al estimular con el GABA ovocitos microinyectados con ARNm proveniente de la corteza cerebral mostraron claras características funcionales y farmacológicas del R-GABA-A: sensibilidad a la bicuculina, bloqueo por picrotoxina y modulación por barbitúricos y benzodiazepinas y rápida desensibilización (Fig. 3A). En contraste, las respuestas obtenidas al estimular con el GABA los ovocitos microinyectados con ARNm obtenido de la retina presentaron dos componentes: 1) un componente menor que desensibiliza y es bloqueado por la bicuculina y es potenciado por el pentobarbital o benzodiazepinas (Fig. 3B y 3D) y 2) un componente mayor que corresponde a las s-GABA ρ y que generó respuestas aún a bajas concentraciones de GABA, con baja tasa de desensibilización, resistencia a la bicuculina, y no fue potenciado por las benzodiazepinas o el pentobarbital y tampoco fue activado por el baclofeno (Fig. 3C). El recuadro 2 resume las características de las s-GABA ρ mencionadas hasta el momento.

Recuadro 2. Características de las s-GABA ρ

Selectividad iónica: cloruro

Subunidades: ρ 1, ρ 2 y ρ 3

Sensibilidad al GABA: 1-5 μ M (EC50)

Agonistas: CACA, CAMP, TAMP, TACA, glicina, muscimol y taurina

Antagonistas: TPMPA, I4AA, 3-APPA y 3-APMPA, Isoguvacina, P4S, THIP, ZAPA y Zinc

Tiempo medio de apertura del canal: 150 a 200 ms

Desensibilización: Baja

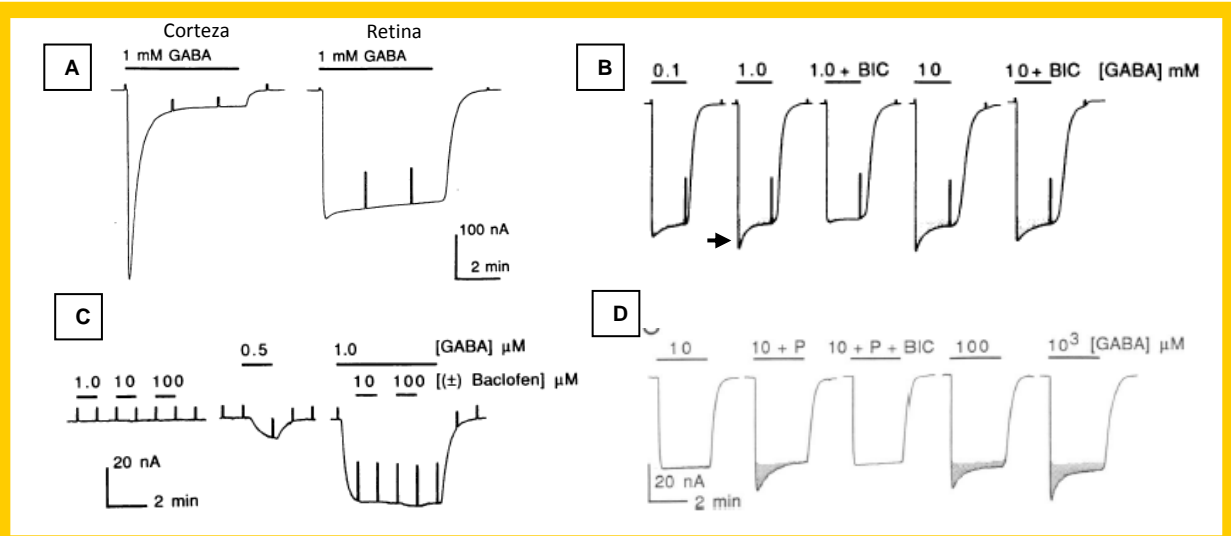


Figura 3. Corrientes generadas por el GABA en ovocitos de *X. laevis*. **A)** izquierda: respuestas de ovocito microinyectado con ARNm de la corteza cerebral bovina, se observa el componente formado mayoritariamente por el R-GABA-A, derecha: respuestas de ovocito microinyectado con ARNm de retina bovina donde se observan corrientes formadas principalmente por las s-GABA ρ . **B)** a concentraciones mayores 100 μ M de GABA se observó un componente menor (flecha negra) el cual es inhibido con la colocación de bicuculina (bic), cuando se usó GABA a 10 μ M el componente menor fue bloqueado parcialmente. **C)** corrientes resistentes a la bicuculina e insensibles a baclofeno no muestran desensibilización a la colocación de 1 μ M de GABA. **D)** se observa que el componente menor (área sombreada) es sensible tanto al pentobarbital (P) como a la bicuculina (Tomado de Polenzani *et al.*, 1991).

Distribución de las s-GABA ρ

La distribución de las s-GABA ρ es más restringida respecto al resto de las subunidades del R-GABA-A; sin embargo, en la retina de vertebrados se encuentran expresadas las tres subunidades (ρ 1- ρ 3). A este respecto, diversos estudios realizados en la década de los 90's evidenciaron que las interneuronas de la retina, las células bipolares, expresan las s-GABA ρ 1 y ρ 2. En este sentido Feigenspan y colaboradores en 1993, reportaron en dichas células mediante análisis farmacológico las clásicas características farmacológicas de las s-GABA ρ , como insensibilidad a moduladores clásicos del R-GABA-A (flunitracepam, pentobarbital y alfaxalona), ligero bloqueo por la picrotoxina, insensibilidad al antagonista específico del R-GABA-A (bicuculina) y al agonista específico del R-GABA-B (baclofeno), pero con sensibilidad al análogo del GABA el CACA.

En 1993 Qian y Dowling demostraron electrofisiológicamente que las células horizontales de retina de la perca blanca (*Morone americana*), también presentan las

características de las s-GABA ρ referidas en el párrafo anterior. Por otro lado, Feigenspan y Bormann en 1994 mostraron nuevas características del receptor al estudiar células bipolares aisladas de la retina de rata, tales características fueron: una EC₅₀ de 4.2 μ M de GABA, un coeficiente de Hill de 2 moléculas aproximadamente, conductancia de 7.9pS y un diámetro de poro de 5.1Å.

Estudios realizados por Dong y cols. (2004), y Takahashi y cols. (2004), evidenciaron en el bagre (*Ictalurus punctatus*) que las células horizontales que reciben señales de los conos, expresan dos receptores sensibles al GABA farmacológicamente distintos y que corresponden al clásico R-GABA-A y a un componente generado por las s-GABA ρ . En 1995 Qian y Dowling indicaron que las s-GABA ρ se expresan preferencialmente en las dendritas de las células bipolares de la lobina blanca (*Morone chrysops*) y de la lobina rayada (*Morone saxatilis*), aunque también se les puede ubicar en menor proporción en la región de la terminal axónica. Estudios realizados por Zhang y Slaughter en 1995 en preparaciones de retina de salamandra tigre (*Ambystoma tigrinum*) evaluaron las corrientes generadas por GABA en presencia de bicuculina y baclofeno. Bajo estas condiciones el GABA redujo preferencialmente la actividad de las células bipolares ON y dicha actividad inhibitoria fue sensible a la picrotoxina y al CACA. Así, se concluyó la participación de las s-GABA ρ es principalmente en las células bipolares ON.

En la retina existen diversos estudios en animales transgénicos que muestran que la ausencia de la s-GABA ρ 1 puede tener diversas implicaciones como la completa ausencia de la expresión de las s-GABA ρ , reducción de la amplitud y tiempo de respuesta en corrientes generadas por el GABA, así como la subsecuente pérdida del balance entre la excitación e inhibición en la actividad de las células bipolares (McCall *et al.*, 2002). Además, en ratones knockout (ρ 1^{-/-}) se ha demostrado recientemente que las alteraciones microvasculares que se presentan debidas a la ausencia en la expresión de la subunidad son muy similares a las observadas en la retinopatía diabética (Zheng *et al.*, 2010).

Expresión de las subunidades GABA ρ fuera de la retina

Diversos estudios han indicado que además de la retina, a las s-GABA ρ también se les puede localizar en estructuras cerebrales, aunque en menor proporción. El paradigma de la localización y funcionalidad del receptor en el SNC se apoya en evidencia experimental con el uso de técnicas electrofisiológicas, biología molecular e inmunolocalización y que se detallan a continuación.

Amígdala

En la amígdala, parte del sistema límbico y relacionada con emociones como la ansiedad, aprendizaje emocional, miedo, y el placer han sido reportadas las s-GABA ρ ; por ejemplo en 1999 Delaney y Sah., determinaron por electrofisiología la presencia de un componente sensible al TPMPA en la amígdala de rata; este estudio sentó las bases para determinar la localización de las subunidades GABA ρ en los núcleos amigdalinos. Respecto a esto en 2005 Fujimura y cols., mediante qRT-PCR e hibridación *in situ*, indicaron que las s-GABA ρ 1 y ρ 2 se expresan en las regiones centrales, laterales y basolaterales de la amígdala de rata. Mientras que Flores-Gracia y cols. (2010), indicaron que las respuestas de miedo y ansiedad son fuertemente moduladas por TPMPA aplicado vía intracerebral en las regiones centrales, laterales, basolaterales y principalmente en las islas paracapsulares intercaladas y mediales de la amígdala. Finalmente, Rosas-Arellano y cols., en 2011 mediante RT-PCR, hibridación *in situ* e inmunofluorescencia indicaron que a dichas subunidades también se les puede localizar en los núcleos corticales basomediales y posteromediales en la amígdala de ratón.

Bulbo Olfativo

En 2007 Chen y cols., indicaron mediante RT-PCR e inmunohistoquímica que GABA ρ 1 se expresa en células de la capa mitral olfativa; además demostraron en ratones knockout (*rho1^{-/-}*) mediante pruebas de sensibilidad al olor cítrico (que excluye la actividad trigeminal), que la sensibilidad al olor aumenta cuando esta subunidad está ausente, determinando que GABA ρ 1 actúa como un modulador inhibitorio en el proceso de la transmisión de señales y procesamiento de información olfativa.

Cerebelo

Los reportes experimentales de la presencia de las s-GABA ρ en el cerebelo son abundantes; e incluyen desde la descripción mediante RT-PCR e hibridación *in situ* de estas subunidades tanto en el cerebelo de pollo (Albrecht *et al.*, 1997), como en el de los roedores. Por ejemplo, en estos últimos Drew y Johnston en 1992 describieron que más del 60% de GABA[³H] unido a membranas extraídas del cerebelo de rata no es desplazado por la bicuculina ni por el baclofeno y que altas concentraciones de isoguvacina y muscimol son necesarias para inhibir la unión de GABA[³H]. En 1998 Boue-Grabot y cols., mediante análisis de Western blot e inmunohistoquímica determinaron la distribución de las tres s-GABA ρ en el cerebelo de rata, indicando la localización en células de Purkinje, como también fue reportado en 2002 por Rozzo y cols., mediante técnicas de hibridación *in situ*, Western blot, inmunohistoquímica y electrofisiología, en este último estudio también se indicó que las s-GABA ρ 1 y ρ 2 están presentes en las células en cesta en el cerebelo de rata.

Otro estudio en el que se aplicaron técnicas de qRT-PCR, hibridación *in situ*, inmunoenzima e inmuno-oro (Mejía *et al.*, 2008) demostraron que las tres s-GABA ρ se expresan en el cerebelo de rata desde el primer día de nacimiento hasta el estado adulto; además indicaron que dichas subunidades se localizan de manera preferencial a nivel perisináptico. Por otra parte, en ratón se describió en 2006 por Harvey y cols., que corrientes evocadas por la aplicación de CACA fueron eliminadas tras la colocación de TPMPA; de manera importante indicaron que las respuestas generadas por el CACA presentan un perfil diferencial, presentándose una disminución de la respuesta cuando el fármaco se aplica en regiones dendríticas que en el soma de la células de Purkinje; por otra parte, la inmunohistoquímica indicó que cuando se usa un anticuerpo que distingue a las tres s-GABA ρ , el gradiente de distribución se mantiene conservado, es decir, estas se ubican en mayor proporción en el soma que en los árboles dendríticos de estas células. Finalmente se demostró mediante análisis de inmunoprecipitación que la subunidad GABA α 1 co-ensambla con la subunidad GABA ρ 1 en células de Purkinje.

Colículo superior

Un estudio donde se determinó la expresión de transcritos para las s-GABA ρ en el cerebro de rata fue realizado en 1998 por Wegelius y cols., usando técnicas de Northern blot, hibridación *in situ*; RT-PCR seguido de Southern blot, se demostró que las s-GABA ρ se pueden localizar en diferentes áreas del SNC, incluido el estrato superficial grisáceo del colículo superior donde se ha determinado su localización específica y la funcionalidad de las s-GABA ρ mediante técnicas de inmunohistoquímica, electrofisiología y trazado neuronal (Pasternack *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 2001; Born y Schmidt, 2008; Wahle y Schmidt, 2009). Además se ha demostrado en esta región mediante análisis de inmunofluorescencia que la s-GABA ρ 1 co-expresa con la subunidad GABA-A γ 2 (Frazao *et al.*, 2007).

A diferencia de la retina, donde se reportó en ratones knockout (*rho1*^{-/-}) que la ausencia de la s-GABA ρ 1 produce la pérdida total de la expresión de otras subunidades ρ ; en el colículo superior la ausencia de esta subunidad no produce la pérdida de respuestas sensibles al TPMPA, además de un aumento en la sensibilidad por el neurotransmisor lo que sugirió la sobre expresión homomérica de otra subunidad GABA ρ (Schlicker *et al.*, 2009).

Corteza visual

Los reportes experimentales sobre la expresión de las s-GABA ρ en la corteza visual son escasos; los primeros indicios de su presencia fueron realizados por Wegelius y cols., en 1998 quienes indican mediante hibridación *in situ*, que la capa VI del área 2L y 2M de la corteza visual de la rata expresan la s-GABA ρ 2. Por otra parte en la corteza visual de la rata se ha descrito recientemente que el ARNm de la subunidad GABA ρ 2 se expresa en aquellas interneuronas que contienen parvalbumina en las capas II a VI (Wahle y Schmidt, 2009). En estas mismas capas se han reportado mediante hibridación *in situ* e inmunohistoquímica que la corteza visual de ratón en sus regiones medio medial y medio lateral, expresan las s-GABA ρ 1 y ρ 2 (Rosas-Arellano *et al.*, 2011).

Cuerpo calloso

En este haz de fibras que tiene como función general el comunicar áreas interhemisféricas se ha descrito la presencia de los transcritos de las s-GABA ρ 1 y ρ 2 (López-Chávez *et al.*, 2005); Es posible que axones corticales o talámicos presenten los ARNm y que estos sean traducidos en la región sináptica o que sean células de naturaleza glial ubicadas en esta región las que expresen las subunidades como se ha reportado recientemente (Martínez-Delgado *et al.*, 2011).

Médula espinal

Los primeros reportes de un componente con características farmacológicas correspondientes a las s-GABA ρ fue realizado en 1975 por Johnston y cols., en interneuronas de la médula espinal del gato. Mientras que Wegelius y cols., en 1998 indicaron que en el ganglio de la raíz dorsal se localizan los transcritos de las s-GABA ρ 1 y ρ 3. En 2002 Rozzo y cols., demostraron mediante técnicas de hibridación *in situ*, Western blot, inmunohistoquímica y electrofisiología que el componente corresponde a las s-GABA ρ y que se ubica en interneuronas y en neuronas motoras. Por otra parte en 2003 Zheng y cols., indicaron mediante estudios de inmunolocalización que la s-GABA ρ 1 se expresa en el asta dorsal de la médula espinal, específicamente en la lamina I y II del ganglio de la raíz dorsal del ratón, además en un ratón knockout *rho1*^(-/-) determinaron mediante la prueba de *estimulación táctil por los filamentos de Von Frey*, que mide umbral de dolor táctil y áreas de alodinia, que dicha subunidad juega un papel importante en la modulación y transmisión del dolor ya que en ausencia de GABA ρ 1 aumenta la percepción al dolor. Otro resultado importante fue reportado por Frazao y cols., en 2007, quienes demostraron por análisis de doble inmunofluorescencia que la s-GABA ρ 1 co-expresa con la subunidad α 1 del receptor de Glicina en motoneuronas del asta ventral de la médula espinal de ratón.

Núcleo supraquiasmático

Otros reportes indican que existen otras estructuras cerebrales donde se pueden localizar las s-GABA ρ . Por ejemplo, en 1995 O'Hara y cols., describieron en el ratón mediante

análisis de Northern blot que respecto a otras estructuras cerebrales, existe una baja expresión de las s-GABA ρ en el núcleo supraquiasmático, estructura implicada en la generación de ritmos circadianos, ritmos hormonales y en la regulación del comportamiento.

Sistema óptico

Además de la retina, en este sistema se ha descrito en el tectum óptico de rana mediante estudios electrofisiológicos por Nistri y Sivilotti en 1985 y Sivilotti y Nistri en 1989, la presencia de receptores con actividad inhibitoria y con claras características farmacológicas de las s-GABA ρ : alta sensibilidad al GABA y a sus análogos TACA y CACA, así como a la picrotoxina e insensible a la bicuculina y la estrocnina (antagonista de los receptores a glicina). Mediante análisis de hibridación *in situ* también se ha reportado la presencia de las s-GABA ρ 1 y ρ 2 en el tectum óptico y en el núcleo del istmo óptico del pollo (Albrecht *et al.*, 1997). En 1998 Boue-Grabot y cols., mediante técnicas de Northern blot, hibridación *in situ* y RT-PCR también indicaron la presencia de los transcritos de las tres s-GABA ρ en algunas células de la capa del nervio y en numerosas células del tracto óptico de la rata. Finalmente en el núcleo geniculado lateral, estructura donde las células ganglionares de la retina proyectan sus axones, Wegelius y cols., en 1998 indicaron la presencia de la s-GABA ρ 2 mediante análisis de hibridación *in situ* en el cerebro de rata. En la región ventral de este núcleo en la rata, se reportó mediante análisis electrofisiológico la presencia de un componente GABA ρ (Born y Schmidt, 2008).

Tálamo

En esta estructura, encargada de procesar información sensorial, excepto la del olfato, Albrecht y cols., en 1997, mediante análisis de hibridación *in situ* han indicado que el transcrito de la s-GABA ρ 1 se localiza en el tálamo dorsal del pollo. Además Wegelius y cols., en 1998 reportaron mediante análisis de RT-PCR la presencia de la s-GABA ρ 1 en esta estructura.

Tallo cerebral

En esta estructura que tiene la función de comunicar al encéfalo con la médula espinal y los nervios periféricos, Wegelius y cols., en 1998 describieron mediante RT-PCR, seguido de Southern blot la presencia de la s-GABA ρ 1. Por otra parte en 2004 Milligan y cols., por medio de técnicas de RT-PCR, electrofisiología, Western blot, inmunohistoquímica y co-inmunoprecipitación demostraron que las tres s-GABA ρ se expresan en el tallo cerebral de la rata; de manera interesante mostraron que de los tres mensajeros de las s-GABA ρ detectados mediante RT-PCR, solo es posible determinar la presencia de la s-GABA ρ 1 mediante hibridación *in situ*; específicamente en el núcleo del tracto solitario y vagal dorsal. Otros datos relevantes del estudio se asocian a lo siguiente: 1) a nivel de ultraestructura la s-GABA ρ 1 fue localizada adyacente a la membrana postsináptica en 240 sinapsis de tres ratas analizadas y 2) al estudiar la funcionalidad del receptor usando técnicas electrofisiológicas de fijación de corriente en célula completa se determinó que aquellas corrientes que fueron activadas por el CACA (agonista selectivo de las s-GABA ρ) también fueron sensibles tanto al TPMPA como a la bicuculina, estas corrientes sólo fueron eliminadas cuando ambos antagonistas fueron colocados. Estas respuestas fueron moduladas con zolpidem, que tiene alta afinidad por la subunidad α 1 del R-GABA-A, estos datos sugirieron fuertemente la presencia de la subunidad γ 2 ya que esta es especialmente sensible al fármaco y se asocia regularmente con la subunidad α 1 (Cope *et al.*, 2004); por medio de inmunohistoquímica se confirmó la presencia de estas dos subunidades. Finalmente los resultados de la inmunoprecipitación sugirieron que neuronas del tallo cerebral pueden contener heterómeros que contienen subunidades α 1, γ 2 y ρ 1.

En relación a esta co-expresión, estudios realizados por Frazao y cols., en 2007 demostraron por análisis de doble inmunofluorescencia que en neuronas motoras del tallo cerebral la s-GABA ρ 1 co-localiza con la subunidad GABA-A γ 2. En 2005 López-Chávez y cols., mostraron por análisis de RT-PCR la expresión y distribución del ARNm de las s-GABA ρ 1 y ρ 2 en diversas áreas del SNC bovino (Fig. 5), incluido el puente de Varolio y bulbo raquídeo del tallo cerebral de la vaca. Finalmente en 2007 Rosas-Arellano y cols.,

demonstraron por análisis de inmunohistoquímica en el bulbo raquídeo de la vaca, que la s-GABA ρ 1 se encuentra específicamente en células de soma piramidal, oval y fusiforme de los núcleos olivar, cuneiforme, cuneiforme accesorio y reticular.

Complejo hipocampal

Existe una amplia gama de reportes sobre la localización y función de las s-GABA ρ en esta estructura relacionada, entre otras funciones, con la memoria espacial. Por ejemplo, registros electrofisiológicos realizados por Strata y Cherubini en 1994 en neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo de ratas entre los días postnatales P0 a P14 y adultos de 35 días muestran que existe un componente insensible a la bicuculina y al baclofeno durante las 2 primeras semanas después del nacimiento y que desaparece conforme madura el hipocampo. Respecto a esta misma área (CA3 de hipocampo), en 1998 Cherubini y cols., mediante técnicas de Patch Clamp indicaron que en estas células postnatales y muy probablemente en regiones de las terminales nerviosas de las células piramidales, se localizan dos clases de receptores GABAérgicos, uno sensible a la bicuculina y otro insensible a esta, pero sensible a la picrotoxina y con una prolongada despolarización en presencia del GABA, lo que favorece la entrada de calcio a través de canales dependientes de voltaje, pudiendo ser éste un mecanismo esencial para la estabilización de contactos sinápticos durante períodos críticos del desarrollo. Por otra parte Wegelius y cols., en 1998, indicaron la presencia de los transcritos de las tres s-GABA ρ en el complejo hipocampal durante días postnatales y en el estado adulto mediante análisis de RT-PCR, hibridación *in situ* y southern blot. Otro ejemplo son los estudios de Didelon y cols., en 2002, quienes indican que mediante análisis de RT-PCR fueron encontrados los ARNm de las subunidades GABA ρ 1 y ρ 2 en el hipocampo en desarrollo y en la etapa adulta, siendo GABA ρ 2 relativamente más abundante que GABA ρ 1; mientras que la s-GABA ρ 3 fue localizada en niveles relativamente más bajos respecto a las otras dos subunidades. Cuando se realizó el estudio electrofisiológico se determinó que las células insensibles a la bicuculina expresan la s-GABA ρ 1 en combinación con la subunidad GABA-A α , mientras que aquellas que expresan GABA ρ 2 no co-expresaban con dichas subunidades α .

En 2002 Rozzo y cols., demostraron mediante técnicas de hibridación *in situ*, Western blot, inmunohistoquímica y electrofisiología que las ρ -GABA ρ se expresan en hipocampo de rata, también demostraron la expresión diferencial de GABA ρ 1 y ρ 2 en edades postnatales P1 y P7 así como en el estado adulto; evidenciando que además de ubicarse en células piramidales de la región CA3 (Strata y Cherubini, 1994), también la región CA1 y células granulares del giro dentado expresan ambas subunidades; respecto a la región CA1 Hartmann y cols., en 2004 mostraron en las células piramidales de esta región un componente insensible a la bicuculina, selectivamente activado por CACA y antagonizado por TPMPA, sugiriendo además un posible co-ensamble con otras subunidades GABA-A; mientras que en 2006 Alakuijala y cols., determinaron que en el área CA1 del hipocampo de rata los potenciales sinápticos evocados con CACA suprimen la excitabilidad postsináptica, efecto que fue antagonizado con la exposición de TPMPA.

Recientemente registros realizados en células piramidales de hipocampo de ratón *in vitro* e *in vivo* mostraron una actividad sináptica espontánea aún en presencia de 100nM de tetrodotoxina (TTX) y 2mM de Mg²⁺. Después de añadir 4 μ M de CNQX (6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona [antagonista de los receptores AMPA]) se evidenció la actividad espontánea producida por los receptores GABA, dicha actividad fue eliminada en su mayoría por 10 μ M de bicuculina, lo que bloqueó sustancialmente al R-GABA-A. Sin embargo, aún en presencia de bicuculina se observó una actividad espontánea remanente que fue eliminada con 5 μ M de TPMPA, lo que sugirió la contribución de un componente GABA ρ . Además se observó que la actividad sináptica GABAérgica fue generada por dos componentes: uno de mayor proporción y que presentó una inactivación rápida y otro menor con una inactivación lenta, esta última atribuida a GABA ρ (Fig. 4).

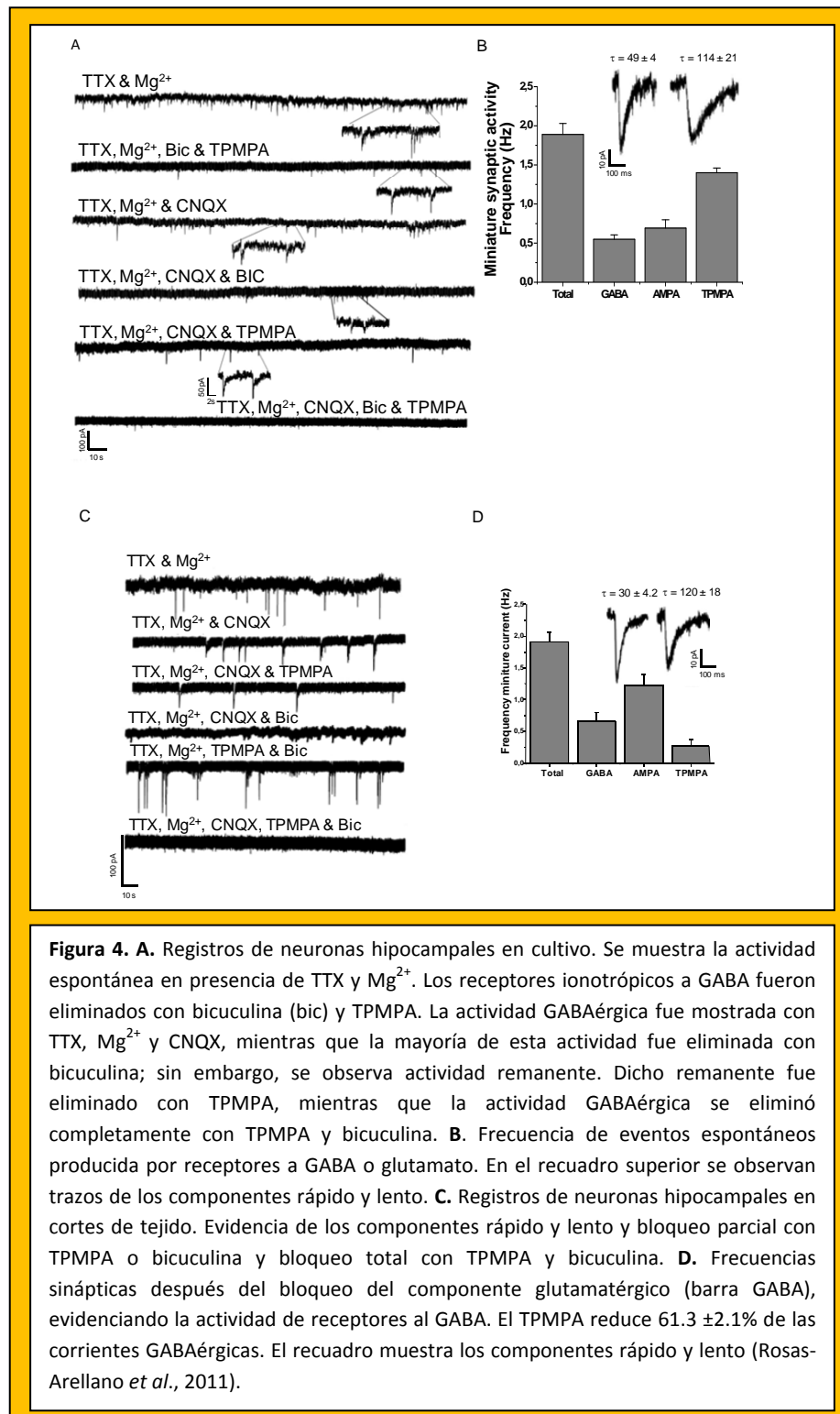
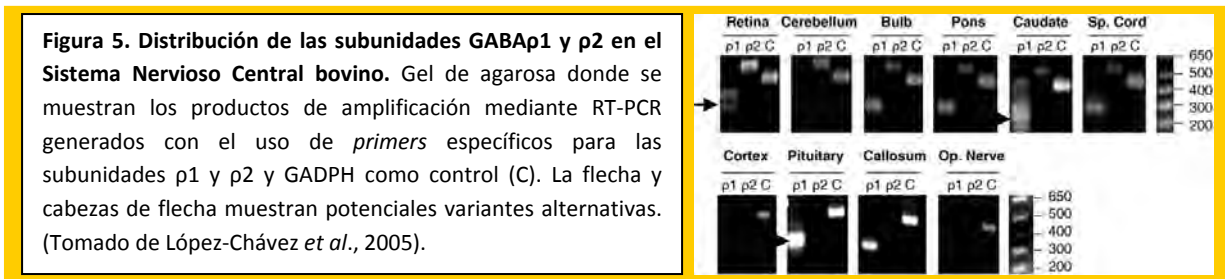


Figura 4. A. Registros de neuronas hipocámpales en cultivo. Se muestra la actividad espontánea en presencia de TTX y Mg²⁺. Los receptores ionotrópicos a GABA fueron eliminados con bicuculina (bic) y TPMPA. La actividad GABAérgica fue mostrada con TTX, Mg²⁺ y CNQX, mientras que la mayoría de esta actividad fue eliminada con bicuculina; sin embargo, se observa actividad remanente. Dicho remanente fue eliminado con TPMPA, mientras que la actividad GABAérgica se eliminó completamente con TPMPA y bicuculina. **B.** Frecuencia de eventos espontáneos producida por receptores a GABA o glutamato. En el recuadro superior se observan trazos de los componentes rápido y lento. **C.** Registros de neuronas hipocámpales en cortes de tejido. Evidencia de los componentes rápido y lento y bloqueo parcial con TPMPA o bicuculina y bloqueo total con TPMPA y bicuculina. **D.** Frecuencias sinápticas después del bloqueo del componente glutamatérgico (barra GABA), evidenciando la actividad de receptores al GABA. El TPMPA reduce 61.3 ± 2.1% de las corrientes GABAérgicas. El recuadro muestra los componentes rápido y lento (Rosas-Arellano *et al.*, 2011).

Neocóstriado y núcleo caudado

Los primeros indicios de la presencia de estas subunidades en esta estructura implicada fuertemente en el control motor y en la memoria motora fueron realizados por Albrecht y

cols., en 1997 mediante análisis de RT-PCR e hibridación *in situ* en una estructura altamente relacionada con el neocóstriado: el ectocóstriado, que en el pollo junto con el hiperestriado ventral constituyen el neocóstriado. Por otra parte López-Chávez y cols., en 2005; mediante análisis de RT-PCR se indicó la presencia de los transcritos de las s-GABA ρ 1 y ρ 2 en el núcleo caudado bovino. De manera particular en este estudio, se observó la amplificación de múltiples bandas (Fig. 5); lo que sugirió la posibilidad de una diversidad molecular del transcrito de GABA ρ 1 que podrían codificar para varias formas alternativas de “splicing” y que pueden corresponder a las isoformas de esta subunidad previamente reportadas (Martínez-Torres *et al.*, 1998; Demuro *et al.*, 2000).



En 2007 Rosas-Arellano y cols., indicaron que los transcritos reportados en el estudio anterior (López-Chávez *et al.*, 2005), se traducen a proteínas en células poligonales y fusiformes en la región rostral de la cabeza del **núcleo caudado** bovino (Fig. 6B-F). Este estudio además demostró que las respuestas generadas por el GABA en ovocitos microinyectados con membranas extraídas del núcleo caudado y la retina de vaca, son altamente sensibles al GABA, resistentes a la bicuculina y presentaron una baja tasa de desensibilización; características típicas de las s-GABA ρ (Fig. 6A). Recientemente en nuestro laboratorio, se ha demostrado la presencia de los ARNm de las s-GABA ρ 1 y ρ 2 en la estructura homóloga al núcleo caudado en el cerebro de ratón, el caudado-putamen (neocóstriado) (Fig. 7). La distribución en el cerebro de las s-GABA ρ y el método de detección mencionada en los párrafos anteriores, se encuentra resumidos en la tabla 1.

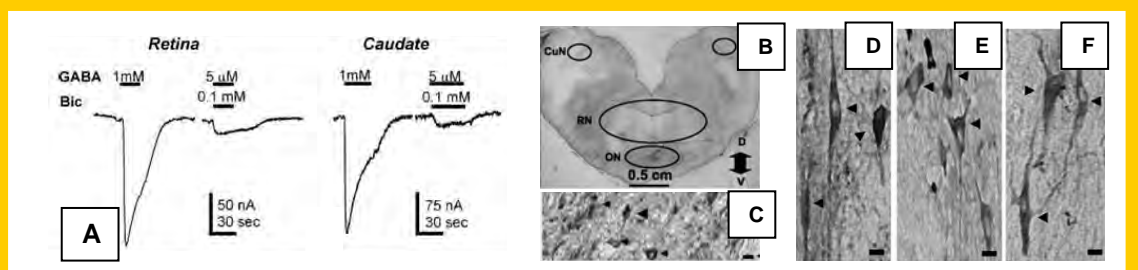


Figura 6. Distribución de la subunidad GABA ρ 1 en el bulbo raquídeo y cabeza del núcleo caudado bovino. A. Trasplante de membranas plasmáticas en ovocitos de *X. laevis*. Corrientes de GABA generadas en ovocitos inyectados con membranas plasmáticas de retina y núcleo caudado. El componente GABA-A genera corrientes de mayor amplitud que desensibilizan rápidamente que fueron antagonizadas por bicuculina (Bic). El componente GABA ρ fue identificado por su resistencia a la bicuculina, su lenta tasa de desensibilización y mayor sensibilidad al GABA (5 μ M). **B.** Inmunolocalización de la subunidad ρ 1 en el tallo cerebral en un corte horizontal. **C.** Las flechas muestran somas de tipos fusiforme, poligonal y oval. **D-F.** Inmunolocalización de la s-GABA ρ 1 en la cabeza del núcleo caudado. Las flechas muestran neuronas de tipo piramidal y fusiforme. Abreviaciones: CuN (Núcleo Cuneiforme); RN (Núcleo reticular); ON (Núcleo Olivar). (Tomado de Rosas-Arellano *et al.*, 2007).

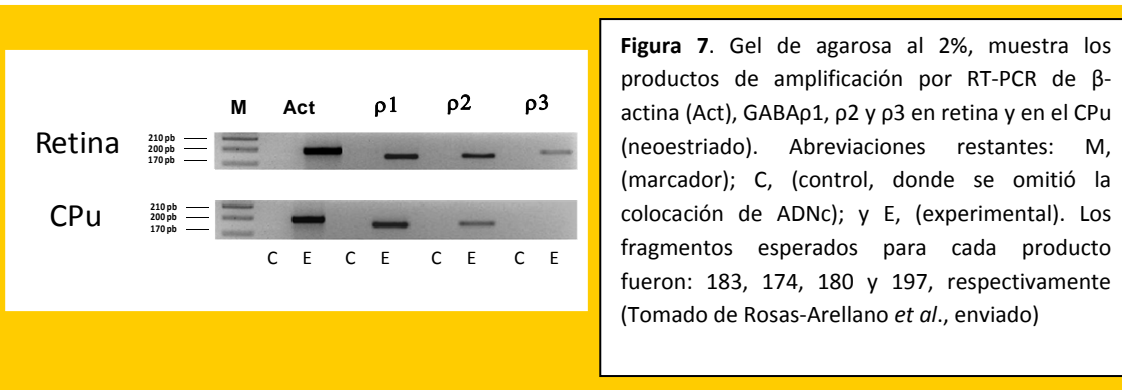


Figura 7. Gel de agarosa al 2%, muestra los productos de amplificación por RT-PCR de β -actina (Act), GABA ρ 1, ρ 2 y ρ 3 en retina y en el CPU (neocórtico). Abreviaciones restantes: M, (marcador); C, (control, donde se omitió la colocación de ADNc); y E, (experimental). Los fragmentos esperados para cada producto fueron: 183, 174, 180 y 197, respectivamente (Tomado de Rosas-Arellano *et al.*, enviado)

TABLA No. 1
Localización de las s-GABA ρ fuera de la retina

Subunidad	Célula/Tejido	Especie	Método de detección	Referencia
No determinado	Neuronas motoras de la médula espinal	Gato	Electrofisiología	Johnston <i>et al.</i> , 1975
No determinado	Tectum óptico	Rana	Electrofisiología	Nistri y Sivilotti, 1985
No determinado	Tectum óptico	Rana	Electrofisiología	Sivilotti y Nistri, 1989
No determinado	Cerebelo	Rata	Unión a receptor, electrofisiología	Drew y Johnston, 1992
No determinado	Neuronas piramidales de CA3 hipocampales	Rata	Electrofisiología	Strata y Cherubini, 1994
ρ 1 y ρ 2	Núcleo supraquiasmático (escasa expresión)	Ratón	Northern blot	O'Hara <i>et al.</i> , 1995
ρ 1 y ρ 2	Cerebelo, tectum óptico, tálamo dorsal,	Pollo	RT-PCR e hibridación <i>in situ</i>	Albrecht <i>et al.</i> ,

	ectocórtex, núcleo pretectal		<i>situ</i>	1997
$\rho 1, \rho 2$ y $\rho 3$	Estrato superficial grisáceo del colículo superior, nervio óptico y células de Purkinje del cerebelo	Rata	RT-PCR, hibridación <i>in situ</i>	Boue-Grabot <i>et al</i> , 1998
No determinado	Área CA3 del hipocampo	Rata	Electrofisiología	Cherubini <i>et al</i> , 1998
$\rho 1, \rho 2$ y $\rho 3$	Región CA1 del hipocampo, estrato superficial grisáceo del colículo superior, cerebelo, núcleo geniculado lateral, corteza visual, tálamo, tallo cerebral y ganglio de la raíz dorsal	Rata	Northern blot, hibridación <i>in situ</i> ; RT-PCR y Southern blot	Wegelius <i>et al</i> , 1998
No determinado	Amígdala	Rata	Electrofisiología	Delaney <i>et al</i> , 1999
$\rho 1$ - $\rho 3$	Colículo superior	Rata	Inmunohistoquímica y electrofisiología	Pasternack <i>et al</i> , 1999
No determinado	Colículo superior	Rata	Electrofisiología	Schmidt <i>et al</i> , 2001
$\rho 1, \rho 2$ y $\rho 3$	Hipocampo en desarrollo y adulto	Rata	RT-PCR, Southern blot y electrofisiología	Didelon <i>et al</i> , 2002
$\rho 1$ y $\rho 2$	Hipocampo CA1 y CA3, Cerebelo (Purkinje, células en cesta), médula espinal (motoneuronas e interneuronas)	Rata	hibridación <i>in situ</i> , Western blot, inmunohistoquímica y electrofisiología	Rozzo <i>et al</i> , 2002
$\rho 1$	lamina I y II del ganglio de la raíz dorsal, médula espinal	Ratón	Inmunohistoquímica, knockout ($\rho 1^{-/-}$), prueba de sensibilidad al dolor	Zheng <i>et al</i> , 2003
No determinado	Células piramidales región CA1 del hipocampo	Rata	Electrofisiología	Hartmann <i>et al</i> , 2004
$\rho 1, \rho 2$ y $\rho 3$	Núcleo del tracto solitario y núcleo vagal dorsal del Tallo cerebral	Rata	RT-PCR, electrofisiología, Western blot, inmunohistoquímica y coimmunoprecipitación	Milligan <i>et al</i> , 2004
$\rho 1$ y $\rho 2$	Amígdala	Rata	qRT-PCR, hibridación <i>in situ</i>	Fujimura <i>et al</i> , 2005
$\rho 1$ y $\rho 2$	Cerebelo, bulbo raquídeo, puente de Varolio, Núcleo Caudado, médula espinal, glándula pituitaria, y cuerpo calloso	Bovino	RT-PCR	López-Chávez <i>et al</i> , 2005
No determinado	Área CA1 del hipocampo	Rata	Electrofisiología	Alakuijala <i>et al</i> , 2006
$\rho 1$ - $\rho 3$	Células de Purkinje	Ratón	Electrofisiología, inmunohistoquímica y co-inmunoprecipitación	Harvey <i>et al</i> , 2006
$\rho 1$	Capa mitral del bulbo olfativo	Ratón	RT-PCR, inmunohistoquímica, knockout ($\rho 1^{-/-}$), prueba conductual	Chen <i>et al</i> , 2007
$\rho 1$	Médula espinal, tallo cerebral y colículo superior	Rata Ratón	Inmunohistoquímica Doble inmunomarcaje	Frazao <i>et al</i> , 2007
$\rho 1$	Neuronas piramidales, ovals y fusiformes de núcleos olivar, cuneiforme y reticular del tallo cerebral y neuronas fusiformes y	Bovino	Electrofisiología e inmunohistoquímica	Rosas-Arellano <i>et al</i> , 2007

	poligonales del núcleo caudado			
No determinado	Núcleo geniculado lateral	Rata	Electrofisiología	Born y Schmidt, 2008
$\rho 1, \rho 2$ y $\rho 3$	Cerebelo P1-P60	Rata	qRT-PCR, hibridación <i>in situ</i> , inmunoenzima e inmuno-oro	C. Mejía <i>et al</i> , 2008
$\rho 2$	Corteza visual y colículo superior	Rata	Hibridación <i>in situ</i> y electrofisiología	Wahle y Schmidt, 2009
No determinado	Amígdala	Rata	Conductual	Flores-Gracia <i>et al</i> , 2010
$\rho 2$	Células gliales cerebelares	Ratón	Inmunocitoquímica, tráfico intracelular	Martínez-Delgado <i>et al</i> , 2011
$\rho 1$ y $\rho 2$	Hipocampo, amígdala y corteza visual	Ratón	RT-PCR, Hibridación <i>in situ</i> , WB, inmunohistoquímica, inmuno-oro y electrofisiología	Rosas-Arellano <i>et al</i> , 2011

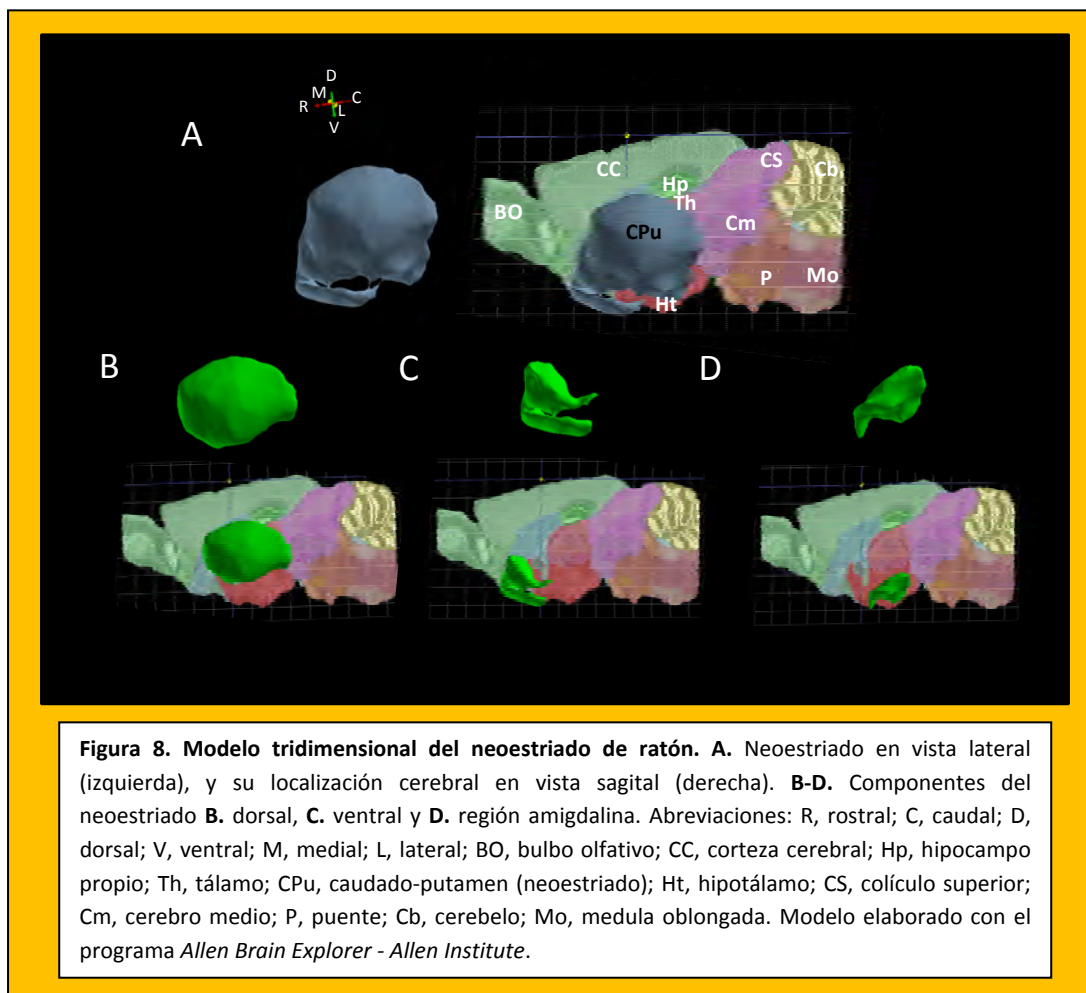
Como ya se mencionó, estudios realizados en nuestro laboratorio indican que los ARNm de las subunidades GABA $\rho 1$ y $\rho 2$ son expresados en el neostriado de ratón y también que en neuronas de la región hipocampal en cortes de cerebro y en cultivo se encuentra un componente farmacológico con características GABA ρ . A continuación se describirá brevemente el neostriado y la región hipocampal por ser las estructuras estudiadas en la presente tesis.

Caudado-putamen (neostriado)

El término ganglios basales ha sido usado para referirse a todos los núcleos subcorticales que se encuentran cercanos a la base del cerebro e incluyen al núcleo caudado y al putamen; ambas estructuras en conjunto son referidas como neostriado o estriado. La denominación más adecuada es la de neostriado y se debe a la aparición filogenética de ambas estructuras a partir de los réptiles hasta los mamíferos. Comúnmente, como se mencionó también se hace referencia a esta estructura como estriado, sin embargo este término incluye, además del caudado y el putamen al globo pálido (Parent, 1986). El núcleo caudado y el putamen están separados uno del otro por la cápsula interna (CI) en la mayoría de los mamíferos incluidos los bovinos, caprinos, felinos, caninos y primates. Sin embargo, en los roedores la CI no está muy desarrollada, lo que hace que ambas

estructuras formen una estructura fusionada conocida como caudado-putamen (CPu o neoestriado) (Heimer *et al.*, 1995).

El neoestriado es considerado uno de los núcleos subcorticales más importantes del cerebro; esto es debido a que representa el primer nivel de recepción de información cortical que se dirige hacia los ganglios basales. Está integrado tres componentes principales: 1) dorsal (Fig. 8B), 2) ventral (Fig. 8C) y 3) región amigdalina (Fig. 8D); que a su vez están constituidos por dos compartimentos, 1) los parches o estriosomas y 2) la matriz. (Kawaguchi, 1997; Partridge *et al.*, 2009).



Citológicamente, el neoestriado está constituido por dos tipos de neuronas 1) neuronas de proyección y 2) interneuronas, las cuales difieren a nivel estructural, conectividad, neuroquímica y función. Las neuronas de proyección son las predominantes

y constituyen en la rata el 95% de la población de esta estructura (Kawaguchi, 1997; Bennett y Wilson, 2000; Partridge *et al.*, 2009). Estas células tienen somas de entre 10 y 20 μ m de diámetro y árboles dendríticos con abundantes espinas, estas dendritas pueden arborizar en todas direcciones llegando a alcanzar hasta los 500 μ m de diámetro. Se ha mostrado que tienen un axón principal el cual emite colaterales que pueden estar asociadas a los árboles dendríticos de las células de proyección vecinas. Se han descrito dos tipos de acuerdo a su proyección axonal y a marcadores neuroquímicos, ambas expresan la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD): 1) las que proyectan al globo pálido segmento externo (GPe) utilizan encefalina como co-transmisor, a nivel funcional se les ha relacionado con la inhibición de movimientos involuntarios; y 2) por otra parte se han distinguido tres tipos para aquellas que expresan sustancia P y dinorfina; 2.1) las que proyectan al globo pálido segmento interno (GPi), y funcionalmente se les ha descrito que facilitan los movimientos planeados del tronco y las extremidades. 2.2) otro subgrupo que expresa sustancia P y que proyecta a la sustancia *nigra pars reticulata* (SNr), y que ha sido involucrado en el movimiento planeado de la cabeza y los ojos; 2.3) finalmente están aquellas que proyectan a la sustancia *nigra pars compacta* (SNc) donde allí modulan a las neuronas dopaminérgicas que proyectan a su vez hacia el neostriado (Albin *et al.*, 1989; DeLong, 1990; Graybiel, 1990; Reiner y Anderson, 1990; Gerfen, 1992; Lei *et al.*, 2004). Respecto a su localización se ha descrito que los somas de las neuronas que proyectan hacia el GPe, GPi y SNr se localizan en el matrisoma, mientras que en el estriosoma se encuentran los somas de aquellas que proyectan a la SNc (Graybiel, 1990; Reiner y Anderson, 1990; Gerfen, 1992).

También se conoce que aquellas neuronas que proyectan sus axones hacia el GPe expresan receptores D2 de dopamina, mientras que las que proyectan hacia el GPi y la SN expresan receptores a dopamina D1, aunque se ha descrito una pequeña población de neuronas de proyección que pueden co-expresar receptores D1 y D2 (Surmeier *et al.*, 1993). Ambos tipos neuronales pueden ser identificados mediante la encefalina y la sustancia P como marcadores con ensayos inmunohistoquímicos (Kawaguchi *et al.*, 1995).

En cuanto a las neuronas no espinosas, está reportado que conforman en la rata el 5% de la población total (Bennett y Wilson, 2000), participan como interneuronas y tienen somas de diversos tamaños, sus axones no proyectan fuera del neocórtex y sus dendritas contienen de escasas a nulas espinas. Se han distinguido cuatro tipos respecto a la presencia de diversos marcadores: **1)** acetilcolinérgicas: son consideradas las células gigantes del neocórtex, son más abundantes en la región dorsolateral; tienen somas esféricas u ovals de 20 a 35 μ m que pueden ubicarse tanto en la matriz como en el estrioso. Sus dendritas son lisas y radiadas, las cuales pueden bifurcar y ocupar un volumen de hasta 500 μ m; respecto a su axón, este se extiende dentro de la región medial de la matriz del neocórtex (Kubota y Kawaguchi, 1993; Kawaguchi *et al.*, 1995). **2)** GABAérgicas que expresan parvalbumina: sus somas son poligonales o fusiformes y miden entre 10 y 30 μ m; tienen dendritas que pueden o no ramificar extensivamente, en su parte proximal son lisas pero con varicosidades en su región distal; sus axones no proyectan fuera del neocórtex y son proporcionales a la distancia de las dendritas que posean. Se ubican preferencialmente en la región del matrisoma pero también se les puede encontrar en el estrioso. **3)** GABAérgicas que expresan calretinina: presentan somas de 9 a 17 μ m de diámetro, de los cuales surgen dendritas no espinosas que en sus extremos contienen varicosidades. Hasta el momento no se ha descrito la organización de sus axones respecto a su tamaño y distribución. No está claro si se ubican en el matrisoma o en el estrioso, pero se ha reportado que se distribuyen de manera especial en las regiones rostrales del neocórtex. **4)** GABAérgicas que expresan somatostatina, NADPH, diaforasa, óxido nítrico sintetasa y calbindina: es un tipo de neurona bipolar con soma de 10 a 20 μ m de diámetro, las dendritas no arborizantes, lisas y sin espinas; sus axones son arborizantes y son los más ampliamente distribuidos de las interneuronas y ocasionalmente parecen tener dos orígenes axonales. Preferencialmente se localizan en la matriz, pero también se pueden observar en el estrioso (Bennett y Bolam, 1993).

Aún se desconocen las funciones de las neuronas que expresan somatostatina y calretinina, mientras que aquellas que expresan acetilcolina y parvalbumina modulan a las neuronas de proyección (Kita *et al.*, 1990; Kawaguchi, 1993; Kawaguchi *et al.*, 1995; Koos y

Tepper, 1999; Partridge *et al.*, 2009). Los cuatro tipos de interneuronas son inmunorreactivos a colina acetiltransferasa, parvalbumina, calretinina, calbindina y/o somatostatina, respectivamente (Kawaguchi *et al.*, 1995).

Respecto a las subunidades GABA-A que se expresan en el neoestriado, se ha reportado la presencia de las siguientes subunidades: α 1-5, β 2, β 3, γ 2-3, δ y ρ 1 y ρ 2 (Fritschy y Mohler *et al.*, 1995; Piker *et al.*, 2000; López-Chávez *et al.*, 2005; Rosas-Arellano *et al.*, 2007; Ade *et al.*, 2008); siendo la combinación α 2, β 2-3, γ 2 la predominante (Fritschy y Mohler *et al.*, 1995). Reportes sobre la distribución del receptor en el neoestriado humano realizados por Waldvogel y cols., en 1999 indican lo siguiente: la subunidad α 1 se encuentra distribuida heterogéneamente, ubicándose de manera preferencial en somas de diversas formas y tamaños ubicados en el matrisoma, de los cuales se distinguen tres tipos: 1) neuronas que conforman el 60% de la población que expresa la subunidad α 1, sus somas son ovals de 10 a 18 μ m, con árboles dendríticos amplios (200 a 300 μ m de diámetro), largos, delgados y no espinosos principalmente localizados en el estriado dorsal y ventral. La expresión de la subunidad GABA α 1 en abundancia y localización correlacionó ampliamente con células GAD, parvalbumina, calbindina, calretinina positivas y en aquellas que expresan encefalina. 2) Células que representaron el 38% de la expresión de la subunidad α 1, que tenían apariencia bipolar con somas ovals de 14 a 24 μ m, dendritas no espinosas y con árboles dendríticos de 300 a 500 μ m de diámetro; éstas células expresaron GAD, calretinina, calbindina, parvalbumina (que en la rata no se expresa) y ChAT. 3) el tercer tipo de neurona representó el 2% restante y se observó que está localizada principalmente en regiones ventrales, y con una alta expresión de GAD.

Por otra parte, la subunidad α 2 mostró una fuerte expresión en el neoestriado dorsal tanto en regiones del matrisoma como en el estriosoma, en células clasificadas como tipo 4, las cuales fueron caracterizadas por tener somas ovals de 14 a 18 μ m de diámetro, dendritas primarias cortas y espinosas, dichas células correlacionan fuertemente con la expresión y localización de células GAD, calbindina y encefalina

positivas. Por su descripción morfológica su expresión corresponde a las neuronas medianas espinosas (Waldvogel *et al.*, 1999).

La subunidad $\alpha 3$ fue reportada como moderadamente baja a través del neocórtico tanto en regiones del matrisoma como en el estrioso, siendo evidente su expresión en la región dorsal y en grupos aislados en la región ventral, donde parece correlacionar bien con la expresión de otras subunidades GABA-A como $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 2,3$, y $\gamma 2$. Su expresión está relacionada a aquellas células de tipo 2-4, descritas en los párrafos anteriores; adicionalmente, se describió la presencia de esta subunidad en otro tipo celular denominada tipo 5, el cual está caracterizado por tener somas redondeadas u ovals con un diámetro de 25 a 50 μ m, dendritas radiadas no espinosas que emergen en todas direcciones, y que presentaron la morfología correspondiente a las células colinérgicas. También la subunidad $\alpha 3$ fue asociada con la expresión de la subunidad $\alpha 1$ y calretinina en células de tipo 2 (Waldvogel *et al.*, 1999).

Respecto a las subunidades $\beta 2$ y $\beta 3$ se reportó una alta intensidad de expresión a lo largo del neocórtico, expresándose en regiones del matrisoma y estrioso; pero principalmente en las regiones dorsales, mostrándose también una expresión en la región ventral en menor proporción, de manera interesante estas subunidades fueron localizadas en regiones de expresión de células calretinina positivas y escasamente en regiones de células que contienen calbindina y encefalina; su localización se relacionó con la expresión subunidad $\alpha 1$. GABA $\beta 3$ ha sido relacionada con neuronas tipo 1-4 descritas previamente (Waldvogel *et al.*, 1999).

Finalmente, se reportó que la subunidad $\gamma 2$ que se localiza tanto en el matrisoma como en el estrioso muestra una moderada expresión en el neocórtico, pero a diferencia de las demás subunidades esta se expresa de manera homogénea; localizándose en neuronas de tipo 1-4, donde se relacionó fuertemente con la expresión de GABA $\alpha 1$ y $\alpha 2$. Se ha relacionado a la expresión de células parvalbumina, calbindina y calretinina positivas (Waldvogel *et al.*, 1999).

A nivel de redes funcionales se han descrito dos vías en las que participan éstas células, una conocida como vía directa y otra como vía indirecta (Fig. 9). La vía directa se origina de las neuronas neostriatales inhibitoras con GABA y sustancia P como neurotransmisores, su activación produce una desinhibición del tálamo. Mientras que la vía indirecta también es inhibitora con GABA y encefalina, alcanza primero el globo pálido, luego al núcleo subtalámico mediante proyecciones exclusivamente GABAérgicas y finalmente desde el subtálamo llega hasta los núcleos de salida mediante una proyección glutamatérgica. La activación de la proyección estriopalidal inhibitora (GABA/encefalina) suprime la actividad de las neuronas palidales de modo que desinhiben el subtálamo, aumentando su acción excitadora sobre los núcleos de salida, lo que a su vez aumenta su inhibición sobre el tálamo. Además, la alta frecuencia de descarga de la mayoría de las neuronas palidales ejerce una inhibición tónica sobre el núcleo subtalámico (Alexander y Crutcher, 1990).

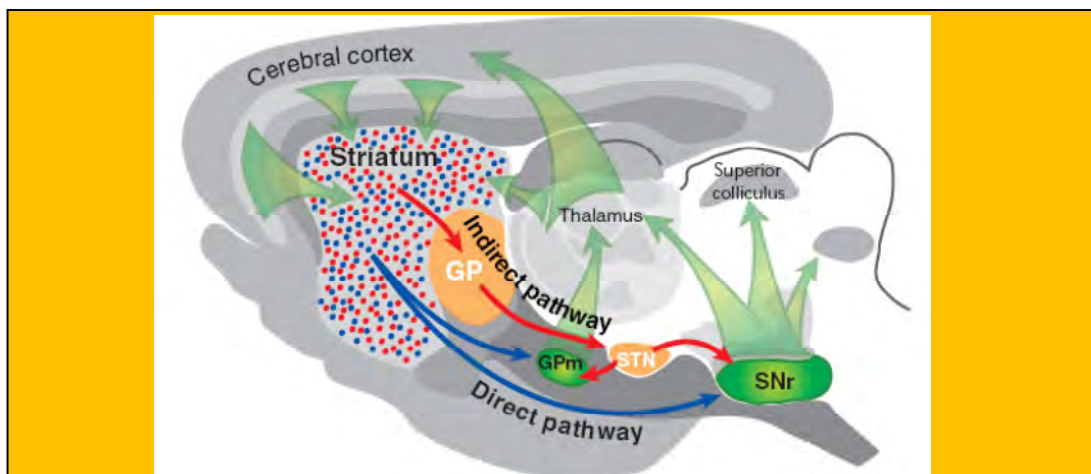


Figura 9. Vía cortico-estriatal. La corteza cerebral y el tálamo envían señales glutamatérgicas de entrada al neostriado (flechas verdes). Las señales de salida del neostriado son divididas en vía directa e indirecta, ambas GABAérgicas. La vía directa se origina de neuronas medianas espinosas (puntos azules), las cuales extienden sus axones (flechas azules) hacia dos núcleos de salida: el globo pálido medial (GPM, también denominado globo pálido interno) y hacia la sustancia *nigra pars reticulata* (SNr). Activación de esta vía produce inhibición de GPM y SNr, que se traduce en desinhibición del tálamo, esto facilita la excitación talámica y en consecuencia la de las áreas motoras corticales, así como una retroalimentación positiva tálamo-estriatal. La vía indirecta por su parte se origina de neuronas medianas espinosas del neostriado (puntos rojos), los axones de estas células terminan en el globo pálido (GP, también denominado globo pálido externo), células de esta estructura proyectan hacia el núcleo subtalámico (STN), que a su vez envía señales excitatorias hacia el GPM y la SNr. Activación de la vía indirecta produce inhibición de GP y secundariamente activación de STN que envía impulsos excitatorios hacia GPM/SNr produciéndose inhibición de tálamo y núcleos del tallo cerebral que se traduce en una inactivación de las áreas motoras corticales (Adaptado de Gerfen, 2006).

Así, durante la ejecución de un acto motor específico, las neuronas relacionadas con el movimiento en el globo pálido interno y sustancia *nigra reticulata* presentan una excitación o inhibición fásica de su frecuencia de descarga espontánea. La inhibición fásica juega un papel crucial en el control motor por desinhibición del núcleo ventrolateral del tálamo, facilitando los movimientos iniciados corticalmente, la excitación fásica parece tener el efecto opuesto. Aunque se desconoce cómo actúan las entradas de las vías directa e indirecta sobre las neuronas del globo pálido interno y sustancia *nigra reticulata*, es posible que las entradas de las vías directa e indirecta que son activadas selectiva y conjuntamente en relación con un movimiento iniciado corticalmente pueden ser dirigidos al mismo grupo de neuronas. De modo que las entradas de la vía indirecta podrían frenar o enlentecer un movimiento que fue reforzado por la vía directa. Otra posibilidad es que las entradas de las vías directa e indirecta asociadas a un movimiento podrían ser dirigidos a diferentes grupos neuronales, jugando un doble papel en la modulación cortical de los movimientos, reforzando por la vía directa un acto motor seleccionado o suprimiendo uno por la vía indirecta (Alexander y Crutcher, 1990).

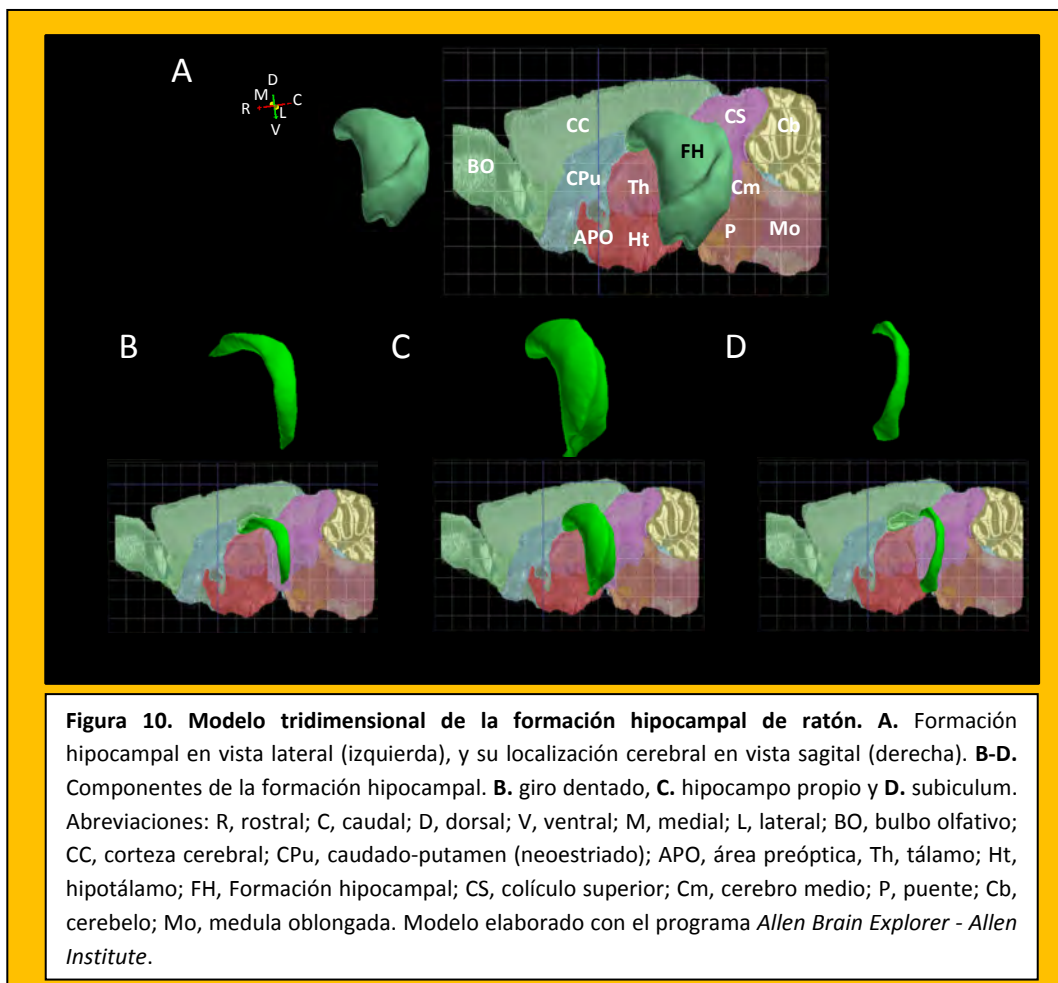
Además, a nivel funcional el neocórtico ha sido considerado como una estructura relacionada con el control motor y procesos de memoria (Devan *et al.*, 1996; Kemp y Powell, 1971; Packard *et al.*, 2001). Evidencia experimental indica, que alteraciones en la actividad inhibitoria generada por GABA en esta estructura, se refleja en trastornos del movimiento (Albin *et al.*, 1989); por ejemplo en la enfermedad de Parkinson la degeneración de las neuronas dopaminérgicas en el cerebro medio que proyectan hacia el neocórtico, induce cambios postsinápticos en las neuronas de proyección neocórticas produciendo un desequilibrio en tanto la vía directa (activación insuficiente), como en la vía indirecta (inhibición insuficiente) (Albin *et al.*, 1989; Gerfen, 2006; Braak y Tredici, 2008; Schiff, 2010). La secuela de cambios patológicos debida al agotamiento de la dopamina neocórtica, produce hiperexcitabilidad en las neuronas de proyección, principalmente en aquellas que expresan receptores de dopamina D2 (pertenecientes a la vía indirecta) (Day *et al.*, 2006; Deutch, 2006; Gerfen 2006; Neely *et al.*, 2007; Flores-Barrera *et al.*, 2010). Otras evidencias experimentales indican que el neocórtico también

tiene participación a nivel mnemónico, ya que se ha demostrado que cuando se bloquea la actividad del R-GABA-A, se inducen efectos amnésicos (Salado-Castillo *et al.*, 1996).

Región hipocampal

A pesar de los extensivos estudios sobre esta área, aún existe controversia relacionada a los términos de varios de los componentes de la región hipocampal. Los términos usados en el presente estudio fueron obtenidos de diversas referencias (Paxinos y Franklin, 2001; Paxinos, 2004; Cutsuridis *et al.*, 2010).

Macroscopicamente la región hipocampal está constituida por el giro dentado, el hipocampo propio y el subiculum (Fig. 10). La mayor diferencia entre estas es el número de capas corticales que tienen y la conectividad que presentan (Witter y Amaral, 2004).



La formación hipocámpal es una corteza trilaminar (allocorteza), en su capa más profunda se encuentran las dendritas basales de las células piramidales y una mezcla de fibras aferentes y eferentes que conforman un circuito local con las interneuronas de la región. De manera superpuesta se encuentra la capa polimorfa, capa celular que está compuesta de las células principales. En la parte superior, la capa más superficial, contiene dendritas apicales de las neuronas y la vasta mayoría de los axones que proveen señales de entrada a la región. En el giro dentado estas tres capas de manera respectiva son conocidas como el hilus, capa granular y capa molecular (*stratum moleculare*) (Witter, 2010; Witter y Amaral, 2004).

Reportes experimentales indican que las subunidades GABA α 1-4, α 5, β 1-3, δ y γ 2, están presentes en la formación hipocámpal; de estas se ha indicado que la subunidad α 2, es más abundante en el giro dentado; α 5 es ampliamente expresada en las áreas CA y poco en el giro dentado; mientras que en las células piramidales y su región dendrítica las subunidades α 2, α 5, β 2, β 3 γ 2 son muy abundantes. De manera peculiar la subunidad GABA α 1 parece localizarse principalmente en los árboles dendríticos de la región CA y en la capa polimórfica del giro dentado, mientras que la subunidad δ se expresa escasamente en neuronas aisladas en el giro dentado (Zhang *et al.*, 1991; Wisden *et al.*, 1992; Fritschy y Moller, 1995). Respecto a la estequiometría se ha sugerido ensamblajes α 2/ β 2-3/ γ 2 en células piramidales y en las células granulares del giro dentado. La combinación α 5/ β 2-3/ γ 2 ha sido reportada en las células piramidales; mientras que el arreglo α 1/ β 2-3/ γ 2/ δ se localiza en interneuronas hipocámpales.

Giro dentado

Como se mencionó, el giro dentado está constituido por tres capas: la capa molecular, capa de células granulares y la capa de células polimórficas que en ocasiones es referida con los términos de hilus (Witter y Amaral, 2004). Respecto a su citología, la capa de células granulares está integrada por somas elípticas con un ancho de 10 μ m y una altura de 16 μ m. Cada célula granular está asociada cercanamente a otras células granulares y en la mayoría de los casos no están envueltas de células gliales. Estas células

tienen árboles dendríticos muy característicos con forma de cono los cuales se dirigen hacia la porción superficial de la capa molecular; mientras que en lo profundo de esta capa granular se encuentran las células en cesta que reciben este nombre debido a que los axones de estas células forman plexos pericelulares alrededor de las células granulares. El soma de estas células es de forma piramidal con un diámetro de 25-35 μ m, la mayoría de estas células son GABAérgicas y además de contener a este neurotransmisor son inmunoreactivas a otras sustancias como las proteínas de unión a calcio. Dentro de la misma región subgranular que ocupan las células en cesta, se ubican otros diversos tipos de células con diversas formas en sus somas y configuración dendrítica, algunas de ellas son multipolares con dendritas no espinosas, mientras otras tienden a ser fusiformes con una distribución dendrítica similar. Estas células extienden sus axones dentro de la capa de células granulares o salen de esta estructura dirigiéndolos hacia la capa molecular (Freund y Buzsáki, 1996); parece que su función es la de modular la actividad de las células granulares.

Por otra parte la capa molecular está principalmente ocupada por dendritas de las células granulares, en cesta y diversos tipos de células polimórficas. Sin embargo, algunos tipos de células neuronales también están presentes en la capa molecular tales como las células multipolares o de soma triangular de los cuales surgen axones que parecen contribuir a la formación de la canasta en la capa de células granulares. Estas neuronas son positivas para el péptido vasoactivo intestinal y tienen dendritas no espinosas que permanecen principalmente dentro de la capa molecular. Un segundo tipo de célula ha sido localizado en la capa molecular del giro dentado que se asemeja a la llamada “araña” o célula axoaxónica la cual se caracteriza porque su axón desciende desde la capa molecular hasta la capa de células granulares, donde colateraliza de manera extensiva y termina exclusivamente dentro de los segmentos iniciales de los axones de las células granulares. Respecto a sus árboles dendríticos, estos generalmente se expanden a lo ancho de la capa molecular y las dendritas basales no están bien desarrolladas o están ausentes. Estas células son inmunorreactivas al GABA, la GAD y la parvoalbumina; además poseen sinapsis simétricas. Un tercer tipo de célula ha sido nombrada célula de la capa

molecular asociada a la vía perforante debido a la distribución de su axón (Witter y Amaral, 2004).

Por otra parte la capa de células polimórficas contiene una variedad de células de las cuales se tiene poco conocimiento. El tipo celular más común es la célula musgosa que tiene soma piramidal de 25 a 35 μ m de diámetro, sus dendritas se extienden dentro de la capa polimórfica, aunque ocasionalmente pueden extenderse hasta la capa granular o molecular. La principal característica de estas células es que todas las dendritas proximales están cubiertas de un complejo espinoso denominado “excrecencia espinosa” que es un sitio de unión de axones de las fibras musgosas (Frostcher *et al.*, 1991; Ribak *et al.*, 1985); mientras que las dendritas distales son menos densas. Otro tipo celular en la capa de células polimórficas es la de tipo fusiforme, que forma un pequeño grupo de células con somas de tipo redondeado con dendritas no espinosas y axones locales aunque se ha reportado que en algunas ocasiones sus axones pueden proyectar dentro del hipocampo propio o en el subiculum (Sik *et al.*, 1997). También células “araña” han sido descritas como células con árboles dendríticos dentro de la capa polimórfica que pueden recibir señales de las fibras musgosas. Los axones de estas células terminan en los segmentos iniciales de las células musgosas (Martínez *et al.*, 1996).

Hipocampo propio

El hipocampo propio es una estructura curvada que aparenta formar los cuernos de un carnero, por ello recibe el nombre latino de *cornu ammonis* (CA) (Vida, 2010); que a su vez está subdividida en tres áreas CA1, CA2 y CA3, las cuales a su vez están subdivididas en diferentes subcapas, por ejemplo el área CA3 se divide en el *stratum lucidum*, *stratum radiatum* y el *stratum lacunosum-moleculare*. Mientras que la división de las áreas CA2 y CA1 es similar a la del área CA3, con la excepción que el *stratum lucidum* está ausente. La organización laminar es similar en todos los campos del hipocampo propio. La capa principal es la de células piramidales, por debajo de ella se localiza el *stratum oriens* que relativamente carece de células; sin embargo, en el área CA3 no así en CA2 ni en CA1, se localiza una zona acelular justo por arriba de la capa de células piramidales que está

ocupada por las fibras musgosas provenientes del giro dentado, esta capa es denominada *stratum lucidum*. Superficialmente al *stratum lucidum* en el área CA3 e inmediatamente por encima de la capa de células piramidales de las áreas CA2 y CA1 se localiza el *stratum radiatum* en la cual se localizan asociaciones de áreas CA3-CA3 y CA3-CA1 donde se encuentran las conexiones colaterales de Schaffer. Finalmente la porción más superficial del hipocampo propio es denominada *stratum lacunosum-moleculare*, en esta capa se localizan las fibras de la vía perforante provenientes de la corteza entorrinal y que se dirigen a diversas estructuras como el núcleo reuniens o la línea media del tálamo (Witter y Amaral, 2004).

A nivel citológico el hipocampo propio está constituido principalmente por células de tipo piramidal, las cuales se ubican de manera predominante en la capa de células piramidales, presentan árboles dendríticos que se extienden dentro del *stratum oriens* y en la fisura hipocampal; mientras que la cantidad de dendritas en el *stratum lacunosum-moleculare* provienen de las células piramidales localizadas en los límites del hilus y regiones distales de las áreas CA3 y CA2 (Ishizuka *et al.*, 1995). Adicionalmente en la capa de células piramidales se localiza una población heterogénea de células en cesta con diversos tamaños y formas, las cuales presentan dendritas de tipo apical y basal con pocas espinas o sin ellas. Los axones de estas células se extienden transversalmente desde el cuerpo celular y forma el plexo en cesta que inerva los cuerpos celulares de las células piramidales. A nivel neuroquímico se ha descrito que expresan de manera abundante GABA (Ribak *et al.*, 1978) y la mayoría se considera que forma un circuito local. Además, algunas de estas neuronas pueden ser identificadas mediante ensayos inmunohistoquímicos con anticuerpos que distinguen neuropéptidos (Morrison *et al.*, 1982), proteínas de unión a calcio como la parvalbumina, calbindina o calretinina, o ser caracterizadas por su distribución dendrítica y axonal (Freund y Buzsaki, 1996; Gulyas *et al.*, 1999). Las interneuronas del hipocampo propio son denominadas O-LM y neuronas biestratificadas. Las primeras tienen dendritas ubicadas en el *stratum oriens* y un axón que inerva el *stratum lacunosum-moleculare*; estas células generalmente contienen somatostatina y en algunas ocasiones neuropéptido Y. Dichas células forman sinapsis

asimétricas con las espinas de las dendritas de las células piramidales. Las neuronas bi-estratificadas se localizan en el *stratum radiatum* y en el *stratum oriens*, innervando las dendritas de las células piramidales. Otro tipo de interneurona que se encuentra en el *stratum pyramidale* o *stratum radiatum* proyecta sus axones hacia el *stratum radiatum* donde forman sinapsis simétricas con las dendritas de las células piramidales. Adicionalmente, todas las áreas del hipocampo tienen células en forma de araña con dendritas que corren en paralelo con las dendritas de las células piramidales (Witter y Amaral, 2004).

Subiculum

Referente al subiculum, la capa superficial es generalmente referida como capa molecular, algunas veces dividida en porción externa e interna, las dos capas restantes son denominadas como capa de células piramidales (*stratum pyramidale*) y el *stratum oriens* (Witter, 2010). El nivel citológico no ha sido descrito plenamente; sin embargo se tiene conocimiento de la presencia de células piramidales de forma y tamaño uniforme que extienden sus dendritas apicales dentro de la capa molecular, mientras que las dendritas basales lo hacen en la porción profunda de la capa de células piramidales del hipocampo propio. Se ha descrito también la presencia de interneuronas, población que se ubica entre las células piramidales de la región, dichas neuronas son GABAérgicas y son inmunorreactivas a la proteína de unión a calcio, parvalbumina (Witter y Amaral, 2004).

Planteamiento del problema

Como se refirió en los párrafos anteriores, el GABA es un neurotransmisor abundante tanto en el neocórtico como en la formación hipocámpal; esta abundancia está asociada a una alta diversidad en la expresión de subunidades del receptor GABA-A. Considerando por una parte que nuestro grupo de trabajo ha determinado la expresión de las s-GABA ρ en neuronas poligonales y fusiformes del núcleo caudado de la vaca (López-Chávez *et al.*, 2005; Rosas-Arellano *et al.*, 2007); y de los ARNm de GABA ρ 1 y ρ 2 en el neocórtico de ratón; en el presente trabajo proponemos determinar, como primera parte, la distribución

topográfica de ambas subunidades, la identidad de las neuronas que expresan a las s-GABA ρ ; además de esclarecer su localización sináptica o extra-sináptica.

Por otra parte, proponemos esclarecer si la identidad del componente tónico dependiente de GABA y sensible al TPMPA, que reportamos recientemente en la actividad sináptica espontánea en el hipocampo de ratón (Rosas-Arellano *et al.*, 2011); corresponde a la expresión de las subunidades GABA ρ , además de describir su localización tanto a nivel celular como subcelular.

Ambos apartados experimentales tienen la finalidad de describir la presencia y ubicación específica de este elemento inhibitorio que pudiese conferir inhibición tónica en estas estructuras.

Preguntas a contestar

- ¿Cuáles son las regiones donde se expresan las subunidades GABA ρ en el neocórtico e hipocampo de ratón?
- ¿Cuáles son los tipos neuronales neocorticales a nivel neuroquímico en los que se expresan GABA ρ 1 y ρ 2?
- ¿Las subunidades GABA ρ 1 y ρ 2 se localizan en regiones pre o post sinápticas en el neocórtico e hipocampo?
- ¿Según la localización como elementos pre o postsinápticos las subunidades GABA ρ 1 y ρ 2 se localizan en regiones extra, peri o sinápticas en el neocórtico e hipocampo?

Hipótesis

Las subunidades GABA ρ 1 y ρ 2 se expresan en el neocórtico e hipocampo de ratón, en ambas estructuras debido a sus propiedades funcionales especiales como alta sensibilidad por el GABA y mayores tiempos de apertura de canal, estas deben expresarse en baja abundancia y se les podrá localizar principalmente en regiones extrasinápticas donde pueden involucrarse en actividades estratégicas relacionadas con la actividad tónica inhibitoria.

Objetivos

General

Determinar la expresión y localización de las subunidades GABA ρ 1 y ρ 2 en el neocóstriado e hipocampo de ratón.

Particulares

- Determinar mediante hibridación *in situ* la expresión y distribución del ARNm de GABA ρ 1 y ρ 2 en el neocóstriado e hipocampo.
- Determinar la expresión mediante análisis de Western blot en el neocóstriado e hipocampo.
- Identificar la distribución espacial de las subunidades en el neocóstriado e hipocampo mediante análisis de inmunohistoquímica.
- Identificar mediante doble inmuno-flourescencia la identidad neuroquímica de las neuronas que expresan una o ambas subunidades en el neocóstriado.
- Identificar por microscopía electrónica de transmisión acoplado al uso de inmuno-oro, la localización sináptica de las subunidades ρ 1 y ρ 2 en el neocóstriado e hipocampo.

Estrategias y métodos

Hibridación *in situ* (Síntesis de sondas de ARN)

Los fragmentos del ADNc de GABA ρ 1 y ρ 2 usados como sondas para hibridación *in situ* fueron aislados mediante RT-PCR, usando ARN aislado de retina (Tabla 2). Los ADNc fueron clonados dentro del plásmido pGEM-T-Easy (Promega) y posteriormente secuenciados. La transcripción *in vitro* fue realizada incluyendo digoxigenina-11-UTPs en la reacción, siguiendo las especificaciones descritas por el fabricante (Invitrogen, Roche).

Tabla 2

Gen	<i>Forward primers</i>	<i>Reverse primers</i>	Tamaño	Región
<i>gabrr1</i>	5'-gtgtcctacatcaaagctgtgg-3'	5'-tatgggcctgtgggctcaatgc-3'	819pb	Segmentos TM3 y TM4
<i>gabrr2</i>	5'-ttacagcctctcagagaagcgc-3'	5'-ttcaccagccggccatcaaagg-3'	514pb	Región no codificante 5'

Hibridación *in situ*

En el presente estudio se usaron ratones CD1 macho de 30g obtenidos del bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Los animales fueron anestesiados mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital, posteriormente fueron perfundidos vía intracardiaca con solución salina (0.9%), seguido de solución de fijación a base de paraformaldehído (PFA) al 4% diluido en buffer de fosfatos (PBS) a 0.1M. Una vez realizada la perfusión fue removido el cráneo y obtenido el cerebro completo y ojos, después de postfijar en la misma solución durante toda la noche a 4°C se crioprotegió con diferentes gradientes de sacarosa (10, 20 y 30%) a 4°C hasta que los cerebros precipitaron. Después, los cerebros y los ojos fueron colocados en medio para montaje (Tissue-Tek, Sakura) y colocados en una plataforma giratoria durante unos minutos para posteriormente ser embebidos en medio de montaje fresco y congelados a -80°C. Fueron obtenidos con un criostato (Leica cm3050s) cortes sagitales de 150 μ m del cerebro completo y oblicuos del ojo, estos fueron fijados con PFA al 4%, entonces los cortes fueron lavados con PBS-Tween20 0.1% (PBS-T20), deshidratados y rehidratados en diferentes

gradientes de metanol (25, 50, 75 y 100%), una vez lavados los cortes fueron aclarados con H₂O₂ al 6% en PBS-T20; después de lavar fueron tratados con proteinasa K (10 μ /ml en PBS-T20) y detenida la reacción con 3.5% de PFA y 0.2% de glutaraldehído diluidos en PBS-T20. Una vez lavados los cortes con PBS-T20 la prehibridación fue iniciada reemplazando el PBS-T20 con 4ml de buffer de hibridación (formamida desionizada al 50%, sodio más citrato de sodio [SSC] 5X a pH4.5, heparina a 50 μ g/ml, Tween-20 al 0.1%, ARN de levadura a 50 μ g/ml, ADN de esperma de salmón a 50 μ g/ml y agua), a 70°C. Seguido a esta incubación los cortes fueron hibridados durante 12h a 70°C con las sondas correspondientes a las subunidades GABA ρ 1 y ρ 2 (Tabla 2), diluidas en buffer de hibridación a concentración de 1 μ g/ml. Posterior a la hibridación se realizó el tratamiento posthibridación que comprendió lavados secuenciales con tres soluciones: 1. Solución de formamida 50%, SSC a pH 4.5 al 4X, dodecil sulfato de sodio al 1% y agua; 2. Solución de NaCl 0.5M, tris pH 7.5 10mM, Tween20 al 0.1% diluidos en agua y 3. Formamida al 50%, SSC a pH 4.5 2X y agua. Posterior a lavados con MABT (ácido maléico 0.1M, NaCl 150mM y Tween20 0.1%), se colocó solución de MABT, suero de cabra y anticuerpo que reconoce la porción Fab de la molécula de IgG (anti-Fab) en concentración de 1:3000, en esta solución se incubó durante toda la noche a 4°C., posterior a lavados con MABT se lavó con NTMT (NaCl 0.1M, tris pH 9.5, MgCl₂ 0.05M, tween 20 a 0.1% y agua) y se incubó con BM Purple (Roche) hasta obtener una reacción colorida. Finalmente, la reacción fue detenida con PBS y la muestras fueron fijadas con PFA 3.5% durante toda la noche a 4°C antes de su montaje en portaobjetos cargados (Daigger), y con resina Fluoromont G (SouthernBiotech, Electron Microscopy Sciences). La especificidad de las sondas se probó en cortes de retina de ratón, los resultados de esta hibridación *in situ* se muestran en el apéndice (Fig. A1).

Western Blot

Ratones CD1 de 30g fueron sacrificados de acuerdo a los protocolos aprobados por el comité de ética del Instituto de Neurobiología de la UNAM. Una vez obtenido el cerebro completo y oculares completos y disecada la regiones correspondiente al neocórtex e hipocampo, estas se homogenizaron en solución amortiguadora de glicina (Miledi *et al.*, 2002). Se centrifugaron los lisados celulares y se recuperó el sobrenadante, el cual fue

ultracentrifugado para obtener el sedimento que contenía proteínas embebidas en membranas plasmáticas, las cuales fueron resuspendidas en solución amortiguadora de glicina 5mM a pH 9.0. Posteriormente, se realizó la electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%; después de electrotransferir a membrana de nitrocelulosa, se realizó el bloqueo con una solución libre de proteínas animales (animal-free blocker de Vector Laboratories), durante 45min a temperatura ambiente. El paso siguiente fue la incubación con anticuerpos primarios (anti-GABA- ρ 1, antiGABA- ρ 2 o anti-actina [para detalles de anticuerpos ver tabla A1 y A2 del apartado de apéndice]), durante 36h a 4°C. Después de lavar, se colocó el anticuerpo secundario anticabra IgG conjugado con fosfatasa alcalina durante 4h a temperatura ambiente. Paralelamente, se utilizó una membrana como control donde se omitió la incubación con los anticuerpos primarios (control negativo). Una vez lavadas las membranas de nitrocelulosa, el revelado fue realizado con una mezcla comercial BCIP/NBT (Blue liquid substrate system for membranes of SIGMA), la reacción fue detenida con TBS 1X. Los resultados donde se observa la expresión de las subunidades GABA ρ 1 y ρ 2 en el hipocampo se muestran en el apéndice (Fig. A2).

Inmunofluorescencia y doble inmunofluorescencia

El tejido fue obtenido de dos cepas de ratones transgénicos BAC (*bacterial artificial chromosome*) macho de 30g que por separado expresaban la proteína verde fluorescente (GFP) acoplada al promotor de los receptores a dopamina D1 y D2 respectivamente (Gong *et al.*, 2003; Doig *et al.*, 2010), esta estrategia se abordó para determinar la posible expresión GABA ρ en neuronas de proyección. Por otra parte, para analizar la expresión en interneuronas se utilizaron ratones CD1 macho de 30g.

Ambas cepas de ratones fueron perfundidas de la siguiente manera: anestesiados con pentobarbital y perfundidos vía intracardíaca con PFA al 4% para posteriormente, fijar por inmersión durante toda la noche y crío-protector con diferentes gradientes de sacarosa (10, 20 y 30%). Se seccionaron de manera sagital a 30 μ m los cerebros, mientras que el globo ocular se procesó en corte oblicuo, después se colocaron sobre portaobjetos (Superfrost®) para ser almacenados a 4°C hasta su posterior uso.

Se lavó con PBS-T20 para proceder a eliminar sitios inespecíficos con: suero normal de burro (especie donde se generó el anticuerpo secundario), BSA, Tritón X-100 y Tween20 diluidos en PBS. Posteriormente, usando Dako Pen (Dako), se marcó un círculo alrededor del área del tejido a analizar. De manera inicial se realizó una prueba para los ratones transgénicos que consistió en incubar con anticuerpos para distinguir los marcadores de interneuronas (ver abajo), esto para confirmar la identidad de las neuronas *Drd1*-GFP y *Drd2*-GFP positivas (los resultados se muestran en la figura A3). Una vez realizado esto, para todos los ratones utilizados en el presente estudio se incubó a 4°C durante 36h con el primer anticuerpo primario (anti-GABA ρ 1, o anti-GABA ρ 2 [para información de anticuerpos ver tablas A1 y A2 en apéndice]) en dilución de 1:100 en PBS-T20 al 0.1% y timerosal al 0.05%. Posterior a tres lavados con PBS-T20 se incubó en dilución de 1:100 con el primer anticuerpo secundario conjugado con Alexa 594. En este paso finalizó la inmuno detección para los cortes de cerebro de ratones transgénicos, los cuales posterior a tres lavados fueron procesados como se indica en la parte final de la doble inmunofluorescencia.

Por otra parte la doble inmunolocalización continuó con la incubación durante toda la noche a 4°C con el segundo anticuerpo primario (anti-calretinina, o -colina acetiltransferasa, o -somatostatina, o -calbindina, o -parvoalbumina, o -GFAP). Posterior a tres lavados con PBS-T20, se incubó con el segundo anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488, esto durante 12 h a 4°C.

Paralelamente, se utilizaron portaobjetos con tejidos usados como control donde se omitió la incubación con los anticuerpos primarios para ambos ensayos. Finalmente, los tejidos fueron lavados tres ocasiones y contrateñidos con 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI), para ser deshidratados y montados en resina (Vectashield H-1000 de Vector Laboratories). Las muestras fueron observadas en el microscopio confocal LSM510 META, con longitudes de 488nm para la GFP y Alexa 488, 561nm para Alexa 594 y 750nm para DAPI. Con el fin de determinar la especificidad de los anticuerpos estos se utilizaron previamente para identificar a los receptores en áreas en donde anteriormente se ha

reportado su expresión (Figs. A4-6). Las imágenes fueron procesadas con el programa AimImageExaminer y la población celular fue cuantificada mediante el programa NIH/ImageJ analysis.

Inmuno-oro

Los ratones CD1 fueron anestesiados y perfundidos como se describe en el apartado anterior. La solución de lavado fue constituida con NaCl 155mM, KCl 2mM, NaH₂PO₄ 3.4mM, CaCl₂ 2mM, MgCl₂ 1mM, HEPES 30mM y 0.08g/100ml de heparina a pH7.4; posterior a ello se perfundió con solución fijadora que contenía HEPES 10mM, CaCl₂ 2mM, NaCl 120mM, PFA 4% y glutaraldehído 0.5%. Posteriormente se dejó impregnar la solución de perfusión durante 20min, para después proseguir con la extracción del cerebro, el cual fue postfijado durante toda la noche en solución fresca de fijación referida anteriormente. Al siguiente día las áreas correspondientes al neocórtico dorsal e hipocampo fueron cuidadosamente disecadas y postfijadas mediante inmersión en solución de fijación fresca. Los tejidos fueron cortados en pequeñas secciones de aproximadamente 1mm² y después de fijar durante 1h se lavó en buffer de cacodilato de sodio al 0.1M a pH 7.0 y se deshidrató en etanol al 70, 96 y 100% para infiltrar en cuatro cambios de London Resin White (LR White, Polysciences Inc); una vez infiltrado el tejido se colocaron piezas individuales en cápsulas de gelatina y se realizó el embebido en la misma resina para polimerizarse mediante un tratamiento térmico de 60°C durante 24h. Mediante el uso de un ultramicrotomo (MRC-MTXL) la obtención de cortes fue realizada a 500nm con navaja de vidrio y de 60nm con una navaja de punta de diamante. Una vez colocados los cortes en rejillas de nickel recubiertas con formvar (IACSA), fue realizada la inmunodetección. Después de lavar con agua y PBS, las muestras fueron incubadas en glicina al 0.5M en PBS, entonces las muestras fueron lavadas nuevamente para proseguir a eliminar los sitios inespecíficos con suero de conejo 2% que además contenía BSA, Tritón X-100 y Tween20 diluidos en PBS, posteriormente se incubó con anticuerpos primarios en concentración de 1:100 para determinar la presencia de las s-GABA ρ 1 y ρ 2 en el neocórtico. Paralelamente se realizó un doble inmuno-oro en el cual se utilizó BSA, Tritón X-100 y Tween20 diluidos

en PBS como solución de bloqueo y los anticuerpos anti-GABA ρ 1 generado en conejo y anti-GABA ρ 2 generado en cabra. Después de 36h se lavó con PBS y se incubó con anticuerpos secundarios, conejo anti cabra conjugado con oro coloidal de 10nm para los anticuerpos generados en cabra y con anticuerpo cabra anti conejo conjugado con oro coloidal de 20nm para el anticuerpo generado en conejo, ambos en concentración de 1:200 durante 2h a 37°C. Finalmente las muestras fueron contrastadas con acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo al 2%; lavadas y observadas en un microscopio electrónico (JEOL JEM 1010). Los resultados del doble inmuno-oro se muestran en la figura A7.

RESULTADOS

Resultado de la presente tesis obtuvimos las siguientes publicaciones:

- **Abraham Rosas-Arellano**, Arturo I. Machuca-Parra, Daniel Reyes-Haro, Ricardo Miledi, Ataúlfo Martínez-Torres. *Expression of GABA ρ receptors in the neostriatum: localization in aspiny, medium spiny neurons and GFAP-positive cells*. Journal of Neurochemistry. Aceptado.

La transmisión GABAérgica en el neostriado tiene una función central en la coordinación motora, en la cual los receptores GABA-A se combinan para la inhibición neuronal. Los receptores GABA ρ son expresados en el neostriado; en el estudio mostramos que se encuentran en todas aquellas interneuronas que expresan calretinina y en una subpoblación de células que expresan calbindina. Adicionalmente, mostramos que una población de neuronas medianas espinosas que expresan receptores D2 de dopamina expresan la subunidad GABA ρ 2. También mostramos que GABA ρ 1 y ρ 2 pueden contribuir a la gliotransmisión debido a que un 30% de células positivas a la proteína gliofibrilar ácida (GFAP), expresan a los receptores. Ensayos cuantitativos mediante qRT-PCR sugieren que los ARNm de estos receptores son expresados en menor proporción en el neostriado respecto a la retina y que GABA ρ 2 en el neostriado es más abundante que GABA ρ 1. Además, análisis electrofisiológicos en cortes de cerebro mostraron evidencia de la presencia de receptores activados por el ácido 4-cis-aminocrotónico (CACA) y que fueron sensibles al ácido 1,2,5,6 tetrahidropiridin -4- metilfosfínico (TPMPA), características farmacológicas que indican las propiedades de los receptores GABA ρ . Finalmente, mediante microscopía electrónica de transmisión acoplado al uso de inmuno-oro, localizamos a los receptores principalmente en regiones perisinápticas así como en sitios extrasinápticos. Estas observaciones en conjunto sugieren la expresión funcional de las subunidades GABA ρ y que éstas pueden contribuir a la regulación inhibitoria, neuronal y glial.

Rosas-Arellano A, Parodi J, Machuca-Parra AI, Sánchez-Gutiérrez A, Inestrosa NC, Miledi R, Martínez-Torres A. 2011. The GABA(A) ρ receptors in hippocampal spontaneous activity and their distribution in hippocampus, amygdala and visual cortex. *Neurosci Lett.* **500**, 20-5.

Se mostró la existencia de un componente GABAérgico insensible a la bicuculina y sensible al TPMPA en la actividad espontánea de neuronas en cultivo y en cortes de hipocampo de ratón. Dicho componente GABAérgico mostró dos fases de inactivación: una lenta (sensible al TPMPA) y otra rápida (sensible a la bicuculina). Mediante ensayos de RT-PCR, hibridación *in situ* e inmunohistoquímica detectamos la presencia de las subunidades GABA ρ en neuronas de diversas estructuras del complejo hipocampal como lo son: el subiculum, el hipocampo propio y el giro dentado. Finalmente, la microscopía electrónica de transmisión acoplada al uso de inmuno-oro indicó que los receptores GABA ρ tienen una ubicación preferencialmente extrasináptica. Adicionalmente encontramos la expresión de los receptores en las áreas anteriores y posteriores de los núcleos basomedial y posteromedial cortical de la amígdala y en el área medio-medial y medio-lateral de la corteza visual secundaria de ratón. Si bien los receptores GABA ρ habían sido descritos ampliamente en el hipocampo, este estudio mostró evidencia de su participación en la actividad sináptica espontánea, así como su presencia en el subiculum, área CA2 del hipocampo, núcleos mediales amigdalinos y corteza visual secundaria, estructuras cerebrales donde no se había reportado su presencia anteriormente.

From: seanm6@u.washington.edu

To: ataulfo@unam.mx

CC: mconnell@u.washington.edu

Subject: JNC-W-2011-0255.R3 Journal of Neurochemistry

Body: Re manuscript: JNC-W-2011-0255.R3

Title: Expression of GABA_A receptors in the neostriatum: localization in aspiny, medium spiny neurons and GFAP-positive cells

Dear Dr. Martinez-Torres,

Your revised manuscript has been re-reviewed and is now considered acceptable for publication.

Exclusive Licence (Copyright Assignment) Form – It is very important that you have read and signed an Exclusive Licence Form for your paper. If you have not yet done so, please print the Copyright Assignment Form out – it can be found by clicking the 'Instructions and Forms' button at the top right hand corner of the Manuscript Central screen – read, sign and post it immediately to the Editorial Office.

IMPORTANT: If you have not already uploaded your final word processing document for your manuscript text and your individual figures in either TIFF or EPS format, please send them to the editorial office on a CD or DVD as soon as possible to expedite preparation for production.

Seattle Editorial Office Mailing Address:

Margaret Connelly
Neurosurgery Dept.
Harborview Medical Center
325 Ninth Ave, Box 359924
Seattle, WA 98104
USA
Tel: 206-744-9310
mconnell@u.washington.edu

Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Website:
<http://www.adobe.com/prodindex/acrobat/main.html>

This will enable the file to be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Proofs will be posted if any problems are encountered in sending the PDF to your email address; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs.

Any future correspondence regarding this manuscript should be addressed to:

Patrick Baker, Production Editor, Blackwell Science Ltd.
101 George Street
Edinburgh EH2 3ES
United Kingdom
Tel: +44 0131 226 7232 Fax: +44 0131 226 3803
E-mail: jnc@wiley.com

Author material archive policy:

Please note that unless specifically requested, Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted one month after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the production editor as soon as possible if you have not yet done so.

On behalf of the ISN, I thank you for allowing us to examine your work.

Sincerely,

Dr. Sean Murphy
Chief Editor
Journal of Neurochemistry

Margaret Connelly, Editorial Coordinator
Email: mconnell@u.washington.edu
Phone: 206-744-9310
Fax: 206-744-9960

Date Sent: 02-Dec-2011



**Expression of GABA_A receptors in the neostriatum:
localization in aspiny, medium spiny neurons and GFAP-
positive cells**

Journal:	<i>Journal of Neurochemistry</i>
Manuscript ID:	JNC-W-2011-0255.R3
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Rosas-Arellano, Abraham; Instituto de Neurobiología, Neurobiología Molecular y Celular Machuca-Parra, Arturo; Instituto de Neurobiología, Neurobiología Molecular y Celular Reyes-Haro, Daniel; Instituto de Neurobiología, Neurobiología Molecular y Celular Miledi, Ricardo; Instituto de Neurobiología, Neurobiología Molecular y Celular Martínez-Torres, Ataúlfo; Instituto de Neurobiología UNAM, Neurobiología Molecular y Celular
Keywords:	bicuculline, CACA, TPMPA, medium spiny neurons, interneurons, glia
Area/Section:	Other

1
2
3 **Expression of GABAp receptors in the neostriatum: localization in aspiny, medium spiny**
4 **neurons and GFAP-positive cells**
5
6
7

8 Abraham Rosas-Arellano, Arturo I. Machuca-Parra, Daniel Reyes-Haro, Ricardo Miledi,
9 Ataúlfo Martínez-Torres*

10
11
12 *Corresponding author

13
14 ataulfo@unam.mx

15
16 Departamento de Neurobiología Celular y Molecular

17
18 Universidad Nacional Autónoma de México

19
20 Instituto de Neurobiología

21
22 Campus Juriquilla

23
24 Querétaro, QRO.

25
26 MEXICO 76230
27
28
29
30
31
32
33
34

35 **Key words:** medium spiny neurons, interneurons, calretinin, calbindin, TPMPA,
36 bicuculline, CACA, glia.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

GABAergic transmission in the neostriatum plays a central role in motor coordination, in which a plethora of GABA-A receptor subunits combine to coordinate neural inhibition. GABA_p receptors were originally described in the mammalian retina. These receptors possess special electrophysiological and pharmacological properties, forming a characteristic class of ionotropic receptors. In previous studies, we suggested that GABA_p receptors are expressed in the neostriatum, and in this report we show that they are indeed present in all the calretinin-positive interneurons of the neostriatum. In addition, they are located in calbindin-positive interneurons and projection neurons that express the Dopamine D2 receptor. GABA_p receptors were also located in 30% of the GFAP-positive cells, and may therefore also contribute to gliotransmission. qRT-PCR suggested that the mRNAs of this receptor do not express as much as in the retina, and that GABA_{p2} is more abundant than GABA_{p1}. Electrophysiological recordings in brain slices provided evidence of neurons expressing a CACA-activated, TPMPA-sensitive ionotropic GABA receptor, indicating the presence of functional GABA_p receptors in the neostriatum. Finally, electron-microscopy and immunogold located the receptors mainly in perisynaptic as well as in extrasynaptic sites. All these observations reinforce the importance of GABA_p receptors in the neostriatum and contribute to the diversity of inhibitory regulation in this area.

Abbreviations used

aCSF: artificial cerebrospinal fluid

Act: actin

CACA: cis-4-aminocrotonic acid

cc: corpus callosum

CNS: central nervous system

CPu: caudate putamen (neostriatum)

DAPI: 4', 6-Diamidino-2-phenylindole

Den: dendrite

Drd1-GFP: dopamine D1 receptor-green fluorescent protein coupled

Drd2-GFP: dopamine D2 receptor-green fluorescent protein coupled

GABA: γ -aminobutyric acid

GFAP: glial fibrillary protein

LV: lateral ventricle

M: mitochondria

MSNs: medium spiny neurons

qRT-PCR: quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction

TM: transmembrane domain(s)

TPMPA 1,2,5,6-tetrahydropyridine-4-yl methylphosphinic acid

Introduction

The neostriatum is considered the most important connection between the cortical input and the basal ganglia, and it has been associated with motor control, learning, and memory as well as with neurodegenerative disorders such as Parkinson's and Huntington's diseases (Kemp & Powell, 1971; Alexander & Crutcher, 1990; Doig *et al.*, 2010). Neurons in this area are functionally divided into two types: 1) medium spiny neurons (MSNs), which are the most abundant and 2) a small population of aspiny neurons (interneurons). Almost all of these neurons are GABAergic. However, the MSNs also synthesize neuropeptides, including substance P, dynorphin, and enkephalin (Kawaguchi, 1997). In addition, the MSNs express dopamine D1 and D2 receptors; whereas the neurons that express D1 receptors synthesize substance P and dynorphin, those that express D2 receptors express enkephalin (Gerfen *et al.*, 1990; Surmeier *et al.*, 1993).

The interneurons of the neostriatum are aspiny with short axons and are divided into four independent types (Kawaguchi, 1993; 1995; 1997b; Kubota and Kawaguchi, 1993): 1) those that express acetylcholine but not GABA (Zhou *et al.*, 2002); the other three interneuron types are GABAergic and express either: 2) parvalbumin (Kita *et al.*, 1990), 3) calretinin (Bennett and Bolam *et al.*, 1993; Rymar *et al.*, 2004), or 4) somatostatin, NADPH, neuropeptide Y, and calbindin (Bennett and Bolam *et al.*, 1993b). These four types are distinguished morphologically by their soma diameter and axon length.

1
2
3 The neostriatum shows strong expression of many types of ionotropic GABA
4
5 receptors including subunits $\alpha 1-5$, $\beta 2-3$, $\gamma 2$, and δ (Fritschy and Moller, 1995; Albrecht *et*
6
7 *al.*, 1997). GABA ρ receptor expression in the neostriatum was also demonstrated by
8
9 means of RT-PCR and immunohistochemistry (López-Chávez *et al.*, 2005; Rosas-Arellano *et*
10
11 *al.*, 2007). GABA ρ receptors possess special electrophysiological and pharmacological
12
13 properties that set them apart from other GABA $_A$ subunits: they desensitize very little
14
15 upon activation, are insensitive to bicuculline and baclofen (Polenzani *et al.*, 1991), and
16
17 are activated selectively by the specific agonist CACA and are antagonized by TPMPA
18
19 (Ragozzino *et al.*, 1996).
20
21
22
23
24
25

26 Despite the accumulated knowledge about GABA ρ receptors their specific function
27
28 in the central nervous system remains largely unknown. These receptors have been
29
30 located in the amygdala (Delaney *et al.*, 1999; Fujimura *et al.*, 2005; Flores-Gracia *et al.*,
31
32 2010; Rosas-Arellano *et al.*, 2011), in the mitral layer of the olfactory bulb (Chen *et al.*,
33
34 2007), Purkinje neurons of cerebellum (Albrecht *et al.*, 1997; Drew and Johnston; 1992;
35
36 Boue-Grabot *et al.*, 1998; Rozzo *et al.*, 2002; Mejía *et al.*, 2008; Harvey *et al.*, 2006); in the
37
38 gray layer of the superior colliculus (Wegelius *et al.*, 1998; Pasternack *et al.*, 1999;
39
40 Schmidt *et al.*, 2001; Frazao *et al.*, 2007; Born and Schmidt, 2008; Wahle and Schmidt,
41
42 2009), in the oval and pyramidal neurons of layers II-VI of the visual cortex (Wegelius *et*
43
44 *al.*, 1998; Wahle and Schmidt, 2009; Rosas-Arellano *et al.*, 2011); in the corpus callosum
45
46 (López-Chávez *et al.*, 2005); in brainstem and spinal cord (Johnston *et al.*, 1975; Wegelius
47
48 *et al.*, 1998; Rozzo *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2003; López-Chávez *et al.*, 2005; Milligan *et*
49
50 *al.*, 2004; Rosas-Arellano *et al.*, 2007; Frazao *et al.*, 2007). In addition, several reports
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 indicate that the pyramidal neurons of CA1-CA3 areas, dentate gyrus, and subiculum of
4
5 the hippocampus express GABA_A receptors (Strata and Cherubini *et al.*, 1994; Cherubini *et*
6
7 *al.*, 1998; Wegelius *et al.*, 1998; Didelon *et al.*, 2002; Rozzo *et al.*, 2002; Hartmann *et al.*,
8
9 2004; Alakuijala *et al.*, 2006; Rosas-Arellano *et al.*, 2011).

10
11
12
13 Our previous studies disclosed the presence of GABA_A in the neostriatum (López-
14
15 Chávez *et al.*, 2005; Rosas-Arellano *et al.*, 2007), and we have now studied their
16
17 distribution in this area. GABA_A receptors were found mainly in calretinin-positive
18
19 neurons, as well as in a population of calbindin- and *Drd2*-expressing neurons and in
20
21 GFAP-positive cells. In addition, recordings in brain slices provided evidence of neurons
22
23 expressing a CACA-activated, TPMPA-sensitive ionotropic GABA receptor, indicating the
24
25 presence of functional GABA_A receptors in the neostriatum. Finally, electron-microscopy
26
27 and immunogold located the receptors in extrasynaptic sites.
28
29
30
31
32
33

34 **Materials and Methods**

35
36
37 **Animals.** We used the following mouse strains: CD1, NMRI, and two transgenic strains
38
39 *Drd1*-GFP, *Drd2*-GFP. All the animals were handled in accordance with the guidelines of
40
41 the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals and
42
43 approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Universidad Nacional
44
45 Autónoma de México.
46
47
48

49
50 **RNA isolation and Real Time RT-PCR.** Total RNA was isolated with TRIzol[®] Reagent
51
52 (Invitrogen) from 100-300 mg of retinas or striatum of CD1 mice. RNA was reverse
53
54 transcribed into cDNA using the SuperScript[™] II RNase H⁻ Reverse Transcriptase
55
56
57
58
59
60

1
2
3 (Invitrogen). Expression levels of GABA ρ 1 and ρ 2 were determined and compared for
4
5 striatum and retina by means of qRT-PCR using The LightCyclerTM (Roche Diagnostics,
6
7 Indianapolis IN, USA). To determine the relationship between cycle number (Ct) and
8
9 expression of each GABA ρ mRNA, primers were calibrated by using serial dilutions of
10
11 cDNA. Data from three independently synthesized samples were collected, and
12
13 amplifications were carried out in duplicate. Reactions were performed with “Light Cycler
14
15 Fast Start DNA Master SYBR[®] Green I” using actin and tubulin as standard. Each reaction
16
17 included 5 μ l of sample cDNA, 2.5 mM MgCl₂, 250 μ M sense and antisense primers (Table
18
19 1, Supplementary information), 1 μ l of SYBR[®] Green Taq ReadyMixTM, and 2 μ l of water in
20
21 a total reaction volume of 10 μ l. Reaction conditions were 95°C for 10 min for one cycle
22
23 (hot start), followed by 40 cycles of 95°C for 10 s, 60°C for 10 s, and 72°C for 12 s. The qRT-
24
25 PCR results were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method and are illustrated as mean \pm SE. The
26
27 data were evaluated and their significance determined by one-way analysis of variance
28
29 (ANOVA) followed by the Tukey test for group comparison.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 ***In situ* hybridization (ISH).** Probes for ISH were isolated by RT-PCR (Table 2,
41
42 Supplementary information). The cDNAs were cloned into pGEM-T-Easy (Promega) and
43
44 sequenced. *In vitro* transcription was performed following the manufacturer’s instructions
45
46 using digoxigenin-11-UTPs (Invitrogen).
47
48
49
50

51 For this analysis, CD1 mice (25-30 g) were anesthetized with pentobarbital and perfused
52
53 transcardially with saline (0.9% NaCl) and fixative solutions (4% paraformaldehyde in 0.1
54
55 M phosphate buffer). Then, the brain and ocular globes were removed and postfixed, and
56
57
58
59
60

1
2
3 150 μm slices of retina and 100 μm slices of whole brain were obtained. Hybridization was
4
5 performed at 70°C using the method described by the manufacturer (Roche). The slices
6
7 were fixed, mounted on microslides (superfrost/Plus, Daigger) with Fluoromont G
8
9 mounting medium (SouthernBiotech, Electron Microscopy Sciences), and observed and
10
11 photographed in an Olympus BX60 microscope. Sense probes did not show any label and
12
13 the specificity of the ISH probes was confirmed in mouse retina (Not shown).
14
15
16
17

18
19 **Western blot and immunohistochemistry.** The specificity of the antibodies was tested by
20
21 Western blot (for a complete list of antibodies used in this study see Supplementary tables
22
23 3 and 4) and by their ability to locate the receptor in retina, cerebellum, and STC1 cells
24
25 (not shown). For Western blot, ocular globes and neostriatum of CD1 mice were
26
27 processed as previously reported (Miledi *et al.*, 2002). Proteins were resolved in a 12%
28
29 PAGE and anti-GABA ρ 1, anti- ρ 2 or anti-actin were probed against the nitrocellulose
30
31 membrane. Immunohistochemistry was based on our previous reports (Rosas-Arellano, *et*
32
33 *al.*, 2007, 2011). To assess the expression of GABA ρ in MSNs we used male mice (25-30 g)
34
35 of the BAC (bacterial artificial chromosome) transgenic mice strains *Drd1*-GFP and *Drd2*-
36
37 GFP that express GFP in neurons that present either D1 or D2 dopamine receptors (Gong
38
39 *et al.*, 2003; Doig *et al.*, 2010). 16 slices from 3 different brains of each strain were
40
41 processed for immunofluorescence. To determine expression of the receptor in
42
43 interneurons, 4 males of the CD1 strain were used for each marker making a total of 96
44
45 slices. Mice were perfused as described in the previous section, cryoprotected in sucrose
46
47 gradients, and 30 μm sagittal sections of whole brain were obtained in a cryostat (Leica
48
49 CM1850). Sections exposing the neostriatum in a lateral view were placed on slides
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 (Superfrost®/Plus by DAIGGER) and stored at 4°C until processing by immunofluorescence
4
5
6 or double immunofluorescence.
7

8 For immunofluorescence, the tissue was washed in PBS-Tween20, and the non-
9
10 specific sites were blocked with a solution containing 2% donkey serum. The sections were
11
12 incubated at 4°C in the primary antibody solution (anti-GABA_p1 or ρ 2 [supplementary
13
14 data Tables 3 and 4], 0.05% thimerosal, and 0.1% Tween20 in TBS), washed in PBS-
15
16 Tween20, and incubated at 4°C in the secondary antibody conjugated to Alexa 594.
17
18 Finally, the tissues were washed in PBS-Tween20 and treated as described at the end of
19
20 this section.
21
22
23
24

25 For double immunofluorescence, the primary antibodies included anti-GABA_p1
26
27 (from goat or from rabbit [for double localization GABA_p1/ ρ 2]), anti-GABA_p2 in
28
29 combination with anti-calretinin, anti-choline acetyltransferase, anti-somatostatin, anti-
30
31 calbindin, anti-parvoalbumin. After several experiments, we observed that some
32
33 processes labelled by the antibodies resembled those of astrocytes; thus, we performed
34
35 double immunofluorescence with GABA_p1 or GABA_p2 with goat IgG anti-glial fibrillary
36
37 protein (GFAP).
38
39
40
41
42

43 The tissue was counterstained with DAPI, dehydrated in alcohol gradients, and mounted
44
45 with Vectashield H-1000 (Vector Laboratories). For imaging we used a Zeiss LSM510 Meta
46
47 confocal microscope; 561 nm was used for excitation of Alexa 594, 488 nm for Alexa 488
48
49 and GFP, and 750 nm for DAPI.
50
51

52 For image quantitative analysis, the z-stack images (4 or 5 consecutive confocal sections of
53
54 512 x 512) were obtained every 5 μ m with stack size of X: 450 μ m and Y: 450 μ m and
55
56
57
58
59
60

1
2
3 processed in *Aim Image Examiner*. The population of cells labelled by the different
4
5 fluorescent probes was measured independently and contrasted with the number of DAPI
6
7 labelled nuclei for each confocal section. NIH/ImageJ analysis software was used for
8
9 quantifying simple and double immunolabeling and is reported at the total of
10
11 immunolabeling cells per nuclei labelled with DAPI. The statistical analysis was performed
12
13 as described previously by Griffiths and Lovick, 2005. The abundance and spatial
14
15 distribution of GABA_p1 and GABA_p2 in the neostriatum were determined by using one-
16
17 way ANOVA followed by Fisher's PLSD post hoc test. Differences were considered
18
19 significant at $p < 0.05$.
20
21
22
23
24
25
26

27 **Neostriatal brain slices preparation and electrophysiological recordings.** Slices were
28
29 prepared from 8- to 10-day-old NMR1 mice (Charles River) since neuron access and
30
31 identification for patch-clamp recording is easier than in older animals. Slices, artificial
32
33 cerebrospinal fluid (aCSF), internal solutions, and patch micropipettes were prepared and
34
35 used as previously described (Reyes-Haro *et al.*, 2010).
36
37
38

39 The neostriatum was recognized using light microscopy, and neurons in the dorsal area of
40
41 rostral coronal brain slices were recorded with the patch-clamp technique using the
42
43 whole-cell recording configuration (Hamill *et al.*, 1981). Current signals were amplified
44
45 with a triple EPC10 (HEKA), filtered at 3 kHz, sampled at 10 kHz, and recorded using the
46
47 TIDA software (5.19). Chemicals were obtained from Sigma-Aldrich or Tocris if not
48
49 otherwise indicated. Slices were superfused with oxygenated aCSF with 1 μ M TTX to
50
51 minimize the indirect effect of neuronal electrical activity. Likewise, 25 μ M CNQX, 50 μ M
52
53 D-APV, and 1 μ M strychnine were added to the aCSF to block ionotropic glutamate
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 receptors and glycine receptors. In general, the number of experiments (n) refers to the
4
5 number of GABA- or cis-aminocrotonic-acid (CACA) -evoked responses. A small
6
7 hyperpolarizing voltage command (10 mV) was given during the experiment to monitor
8
9 access resistance (5-20 Mohms). Access resistance was monitored continuously, and
10
11 experiments were abandoned if changes >20% were detected. No cell capacitance, series
12
13 resistance, or liquid junction potential compensations were made. Three to five puffs of
14
15 the agonist were applied as control responses on each recorded neuron and then applied
16
17 in the presence of the antagonist (TPMPA or bicuculline) that was added to the aCSF and
18
19 preincubated >1 min before agonist puffs. Statistical analysis was performed using
20
21 Origin7.0 software (Origin Laboratories). The results are expressed as mean \pm S.E.M. if not
22
23 otherwise stated. When experiments included a control and more than one test group,
24
25 data were statistically evaluated with the Tukey test. We used the Student's t -test to
26
27 compare two groups (control and test) within an experiment. P values < 0.05 were
28
29 considered significant.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 **Immunogold and electron microscopy.** This was performed as described previously (Mejía
41
42 *et al.*, 2008) with several modifications. Four animals were anesthetized as described
43
44 above, and perfused with 155 mM NaCl, 2 mM KCl, 3.4 mM NaH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 1 mM
45
46 MgCl₂, 30 mM HEPES, and 0.08 g/100 ml heparin sodium salt, pH 7.4. The fixative solution
47
48 contained 10 mM HEPES, 2 mM CaCl₂, 120 mM NaCl, 4% paraformaldehyde, and 0.5%
49
50 glutaraldehyde. After an impregnation lapse, careful dissection of the whole brain was
51
52 performed. After postfixing, the region corresponding to the neostriatum was carefully
53
54 dissected. The tissue was cut in two sections (dorsal and ventral regions); only the dorsal
55
56
57
58
59
60

1
2
3 region was placed again in fresh fixative solution. Then it was washed in 0.1 M sodium
4
5 cacodylate, pH7.0, with 2.5% sucrose; dehydrated in ethanol gradients, infiltrated in LR
6
7 white resin, and embedded for thermal curing in gelatin capsules. Finally, 500 nm slices
8
9 were obtained with a glass knife, and from them 60 nm slices were obtained in an
10
11 ultramicrotome (MRC-MTXL) using a diamond point knife; these sections were placed on
12
13 nickel grids covered with Formvar (by IACSA).
14
15
16

17
18 The samples were washed with deionized and distilled water and PBS, and then
19
20 incubated in 0.5 M glycine in PBS; non-specific sites were eliminated with 2% rabbit
21
22 serum, and antibody anti-GABA ρ 1 or anti-GABA ρ 2 was added. After rinsing in PBS, the
23
24 secondary antibody was added (anti-goat 10-nm gold conjugate). Finally the samples were
25
26 dyed with 2% uranyl acetate, placed on 2% lead citrate, rinsed, and observed under the
27
28 electron microscope (JEOL JEM 1010). For quantitative analysis, the number of nano gold
29
30 particles was determined with the NIH/ImageJ software, and statistically analyzed as
31
32 described previously by Gundersen *et al.*, 1998. Briefly, micrographs were taken of 4
33
34 brains of the dorsal neostriatum at 50,000X magnification, and the number of gold
35
36 particles determined in images digitally zoomed at 80,000 X. GABA ρ 1 and ρ 2
37
38 immunoreactivity was quantified in pre and postsynaptic regions and in extra, peri and
39
40 synaptic sites. To determine if differences exist in the number of gold particles labelling
41
42 each subunit, as well as their spatial distribution, the results were statistically evaluated
43
44 performing the non-parametric Kruskal-Wallis test and Mann–Whitney U as *post-hoc* test.
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

1
2
3 sections was analyzed in the axon terminals, dendritic processes and soma, applying the
4
5 same tests described above.
6
7

8 **3. Results.**

9
10 **GABA_A receptors in the mouse neostriatum.** Previous findings indicated the expression of
11
12 GABA_A receptors in the bovine caudate nucleus, and this prompted us to analyze in more
13
14 detail their expression pattern in the homologous and predominantly GABAergic structure
15
16 of the mouse (neostriatum). First, to ensure that in this species the expression of GABA_A is
17
18 preserved, we performed RT-PCR. This analysis detected the three GABA_A genes in RNA
19
20 isolated from retina (as control), whereas only GABA_A1 and ρ 2 were detected in the
21
22 neostriatum (Fig. 1A). qRT-PCR revealed that GABA_A mRNAs are not as strongly expressed
23
24 in the neostriatum as in retina, with levels of GABA_A mRNA in striatum < 10% of those
25
26 found in the retina (Fig 1B, and supplementary Fig. 1 and 2). Nevertheless, Western blots
27
28 revealed the presence of GABA_A1 and ρ 2 in extracts from neostriatum, and showed that
29
30 the receptors were indeed less abundant in the neostriatum than in the retina (Fig. 1C).
31
32
33
34
35
36
37
38
39

40 ***In situ* hybridization.** In order to obtain a detailed spatial expression pattern of the mRNAs
41
42 of GABA_A1 and ρ 2, *in situ* hybridization was performed in sagittal sections of the
43
44 neostriatum followed by histological analysis. The results indicate that they were
45
46 expressed sparsely in cells with soma of diameters close to 20 μ m (Fig. 2 A, B). Histological
47
48 analysis revealed the expression localized mostly to the dorso-caudal region, some was
49
50 found in rostral and ventral regions (*fundus striati*), and scarcely any in other regions (*i.e.*,
51
52 central regions) (not shown). It is interesting to indicate that we located the expression
53
54 concentrated mostly in cells with somas of $\leq 10 \mu$ m of diameter (Fig. 2 C-E, F-H).
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **Distribution in neostriatum.** Immunohistochemistry and immunofluorescence in slices of
4
5 CD1, transgenic *Drd1*, and *Drd2* mice revealed that the regional localization of the
6
7 receptor was consistent with that of their mRNAs. In photomicrographs of 450 x 450 μm
8
9 of 4 to 5 confocal sections the label of GABA ρ 2 was more abundant than GABA ρ 1 in
10
11 regions lateral to the midline (Figure 2 I-J): at 3.00 mm, GABA ρ 1 was present in 33.3%,
12
13 whereas GABA ρ 2 was found in 66.7% of the cells; at 2.28 mm, the relative amounts were
14
15 54.8% and 45.2%; at 1.44 mm, 32.3% and 67.7%; at 1.32 mm: 19.1% and 80.2%; finally at
16
17 0.84 mm, 32% and 68%, respectively (Fig. 2 I-J). Thus, the analysis of the distribution
18
19 suggests that GABA ρ 2 is more abundant than GABA ρ 1 in each plane analyzed except at
20
21 2.28mm (ANOVA and Fisher's PLSD $p < 0.05$).
22
23
24
25
26
27
28
29

30 In *Drd1*-GFP and *Drd2*-GFP and CD1 mice the interneurons were found to represent only
31
32 about 3.3% of the total cell population (848 versus 25,455 of DAPI signal), a number
33
34 similar to that previously determined for the rat neostriatum (Kawaguchi *et al.*, 1997),
35
36 whereas the vast majority corresponded to MSNs expressing either D1 or D2 receptors.
37
38 GABA ρ 2 was found only in a few MSNs that express *Drd2*-GFP (4.1%; Fig. 3A-C) and was
39
40 not detected in MSNs that express *Drd1*-GFP, in contrast GABA ρ 1 was not found in either
41
42 *Drd1*-GFP or *Drd2*-GFP neurons (not shown). That is to say, only a small population of
43
44 MSNs express exclusively GABA ρ 2.
45
46
47
48

49 In neurons, most of the label for GABA ρ 1 and ρ 2 was located in interneurons, and
50
51 especially in calretinin-positive cells, 100% of which showed positive label for GABA ρ 1 and
52
53 GABA ρ 2 (Figs. 3D-I). GABA ρ 1 was expressed in 8.7% and GABA ρ 2 in 36.7% of the
54
55 calbindin-immunoreactive cells (Figs. 3J-O), whereas the choline acetyltransferase-,
56
57
58
59
60

1
2
3 somatostatin- and parvalbumin-positive neurons merged with neither GABA ρ 1 nor ρ 2 (not
4
5 shown).
6

7
8 In all the slices we observed that the GABA ρ receptors were also found in cells with large
9
10 and numerous processes, similar in shape to astrocytes. Therefore, we performed a
11
12 double immunofluorescence with anti-GABA ρ 1/anti-GFAP and anti-GABA ρ 2/anti-GFAP.
13
14
15 The results showed that GABA ρ receptors are expressed in a considerable fraction of
16
17 GFAP-positive cells (33.9%, 791 versus 2,332 of DAPI signal; e.g. Fig. 4).
18
19

20
21
22 **Functional expression of GABA ρ .** Our results showed that GABA ρ 1 and ρ 2 subunits were
23
24 present in a subset of interneurons and in a small population of MSNs *Drd2*-GFP. To assess
25
26 if the receptors were functional in these cells, we recorded GABA responses from neurons
27
28 of the neostriatum *in situ*. Puffs of 10 μ M GABA generated currents with an amplitude of
29
30 756 ± 147 pA ($n = 37$). However, only a fraction of the neurons responded to 100 μ M
31
32 TPMPA (7 out of 18 neurons), which partially blocked the GABA-current (from 756 ± 147
33
34 to 421 ± 105 ; $n=19$; $p<0.01$) (Figure 5B and D); in contrast, the GABA-currents recorded in
35
36 the rest of the neurons (11 out of 18) were not significantly affected by TPMPA (from 603
37
38 ± 122 to 753 ± 140 ; $n=18$; $p=0.42$) (supplementary Fig. 3). We observed that the GABA
39
40 response was abolished when 200 μ M bicuculline was co-applied with 100 μ M TPMPA in
41
42 the aCSF ($n = 5$) (5C and D). We also tested CACA, a highly selective agonist of GABA ρ , and
43
44 found that 500 μ M CACA evoked currents with an amplitude of 134 ± 7 pA ($n = 8$) that
45
46 were reduced by 37% in the presence of 100 μ M TPMPA (2 out of 5 neurons; $p<0.05$)
47
48 (supplementary Fig. 4A and B). These results indicate that GABA ρ subunits are functionally
49
50 expressed and participate in the GABA-evoked currents.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Immunogold and electron microscopy.

To determine the synaptic distribution of GABA ρ in the neostriatum, we performed immunogold labeling and electron microscopy. Most label was found at extrasynaptic and perisynaptic sites, and little or nothing in the synaptic clefts (Fig. 6A-D). The GABA ρ 1 label was located as follows: 57.1% extrasynaptic, 33.3% perisynaptic, and 9.5% synaptic (an average of 4.5 of gold particles per 500nm²); for GABA ρ 2 the label was 54.1%, 43.7%, and 2.0%, respectively (an average of 13.2 of gold particles per 500nm²). The Mann–Whitney U test, two tails showed ($p < 0.05$) showed that GABA ρ 2 is more abundant than GABA ρ 1. In addition, when we compared the distribution of each subunit, the Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$) indicated differences in the distribution of the number of receptors along the three compartments observed (extra-, peri- or synaptic), and the non parametric *post-hoc* test (Mann–Whitney U test, two tails) showed that the distributions in extrasynaptic vs synaptic, and perisynaptic vs synaptic are different ($p < 0.05$). In total, only 1 out of ~50 postsynaptic densities was labelled for GABA ρ 1, GABA ρ 2, or both.

Finally, we performed double immunofluorescence and double immunogold analyses for GABA ρ 1/ ρ 2, in which we found that both subunits are co-expressed in the same cells, except for a few neurons that expressed only GABA ρ 2 (Fig. 6 F-H).

4. Discussion

The GABA ρ receptor has been found in several areas of the CNS (see introductory section) including the bovine caudate nucleus, where GABA ρ receptors were located in pyramidal and fusiform cells (López-Chávez *et al.*, 2005; Rosas-Arellano *et al.*, 2007). In the present

1
2
3 study we confirm and extend our previous reports; by means of RT-PCR, qRT-PCR, and
4
5
6 Western blot we determined that GABA_A receptors are expressed in the mouse
7
8 neostriatum. ISH and immunofluorescence analyses showed that neurons and glial cells in
9
10 rostral, dorsal, and ventral regions display the receptors. Additionally by means of
11
12 electrophysiology we demonstrated that GABA_A subunits are functional in the
13
14
15
16 neostriatum.

17
18 GABA_A receptors were found in all interneurons that express the calcium binding
19
20 protein, calretinin. Calretinin-expressing neurons constitute a small population of cells
21
22 distributed along the neostriatum, but that show a higher presence towards the rostral
23
24 regions; these cells have diameters between 9 and 17 μm , and their soma can be either
25
26 round, oval or fusiform (Bennet and Bolam, 1993). These characteristics are consistent
27
28 with the cells observed in this study to express GABA_A. The electrophysiological profile of
29
30 these neurons remains mostly unknown and thus, future molecular and functional studies
31
32 are required to determine the role of GABA_A in these interneurons.
33
34
35
36
37

38 We observed also that a small population of calbindin-positive cells express
39
40 GABA_A. These neurons are found mostly in ventral regions and have somas with
41
42 diameters of 10 to 20 μm , which fit well the description reported in the rat neostriatum
43
44 (Kawaguchi *et al*, 1997; Bennet and Bolam, 1993b). It was precisely in this region where
45
46 we detected a significant concentration of GABA_A positive cells containing calbindin, but
47
48 in contrast to calretinin positive cells, not all of the calbindin positive cells express GABA_A.
49
50
51 At least two classes of calbindin containing cells have been described: spiny and aspiny
52
53
54 neurons; further studies are needed to determine the identity and connectivity of the
55
56
57
58
59
60

1
2
3 GABA_p-calbindin subpopulation. Again, the role of GABA_p receptors in these cells remains
4
5 to be explored, but they may well confer tonic inhibition to these interneurons. In
6
7 addition, we observed expression of GABA_{p2} in a small population of MSNs that express
8
9 *Drd2*-GFP. We speculate that tonic inhibition of these projection neurons may be
10
11 mediated by GABA_p, suggesting an important role in selective signalling to the remaining
12
13
14
15
16 MSNs.

17
18 Glial cells are known to express GABA_A receptors both in culture and *in situ*,
19
20 including in Bergmann cells of the cerebellum, astrocytes of the spinal cord, optic nerve,
21
22 retina, hippocampus and pituitary gland (*i.e.* Berger *et al.*, 1992; Müller *et al.*, 1994;
23
24 Verkhratsky and Steinhäuser, 2000), whereas GABA_{p2} receptors are known to be
25
26 expressed in cerebellar astrocytes in culture (Martínez-Delgado *et al.*, 2011). Here, we
27
28 report that both the GABA_{p1} and $\rho 2$ GABA subunits are expressed in a population of
29
30 GFAP-positive cells of the neostriatum; immunolabeling for GABA_p was identified mainly
31
32 in processes and in smaller proportion in somas. What is the role of this receptor in the
33
34 neostriatal glia? It may be that, similar to other GABA_A subunits expressed in astrocytes,
35
36 they modulate the release of neurotransmitter substances from glial cells and serve to
37
38 coordinate neuronal electrical activity in response to GABA release. The GABA_p receptors
39
40 may also be involved in the induction of morphological changes of the astrocytes, or in
41
42 stimulating dendrite development (Matusani *et al.*, 1997; 1998; Mong *et al.*, 2002).
43
44
45
46
47
48
49
50

51 The main special properties of GABA_p receptors are a high affinity for GABA, slow
52
53 desensitization, activation by CACA, blockage by TPMPA, and insensitivity to bicuculline,
54
55 which is a classic GABA_A antagonist (Polenzani *et al.*, 1991; Ragozzino *et al.*, 1996). While
56
57
58
59
60

1
2
3 recording from neurons in neostriatal slices, we observed some non-desensitizing GABA-
4
5 currents which were sensitive to TPMPA, and CACA-activated currents that were also
6
7 blocked by TPMPA. In some electrophysiological assays of CACA-currents, we recorded a
8
9 small component that was TPMPA -insensitive. We presume that this current is due to the
10
11 presence of receptors made up of both GABA ρ subunits assembled independently or in
12
13 combination with GABA $_A$ subunits, forming heteromeric complexes with mixed
14
15 pharmacology (Pan *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2004; Milligan *et al.*, 2004; Harvey *et al.*,
16
17 2006; Frazao *et al.*, 2007). However, this needs to be investigated further by a more
18
19 elaborated pharmacological analysis in combination with subunit selective co-
20
21 immunoprecipitation.
22
23
24
25
26
27

28 GABA ρ 1 is found alone or in hetero-oligomeric complexes with GABA $_A$ α 1 in rat
29
30 brainstem, where the receptor is found extrasynaptically in the postsynaptic region,
31
32 (Milligan *et al.*, 2004). In the rat retina GABA ρ 1 receptors have been found in both
33
34 postsynaptic and extrasynaptic regions (Koulen *et al.*, 1997) and extrasynaptic in the
35
36 presynaptic region of Purkinje neurons of cerebellum (Mejía *et al.*, 2008). However, the
37
38 specific localization of GABA ρ 2 remains largely unknown. In the present study we show
39
40 that this subunit is relatively more abundant than GABA ρ 1 both in pre- as well as
41
42 postsynaptic regions, and both subunits are located in the same places (extra- and
43
44 perisynaptic, but little or none in synaptic regions). Thus, due mostly to the perisynaptic
45
46 location of GABA ρ receptors as well as to their peculiar functional properties, it may be
47
48 suggested that they play a central role during tonic inhibition. Tonic inhibition mediated
49
50 by extrasynaptic GABA $_A$ subunits, such as those that include the α 5, β 3 and δ subunits,
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 permits cells to sense the environmental levels and spillover of GABA released from
4
5 synapses, and could protect or reduce excitotoxic injury and cell death through a
6
7 persistent inhibition, allowing the regulation of neural network excitability and
8
9 information processing (Barnard *et al.*, 1998; Pirker *et al.*, 2000; Schwarzer *et al.*, 2001;
10
11 Ade *et al.*, 2008; Santhakumar *et al.*, 2010; Janssen *et al.*, 2011).
12
13
14
15
16
17

18 **Concluding remarks**

19
20 The present results show that GABA_A receptors are functional in the mouse neostriatum
21
22 and suggest that calretinin-positive, calbindin-positive, and Drd2 neurons as well as GFAP-
23
24 positive cells express GABA_A receptors. These receptors are sparsely distributed, but with
25
26 some preference for the rostral, ventral and dorsal regions. Inferences about their role in
27
28 the neostriatum are supported merely by their known electrophysiological properties;
29
30 however, we localized the population of cells that possess the receptor, thus providing the
31
32 basis for further functional characterization.
33
34
35
36
37
38
39

40 **ACKNOWLEDGMENTS**

41
42 We thank A.E. Espino Saldaña, E.Ruiz Alcívar, and I. Martínez-Dávila for their excellent
43
44 technical assistance. M.L. Palma Tirado and E.N. Hernández Ríos provided support in
45
46 electron and confocal microscopy, and A. Antaramian and A. Sánchez for DNA sequencing.
47
48 Transgenic mice were donated by Dr. V. Álvarez (NIH/NIAAA). A. Sánchez-Gutiérrez
49
50 provided *in situ* hybridization support. We are indebted to Dr. R. Gutiérrez (CINVESTAV)
51
52 and Dr. R. Arellano-Ostoa (INB-UNAM) for recommendations that contributed to this
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 study; to Dr. A. Cárabaz-Trejo, Dr. A. Varela-Echavarría, Dr. J. Larriva-Sahd (INB-UNAM),
4
5
6 and members of their laboratories for the facilities and suggestions; to Dr. J. Heuser
7
8 (Washington University, Saint Louis MO) for advice on immunogold techniques; and to Dr.
9
10
11 H. Kettenmann (Max Delbrück Center, Berlin, Germany) for the facilities to perform the
12
13 electrophysiological recordings. The authors thank Dr. D.D. Pless (INB-UNAM) for editing
14
15 the manuscript. This work was supported by grants from PAPIIT-UNAM 202609-21 and
16
17 205308-21 (AM-T and RM), and CONACYT 101851 (AM-T). AR-A (189290) and AIM-P
18
19 (210374) are recipients of fellowships from CONACYT-México. We thank the INB-UNAM,
20
21 and Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas. AM-T acknowledges support from
22
23 the A. & W. Shedid Fund.
24
25
26
27
28
29

30 References

- 31
32 1. Ade KK, Janssen MJ, Ortinski PI, Vicini S. 2008. Differential tonic GABA
33 conductances in striatal medium spiny neurons. *J Neurosci.* **28**, 1185-97.
- 34
35 2. Albrecht BE, Breitenbach U, Stühmer T, Harvey RJ, Darlison MG. 1997. In situ
36 hybridization and reverse transcription-polymerase chain reaction studies on the
37 expression of the GABA(C) receptor rho1- and rho2-subunit genes in avian and rat
38 brain. *Eur J Neurosci.* **9**, 2414-22.
- 39
40 3. Alakuijala A, Alakuijala J, Pasternack M. 2006. Evidence for a functional role of
41 GABA receptors in the rat mature hippocampus. *Eur J Neurosci.* **23**, 514-20.
- 42
43 4. Alexander GE, Crutcher MD. 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits:
44 neural substrates of parallel processing. *Trends in Neurosc* **13**, 266-271.
- 45
46 5. Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C,
47 Bateson AN, Langer SZ. 1998. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes
48 of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit
49 structure and receptor function. *Pharmacol Rev.* **50**, 291-313. Review.
- 50
51 6. Berger T, Walz, Schnitzer J, Kettenmann H. 1992. GABA- and glutamate-activated
52 currents in glial cells of the mouse corpus callosum slice. *J Neurosci Res.* **31**, 21-27.
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
7. Bennett BD, Bolam JP. 1993. Characterization of calretinin-immunoreactive structures in the striatum of the rat. *Brain Res.* **609**, 137-48.
8. Bennett BD, Bolam JP. 1993b. Two populations of calbindin D28k-immunoreactive neurones in the striatum of the rat. *Brain Res.* **610**,305-10.
9. Born G, Schmidt M. 2008. A reciprocal connection between the ventral lateral geniculate nucleus and the pretectal nuclear complex and the superior colliculus: an in vitro characterization in the rat. *Vis Neurosci.* **25**, 39-51.
10. Boue-Grabot E, Roudbaraki M, Bascles L, Tramu G, Bloch B, Grte M. 1998. Expression of GABA receptor rho subunits in rat Brain. *J. Neurochem.* **70**, 899-907.
11. Chen Y, Zhou D, Zhou K, Ren Y, Dai W, Xu M, Lu L, Lu Z. 2007. Study on olfactory function in GABAC receptor/channel rho1 subunit knockout mice. *Neurosci Lett.* **427**, 10-5.
12. Cherubini E, Martina M, Sciancalepore M, Strata F. 1998. GABA excites immature CA3 pyramidal cells through bicuculline-sensitive and -insensitive chloride-dependent receptors. *Perspect Dev Neurobiol.* **5**, 289-304.
13. Delaney AJ, Sah P. 1999. GABA receptors inhibited by benzodiazepines mediate fast inhibitory transmission in the central amygdala. *J Neurosci.* **19**, 9698-704.
14. Didelon F, Sciancalepore M, Savic' N, Mladinic' M, Bradbury A, Cherubini E. 2002. gamma-Aminobutyric acidA rho receptor subunits in the developing rat hippocampus. *J Neurosci Res.* **67**, 739-44.
15. Doig NM, Moss J, Bolam JP. 2010. Cortical and Thalamic Innervation of Direct and Indirect Pathway Medium-Sized Spiny Neurons in Mouse Striatum. *The Journal of Neuroscience*, **30**, 14610 –18.
16. Drew CA, Johnston GA. 1992. Bicuculline- and baclofen-insensitive gamma-aminobutyric acid binding to rat cerebellar membranes. *J Neurochem.* **58**, 1087-92.
17. Flores-Gracia C, Nuche-Bricaire A, Crespo-Ramírez M, Miledi R, Fuxe K, Pérez de la Mora M. 2010. GABA(A) ρ receptor mechanisms in the rat amygdala and its role in the modulation of fear and anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*. **212**, 475-84.
18. Frazao R, Nogueira MI, Wässle. 2007. Colocalization of synaptic GABAC-receptors with GABAA-receptors and glycine-receptors in the rodent central nervous system. *Cell. Tiss. Res.* **330**, 1-15.

- 1
2
3 19. Fritschy JM, Mohler H. 1995. GABAA-Receptor Heterogeneity in the Adult Rat
4 Brain: Differential Regional and Cellular Distribution of Seven Major Subunits. The
5 journal of comparative neurology. **359**, 154-194.
6
7
- 8 20. Fujimura J, Nagano M, Suzuki H. 2005. Differential expression of GABA(A) receptor
9 subunits in the distinct nuclei of the rat amygdala. Brain Res Mol Brain Res. **2138**,
10 17-23.
11
12
- 13 21. Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ Jr, Sibley DR.
14 1990. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and
15 striatopallidal neurons. Science. **250**, 1429-32.
16
17
- 18 22. Gong S, Zheng C, Doughty ML, Losos K, Didkovsky N, Schambra UB, Nowak NJ,
19 Joyner A, Leblanc G, Hatten ME, Heintz N.A. 2003. Gene expression atlas of the
20 central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. Nature. **425**,
21 917-25.
22
23
- 24 23. Griffiths JL, Lovick TA. 2005. GABAergic neurones in the rat periaqueductal grey
25 matter express alpha4, beta1 and delta GABAA receptor subunits: plasticity of
26 expression during the estrous cycle. Neuroscience. **136**, 457-66.
27
28
- 29 24. Gundersen V, Chaudhry FA, Bjaalie JG, Fonnum F, Ottersen OP, Storm-Mathisen J.
30 1998. Synaptic vesicular localization and exocytosis of L-aspartate in excitatory
31 nerve terminals: a quantitative immunogold analysis in rat hippocampus. J
32 Neurosci. **18**, 6059-70.
33
34
- 35 25. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. 1981. Improved patch-clamp
36 techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free
37 membrane patches. Pflugers Arch. **391**, 85-100.
38
39
- 40 26. Hartmann K, Stief F, Draguhn A, Frahm C. 2004. Ionotropic GABA receptors with
41 mixed pharmacological properties of GABAA and GABAC receptors. Eur J
42 Pharmacol. **2**, 139-46.
43
44
- 45 27. Harvey VL, Duguid IC, Krasel C, Stephens GJ. 2006. Evidence that GABA rho
46 subunits contribute to functional ionotropic GABA receptors in mouse cerebellar
47 Purkinje cells. J Physiol. **577**, 127-39.
48
49
- 50 28. Janssen MJ, Yasuda RP, Vicini S. 2011. GABA_A Receptor β 3 Subunit Expression
51 Regulates Tonic Current in Developing Striatopallidal Medium Spiny Neurons. Front
52 Cell Neurosci. 5:15.
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
29. Johnston GA, Curtis DR, Beart PM, Game CJ, McCulloch RM y Twitchin B. 1975. Cis- and trans-4-aminocrotonic acid as GABA analogues of restricted conformation. *J Neurochem.* **24**,157-60.
 30. Kawaguchi Y. 1993. Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J Neurosci.* **13**, 4908-23.
 31. Kawaguchi Y, Wilson ChJ, Augood SJ, Emson PC. 1995. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *TINS.* **18**, 527-535.
 32. Kawaguchi Y. 1997. Neostriatal cell subtypes and their functional roles. *Neurosci Res.* **27**, 1-8. Review.
 33. Kawaguchi Y, Aosaki T, Kubota Y. 1997b. Cholinergic and GABAergic interneurons in the striatum. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi.* **17**, 87-90.
 34. Kemp JM, Powell TP. 1971. The connexions of the striatum and globus pallidus: synthesis and speculation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* **262**, 441-57.
 35. Kita H, Kosaka T, Heizmann CW. 1990. Parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat neostriatum: a light and electron microscopic study. *Brain Res.* 536, 1-15.
 36. Koulen P, Brandstätter JH, Kröger S, Enz R, Bormann J, Wässle H. 1997. Immunocytochemical localization of the GABA(C) receptor rho subunits in the cat, goldfish, and chicken retina. *J Comp Neurol.* **380**, 520-32.
 37. Kubota Y, Kawaguchi Y. 1993. Spatial distributions of chemically identified intrinsic neurons in relation to patch and matrix compartments of rat neostriatum. *J Comp Neurol.* **4**, 499-513.
 38. López-Chávez A, Miledi R, 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.
 39. Martínez-Delgado G, Reyes-Haro D, E. Espino-Saldaña A, Rosas-Arellano A, Pétriz A, A Juárez-Mercado AP, Miledi R, Martínez-Torres A. 2011. Dynamics of GABA $\rho 2$ receptors in retinal bipolar neurons and cerebellar astrocytes. *Neuroreport.* **22**, 4-9.
 40. Matsutani S, Yamamoto N. 1997. Neuronal regulation of astrocyte morphology in vitro is mediated by GABAergic signaling. *Glia.* **20**, 1-9.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
41. Matsutani S, Yamamoto N. 1998. GABAergic neuron-to-astrocyte signaling regulates dendritic branching in coculture. *J Neurobiol.* **37**, 251-64.
 42. Mejía C, García-Alcocer G, Berumen LC, Rosas-Arellano A, Miledi R, Martínez-Torres A. 2008. Expression of GABA ρ subunits during rat cerebellum development. *Neurosci Lett.* **432**, 1-6.
 43. Miledi R, Eusebi F, Martínez-Torres A, Palma E, Trettel F. 2002. Expression of functional neurotransmitter receptors in *Xenopus* oocytes after injection of human brain membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**, 13238-42.
 44. 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. *J. of Neurosci.* **24**, 7241-7250.
 45. Mong JA, Nuñez JL, McCarthy MM. 2002. GABA mediates steroid-induced astrocyte differentiation in the neonatal rat hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.* **14**, 45-55.
 46. Müller T, Fritschy JM, Grosche J, Pratt GD, Möhler H, Kettenmann H. 1994. Developmental regulation of voltage-gated K⁺ channel and GABA_A receptor expression in Bergmann glial cells. *J Neurosci.* **14**, 2503-14.
 47. Pan ZH, Zhang D, Zhang X, Lipton SA. 2000. Evidence for coassembly of mutant GABA ρ 1 with GABA γ 2S, glycine α 1 and glycine α 2 receptor subunits in vitro. *Eur J Neurosci.* **12**, 3137-45.
 48. Pasternack M, Boller M, Pau B, Schmidt M. 1999. GABA(A) and GABA(C) receptors have contrasting effects on excitability in superior colliculus. *J Neurophysiol.* **82**, 2020-3.
 49. Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G. 2000. GABA_A receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience.* **101**, 815-50.
 50. Polenzani L, Woodward RM, Miledi R. 1991. Expression of mammalian gamma-aminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci.* **88**, 4318-22.
 51. Ragozzino D, Woodward RM, Murata Y, Eusebi F, Overman LE, Miledi R. 1996. Design and in vitro pharmacology of a selective gamma-aminobutyric acid receptor antagonist. *Mol. Pharmacol.* **50**, 1024-30.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
52. Reyes-Haro D, Müller J, Boresch M, Pivneva T, Benedetti B, Scheller A, Nolte C, Kettenmann H. 2010. Neuron-astrocyte interactions in the medial nucleus of the trapezoid body. *J Gen Physiol.* **135**, 583-594.
53. Rosas-Arellano A, Ochoa-de la Paz LD, Miledi R, Martínez-Torres A. 2007. Brain distribution and molecular cloning of the bovine GABA p1 receptor. *Neurosci Res.* **57**, 347-53.
54. Rosas-Arellano A, Parodi J, Machuca-Parra AI, Sánchez-Gutiérrez A, Inestrosa NC, Miledi R, Martínez-Torres A. 2011. The GABA(A) ρ receptors in hippocampal spontaneous activity and their distribution in hippocampus, amygdala and visual cortex. *Neurosci. Lett.* [Epub ahead of print].
55. Rozzo A, Armellin M, Franzot J, Chiaruttini C, Nistri A, 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.
56. Rymar VV, Sasseville R, Luk KC, Sadikot AF. 2004. Neurogenesis and stereological morphometry of calretinin-immunoreactive GABAergic interneurons of the neostriatum. *J Comp Neurol.* **469**, 325-39.
57. Santhakumar V, Jones RT, Mody I. 2010. Developmental regulation and neuroprotective effects of striatal tonic GABAA currents. *Neurosci.* **167**, 644-55
58. Schmidt M, Boller M, Ozen G, Hall WC. 2001. Disinhibition in rat superior colliculus mediated by GABA_C receptors. *J Neurosci.* **21**, 691-9.
59. Strata F, Cherubini E. 1994. Transient expression of a novel type of GABA response in rat CA3 hippocampal neurones during development. *J Physiol.* **480**, 493-503.
60. Schwarzer C, Berresheim U, Pirker S, Wieselthaler A, Fuchs K, Sieghart W, Sperk G. 2001. Distribution of the major gamma-aminobutyric acid(A) receptor subunits in the basal ganglia and associated limbic brain areas of the adult rat. *J Comp Neurol.* **433**, 526-49.
61. Verkhratsky A, Steinhäuser C. 2000. Ion channels in glial cells. *Brain Res Rev.* **32**, 380-412.
62. Wahle P, Schmidt M. 2009. GABA(C) receptors are expressed in GABAergic and non-GABAergic neurons of the rat superior colliculus and visual cortex. *Exp Brain Res.* **199** 245-52.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
63. Wegelius K, Pasternack M, Hiltunen JO, Rivera C, Kaila K, Saarma M, Reeben M. 1998. Distribution of GABA receptor rho subunit transcripts in the rat brain. *Eur J Neurosci.* **10**, 350-7.
64. Zheng W, Xie W, Zhang J, Strong JA, Wang L, Yu L, Xu M, Lu L. 2003. Function of gamma-aminobutyric acid receptor/channel rho 1 subunits in spinal cord. *J Biol Chem.* **278**, 48321-9.
65. Zhou FM, Wilson CJ, Dani JA. 2002. Cholinergic interneuron characteristics and nicotinic properties in the striatum. *J Neurobiol.* **53**, 590-605.

Figure legends.

Figure 1. mRNA and protein expression of GABAp in neostriatum and retina. A. RT-PCR of retina (r) and neostriatum (ns). The synthesized cDNA products were mixed with the primers for actin (Act) and the three GABAp subunits. The PCR products were separated by agarose gel electrophoresis containing ethidium bromide and standard molecular weight markers to determine the fragment size. The PCR products of GABAp1, p2 and p3 were 174, 180 and 197bp respectively. The gel shows the expression of the three GABAp subunits in the retina and only GABAp1 and p2 in the neostriatum. **B.** qRT-PCR of GABAp1 and p2 subunits. Expression of GABAp1 and GABAp2 in the neostriatum corresponded to 1.2 and 4.6% of that found in the retina (Left). Data were analyzed by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method and expressed in percentage to the relative expression of each subunit in the retina. Bars represent the mean \pm SE of three independent experiments ($p < 0.05$). *** Significantly different from control group. **C.** Shows a representative Western blot of extracts of neostriatum and retina, that distinguished the presence of GABAp1 and GABAp2 (~50kDa). Consistently, the expression of the receptors was more abundant in retina than in neostriatum. Abbreviations: C, control without cDNA; Act, actin.

1
2
3
4
5
6 **Figure 2 *In situ* hybridization and immunohistochemistry.** ISH analyses in sagittal sections
7
8 of the expression of **A.** GABAp1 and **B.** GABAp2. The arrows show the sparsely distributed
9
10 cells in the dorsal region of the neostriatum. **C-E** and **F-H** images showing cells (arrows)
11
12 and somas with diameters $\leq 10 \mu\text{m}$ (arrowheads). **I.** Diagrams of brain sagittal sections
13
14 showing the localization of GABAp distribution at several levels along the neostriatum.
15
16 Note that both subunits were located mainly in rostral, dorsal, and ventral regions, as
17
18 indicated in circles in light- and dark gray. Consistently the label was most abundant in
19
20 dorsal areas. **J.** Relative amounts of the two GABAp subunits as percent of the total along
21
22 five levels of the neostriatum, as indicated in the text and figure. Notice that GABAp2 is
23
24 more predominant except at 2.28mm. Numbers below the figures indicate the distance to
25
26 the brain midline. Scale bars: A and B = $100 \mu\text{m}$; C-E and F-H = $20 \mu\text{m}$. Abbreviations: cc,
27
28 corpus callosum; LV, lateral ventricle; CPu, caudate putamen (neostriatum).
29
30
31
32
33
34
35
36

37 **Figure 3. Expression of GABAp2 in *Drd2*-GFP mouse neurons and double-**
38
39 **immunolabeling of GABAp1 or GABAp2/calbindin- and calretinin- positive cells in**
40
41 **sagittal sections of neostriatum.** **A.** Representative immunofluorescence detection of
42
43 GABAp2-positive cells stained with Alexa 594 (red) in *Drd2*-GFP mice. **B.** *Drd2*-GFP-
44
45 positive cells (green). **C.** Merge, colocalization of GABAp2 in *Drd2*-GFP positive cells
46
47 (yellow); note that not all GABAp2-positive cells (arrows) are GFP positive, whereas
48
49 several D2-GFP-positive neurons express GABAp2 (arrowheads); nuclei were stained with
50
51 DAPI. **D-F.** Co-localization of calretinin (green) with GABAp1 and GABA p2 (red in **G-I**). In
52
53 this case, all of the calretinin-expressing cells were also positive for the receptors. Co-
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 localization of calbindin-positive cells immunolabeled with Alexa 488 (green) and GABAp1
4
5 (J-L) or GABAp2 (red label in M-O). Merge images (yellow in L and O) showed that not all
6
7 calbindin-positive cells are GABAp positive (arrowheads). Scale bars: 20 μm .
8
9

10
11
12
13 **Figure 4. GABAp receptors in GFAP-positive cells. A. and C.** Sagittal sections through the
14
15 neostriatum showed immunodetection of GABAp1 and $\rho 2$ (in red) in cells with large and
16
17 numerous processes. **B. and D.** Double immunofluorescence revealed that those cells
18
19 were also GFAP-positive, indicating that they are glial cells. Yellow indicate the merged
20
21 image of GABAp receptors and GFAP, nevertheless not all GFAP positive cells (green)
22
23 expressed GABAp. Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bars: 5 μm .
24
25
26
27
28
29
30
31

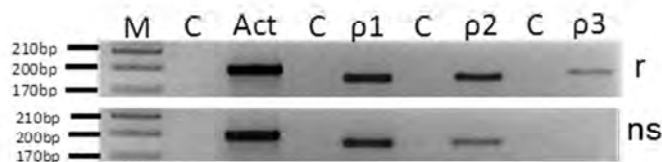
32 **Figure 5. Functional expression of GABAp in striatal neurons. A.** A representative
33
34 neostriatal neuron patched in a brain slice and filled with Alexa 594. **B.** GABA (10 μM)
35
36 mediated response was reduced when TPMPA (100 μM) was added to the aCSF (n= 19
37
38 GABA mediated responses in 7 neurons out of 18). **C.** GABA mediated responses were
39
40 abolished when TPMPA (100 μM) and bicuculline (200 μM) were added to the aCSF (n=5
41
42 responses from 5 neurons) **D.** Summary of experiments with GABA, GABA + TPMPA and
43
44 GABA + TPMPA + Bicuculline. Data are mean \pm S.E.M. Asterisks represent significant
45
46 differences: $P < 0.01$ (**) or $P < 0.001$ (***).
47
48
49
50
51

52 **Figure 6. Ultrastructural localization of GABAp. A-D.** GABAp1 (**A** and **C**) and $\rho 2$ (**B** and **D**)
53
54 were observed on the presynaptic and postsynaptic sides of asymmetric synapses
55
56 (arrows), arrowheads point to axon terminals. **E.** Schematic representation of the
57
58
59
60

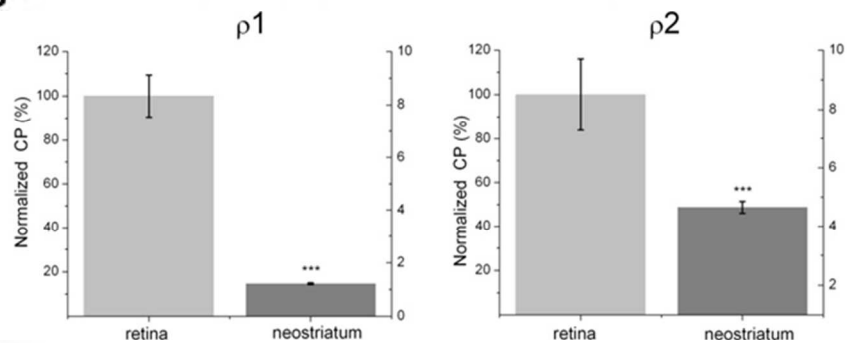
1
2
3 localization GABA ρ , illustrating that the receptors were found in extrasynaptic and
4
5
6 perisynaptic regions, and only in a few cases were detected at the synapse. **F-H**. Co-
7
8 localization of GABA ρ 1 and ρ 2. **F**. GABA ρ 1 stained with Alexa 488 (green) and **G**. GABA ρ 2
9
10 stained with Alexa 594 (red). **H**. Merge images showed the expression of both subunits
11
12 (arrows) in the same cells, whereas a few cells expressed only GABA ρ 2 (arrowhead).
13
14
15 Abbreviations: Den, dendrite; M, mitochondria; Nf, neurofilaments; E, extrasynaptic; S,
16
17 synaptic; P, perisynaptic. Scale bars: **A** and **B**, 200 nm. **C** and **D**, 100nm. **F-H**, 20 μ m.
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 1

A



B



C

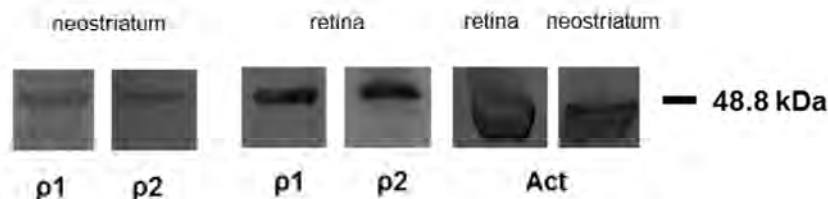


Figure 1. mRNA and protein expression of GABA ρ in neostriatum and retina. A. RT-PCR of retina (r) and neostriatum (ns). The synthesized cDNA products were mixed with the primers for actin (Act) and the three GABA ρ subunits. The PCR products were separated by agarose gel electrophoresis containing ethidium bromide and standard molecular weight markers to determine the fragment size. The PCR products of GABA ρ 1, ρ 2 and ρ 3 were 174, 180 and 197bp respectively. The gel shows the expression of the three GABA ρ subunits in the retina and only GABA ρ 1 and ρ 2 in the neostriatum. B. qRT-PCR of GABA ρ 1 and GABA ρ 2 subunits. Expression of GABA ρ 1 and GABA ρ 2 in the neostriatum corresponded to 1.2 and 4.6% of that found in the retina (Left). Data were analyzed by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method and expressed in percentage to the relative expression of each subunit in the retina. Bars represent the mean \pm SE of three independent experiments ($p < 0.05$). *** Significantly different from control group. C. Shows a representative Western blot of extracts of neostriatum and retina, that distinguished the presence of GABA ρ 1 and GABA ρ 2 (~50kDa).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

769x953mm (72 x 72 DPI)

For Peer Review

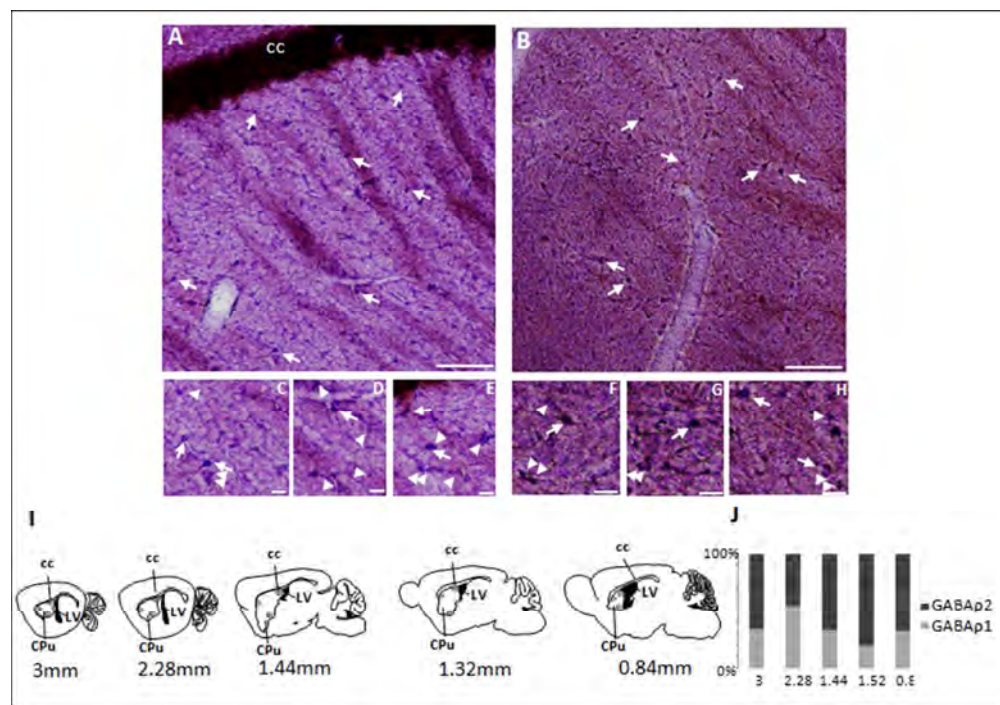


Figure 2 In situ hybridization and immunohistochemistry. ISH analyses in sagittal sections of the expression of A. GABA ρ 1 and B. GABA ρ 2. The arrows show the sparsely distributed cells in the dorsal region of the neostriatum. C-E and F-H images showing cells (arrows) and somas with diameters $\leq 10 \mu\text{m}$ (arrowheads). I. Diagrams of brain sagittal sections showing the localization of GABA ρ distribution at several levels along the neostriatum. Note that both subunits were located mainly in rostral, dorsal, and ventral regions, as indicated in circles in light- and dark gray. Consistently the label was most abundant in dorsal areas. J. Relative amounts of the two GABA ρ subunits as percent of the total along five levels of the neostriatum, as indicated in the text and figure. Notice that GABA ρ 2 is more predominant except at 2.28mm. Numbers below the figures indicate the distance to the brain midline. Scale bars: A and B = $100 \mu\text{m}$; C-E and F-H = $20 \mu\text{m}$. Abbreviations: cc, corpus callosum; LV, lateral ventricle; CPu, caudate putamen (neostriatum).
193x135mm (96 x 96 DPI)

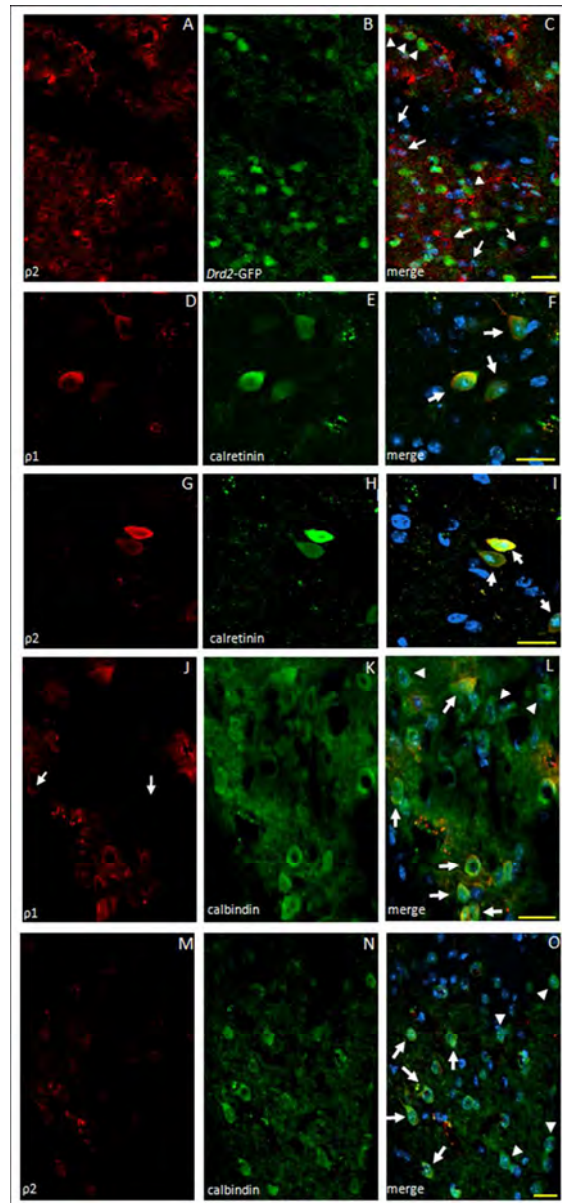


Figure 3. Expression of GABA ρ 2 in Drd2-GFP mouse neurons and double-immunolabeling of GABA ρ 1 or GABA ρ 2/calbindin- and calretinin- positive cells in sagittal sections of neostriatum. A. Representative immunofluorescence detection of GABA ρ 2-positive cells stained with Alexa 594 (red) in Drd2-GFP mice. B. Drd2-GFP-positive cells (green). C. Merge, colocalization of GABA ρ 2 in Drd2-GFP positive cells (yellow); note that not all GABA ρ 2-positive cells (arrows) are GFP positive, whereas several D2-GFP-positive neurons express GABA ρ 2 (arrowheads); nuclei were stained with DAPI. D-F. Co-localization of calretinin (green) with GABA ρ 1 and GABA ρ 2 (red in G-I). In this case, all of the calretinin-expressing cells were also positive for the receptors. Co-localization of calbindin-positive cells immunolabeled with Alexa 488 (green) and GABA ρ 1 (J-L) or GABA ρ 2 (red label in M-O). Merge images (yellow in L and O) showed that not all calbindin-positive cells are GABA ρ positive (arrowheads). Scale bars: 20 μ m.

127x270mm (96 x 96 DPI)

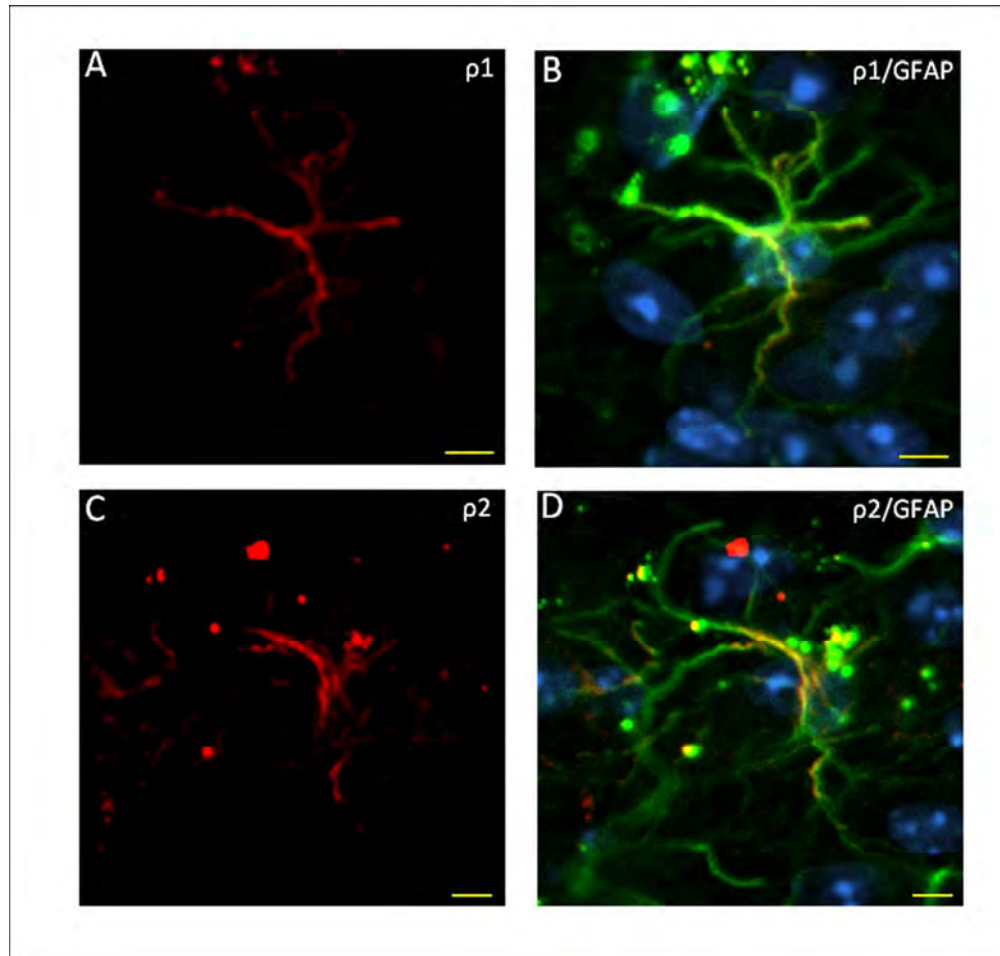


Figure 4. GABA ρ receptors in GFAP-positive cells. A. and C. Sagittal sections through the neostriatum showed immunodetection of GABA ρ 1 and ρ 2 (in red) in cells with large and numerous processes. B. and D. Double immunofluorescence revealed that those cells were also GFAP-positive, indicating that they are glial cells. Yellow indicate the merged image of GABA ρ receptors and GFAP, nevertheless not all GFAP positive cells (green) expressed GABA ρ . Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bars: 5 μ m.
127x121mm (150 x 150 DPI)

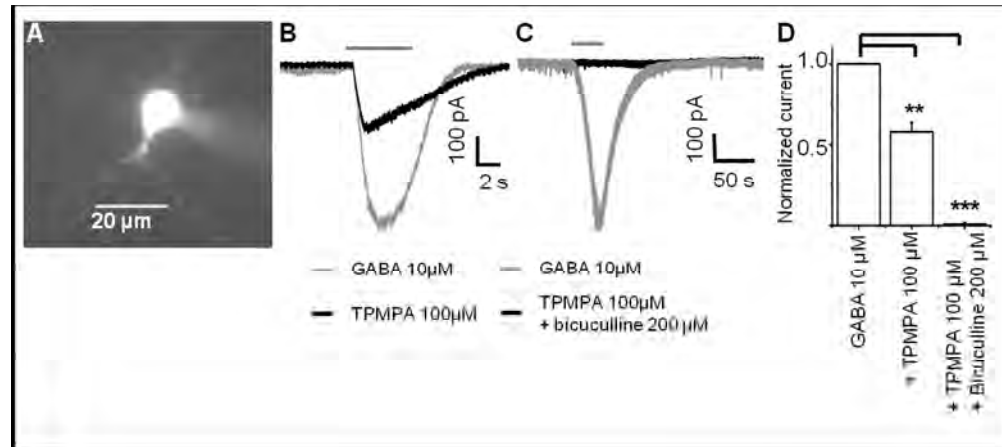


Figure 5. Functional expression of GABA in striatal neurons. A. A representative neostriatal neuron patched in a brain slice and filled with Alexa 594. B. GABA (10 μM) mediated response was reduced when TPMPA (100 μM) was added to the aCSF (n= 19 GABA mediated responses in 7 neurons out of 18). C. GABA mediated responses were abolished when TPMPA (100 μM) and bicuculline (200 μM) were added to the aCSF (n=5 responses from 5 neurons) D. Summary of experiments with GABA, GABA + TPMPA and GABA + TPMPA + Bicuculline. Data are mean ± S.E.M. Asterisks represent significant differences: P<0.01 (**) or P<0.001 (***).

192x85mm (150 x 150 DPI)

Peer Review

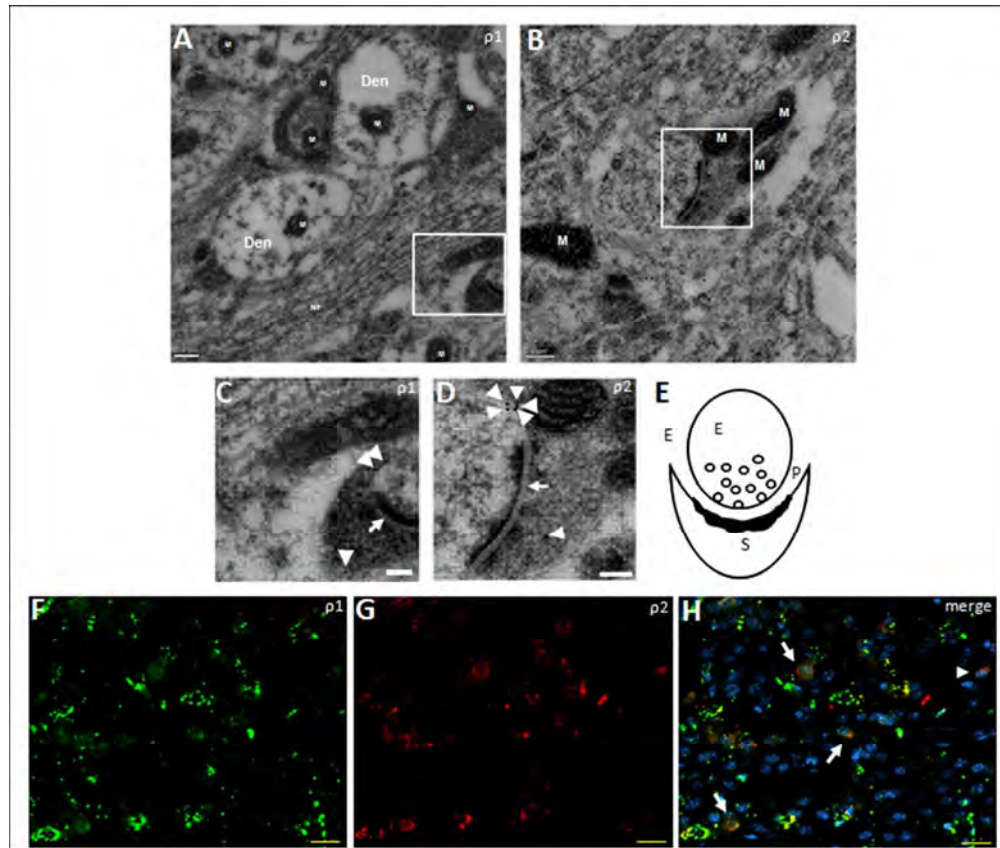


Figure 6. Ultrastructural localization of GABAp. A-D. GABAp1 (A and C) and p2 (B and D) were observed on the presynaptic and postsynaptic sides of asymmetric synapses (arrows), arrowheads point to axon terminals. E. Schematic representation of the localization GABAp, illustrating that the receptors were found in extrasynaptic and perisynaptic regions, and only in a few cases were detected at the synapse. F-H. Co-localization of GABAp1 and p2. F. GABAp1 stained with Alexa 488 (green) and G. GABAp2 stained with Alexa 594 (red). H. Merge images showed the expression of both subunits (arrows) in the same cells, whereas a few cells expressed only GABAp2 (arrowhead). Abbreviations: Den, dendrite; M, mitochondria; Nf, neurofilaments; E, extrasynaptic; S, synaptic; P, perisynaptic. Scale bars: A and B, 200 nm. C and D, 100nm. F-H, 20 μ m.
194x164mm (96 x 96 DPI)

Table 1

Gene	Forward primers	Reverse primers	Size	GenBank accession numbers
Act	5'-ggctacagcttcaccaccacagc-3'	5'-gactcggaaccgctcgttgc-3'	183bp	AK075973
Tub	5'-gcctcccactgtggtaccg-3'	5'-ccctcctccatgccctcacc-3'	174pb	NM_001081190
ρ1	5'-cgaggagcacacgacgatgcc-3'	5'-ctgcacatccagcccacagg-3'	174bp	NM_011653
ρ2	5'-cctgatggctctcgtggagag-3'	5'-ccaaaggctggcctcatggtg-3'	180bp	NM_008075
ρ3	5'-cctcaccacagtggaggagtg-3'	5'-ctgcacaggggcttctgtg-3'	197bp	NM_008076

Table 2

Gene	Forward primers	Reverse primers	Size	Region
ρ1	5'-gtgtcctacatcaaagctgtgg-3'	5'-tatgggcctgtggctcaatgc-3'	819bp	TM3 and TM4 segments
ρ2	5'-ttacagcctctcagagaagcgc-3'	5'-ttcaccagccggccatcaaagg-3'	514bp	non-coding 5' end

Table 3
Primary antibodies used

Antigen	Origin specie	Catalogue	Used for
GABA ρ 1 (N-19)	Goat IgG	sc-21336 Santa Cruz Biotechnology	Immunofluorescence (IF) Double IF Immunogold

			Western blot (WB)
GABA ρ 1 (H-70)	Rabbit IgG	sc-25707 Santa Cruz Biotechnology	IF Double IF Immunogold
GABA ρ 2 (S-19)	Goat IgG	sc-30254 Santa Cruz Biotechnology	IF Double IF Immunogold WB
Calretinin (I-13)	Goat IgG	sc-26512 Santa Cruz Biotechnology	Double IF
Choline acetyltransferase (H-95)	Rabbit IgG	sc-20672 Santa Cruz Biotechnology	Double IF
Calbindin D28K (C-20)	Goat IgG	sc-7691 Santa Cruz Biotechnology	Double IF
Parvalbumin α (H-70)	Rabbit IgG	sc-25727 Santa Cruz Biotechnology	Double IF
Glial fibrillary protein (N-18)	Goat IgG	sc-6171 Santa Cruz Biotechnology	Double IF
Actin (I-19)	Goat IgG	sc-1616 Santa Cruz Biotechnology	WB

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 4
Secondary antibodies used

Antigen	Origin specie	Catalogue	Used for
Goat	Donkey Alexa Fluor 594 conjugated	A-11058 Molecular Probes	Immunofluorescence (IF) Double IF
Rabbit	Donkey Alexa Fluor 488 conjugated	A-21206 Molecular Probes	IF Double IF
Goat	Donkey Alexa 488 conjugated	A-11055 Molecular Probes	IF Double IF
Goat	Rabbit IgG 10nm-gold conjugated	TED PELLA, INC.	Immunogold
Rabbit	Goat IgG 20nm-gold conjugated	TED PELLA, INC.	Immunogold
Goat	Rabbit IgG-AP	sc-2771 Santa Cruz Biotechnology	WB

Supplementary figures

Figure S1. qRT-PCR amplification curves for GABAp1 gene. Representative qRT-PCR amplification curves showing the PCR products for Actin, Tubulin and GABAp1 in retina and neostriatum. Samples are indicated in colors.

Figure S2. qRT-PCR amplification curves for GABAp2 gene. Representative amplification curves of the qRT-PCR showing the PCR products for Actin, Tubulin and GABAp2 in retina and neostriatum. Samples are indicated in colors.

1
2
3 **Figure S3.** Representative traces of GABA (10 μ M) evoked responses that were sensitive
4
5 (A) or not sensitive (B) to TPMPA (100 μ M). C. and D. Summary of experiments from A and
6
7 B respectively. Data are mean \pm S.E.M. Asterisks represent significant differences: $P < 0.01$
8
9 (**)
10
11
12

13
14 **Figure S4. A.** CACA (500 μ M) evoked currents were partially blocked by TPMPA (n = 8
15
16 responses from 2 neurons out of 5). B. Summary of experiments with CACA and the partial
17
18 block of TPMPA. Data are mean \pm S.E.M. Asterisk represent significant differences: $P < 0.05$
19
20 (*)
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

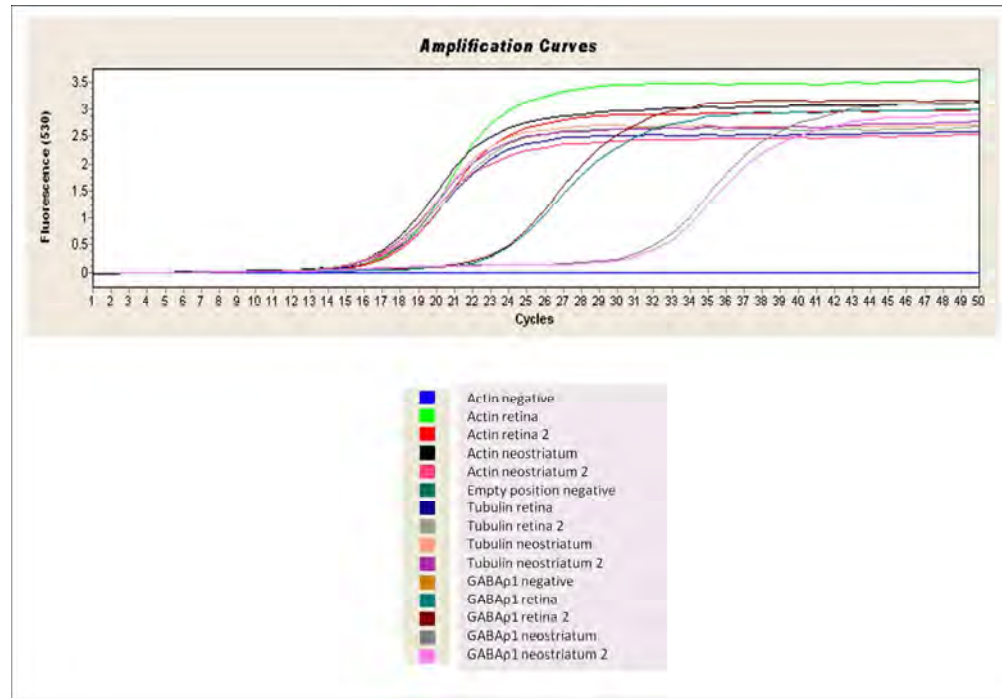


Figure S1. qRT-PCR amplification curves for GABAp1 gene. Representative qRT-PCR amplification curves showing the PCR products for Actin, Tubulin and GABAp1 in retina and neostriatum. Samples are indicated in colors.

255x176mm (150 x 150 DPI)

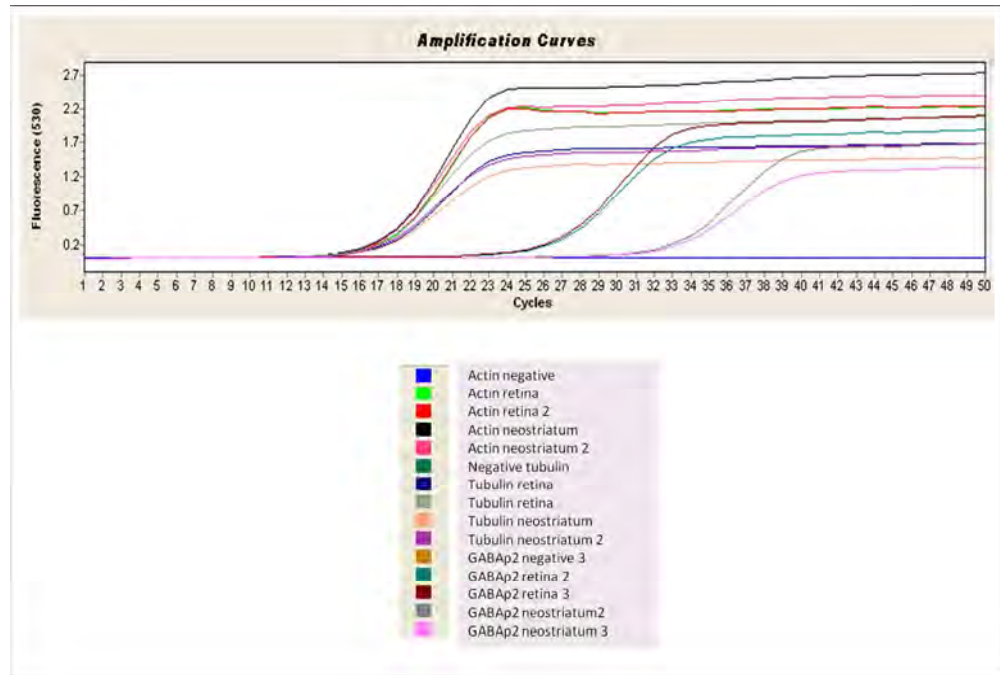


Figure S2. qRT-PCR amplification curves for GABAp2 gene. Representative amplification curves of the qRT-PCR showing the PCR products for Actin, Tubulin and GABAp2 in retina and neostriatum. Samples are indicated in colors.
255x171mm (150 x 150 DPI)

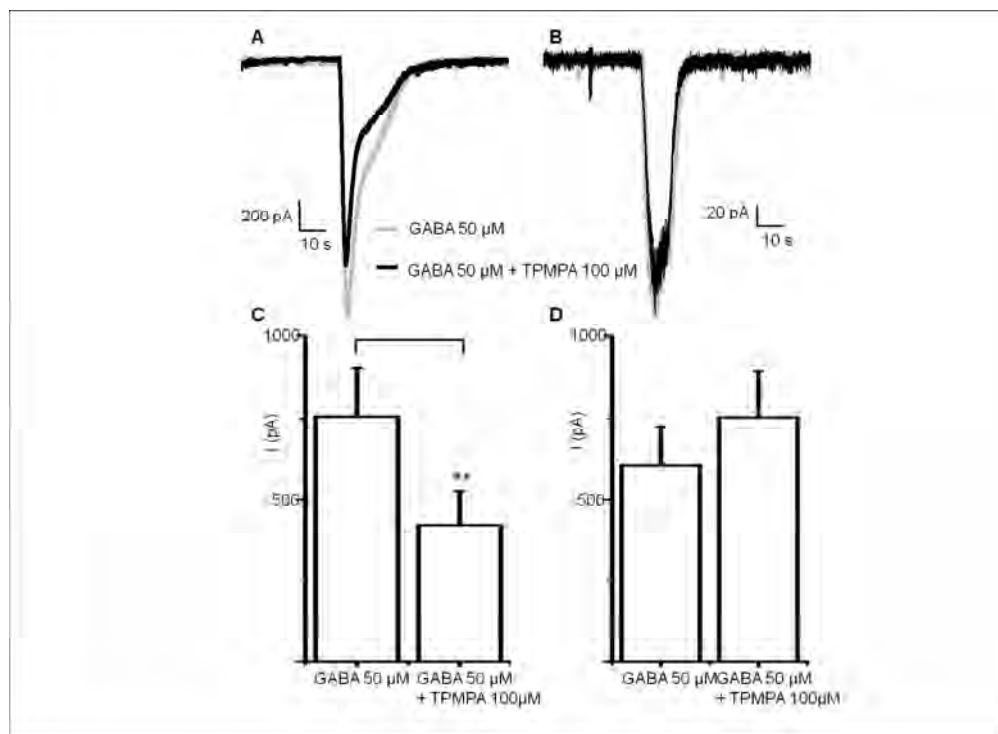


Figure S3. Representative traces of GABA (10 μM) evoked responses that were sensitive (A) or not sensitive (B) to TPMPA (100 μM). C. and D. Summary of experiments from A and B respectively. Data are mean \pm S.E.M. Asterisks represent significant differences: $P < 0.01$ (**)

255x186mm (150 x 150 DPI)

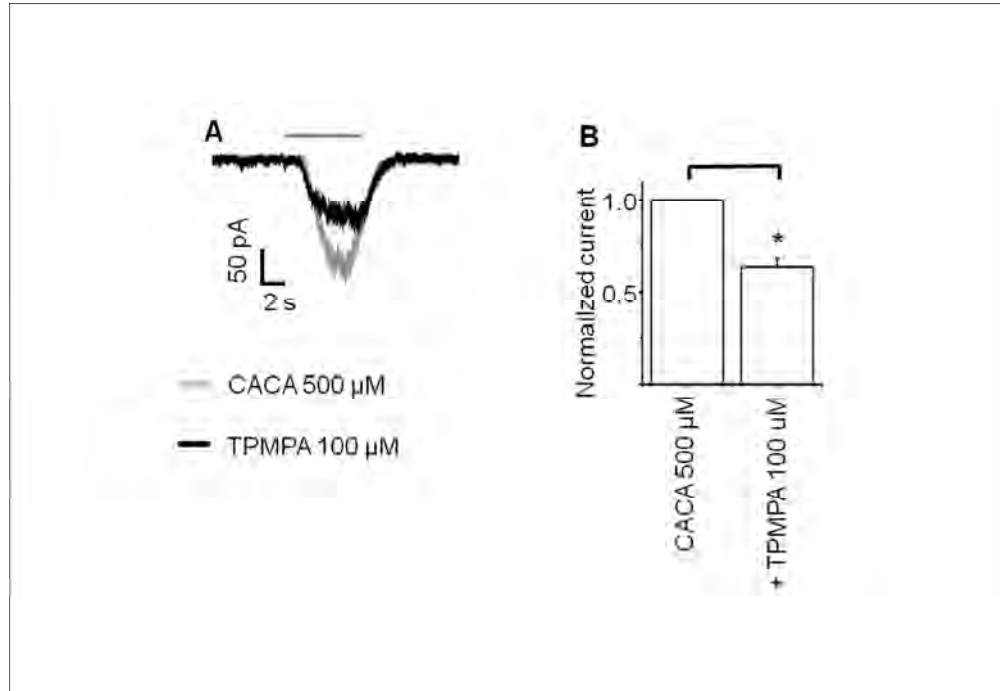
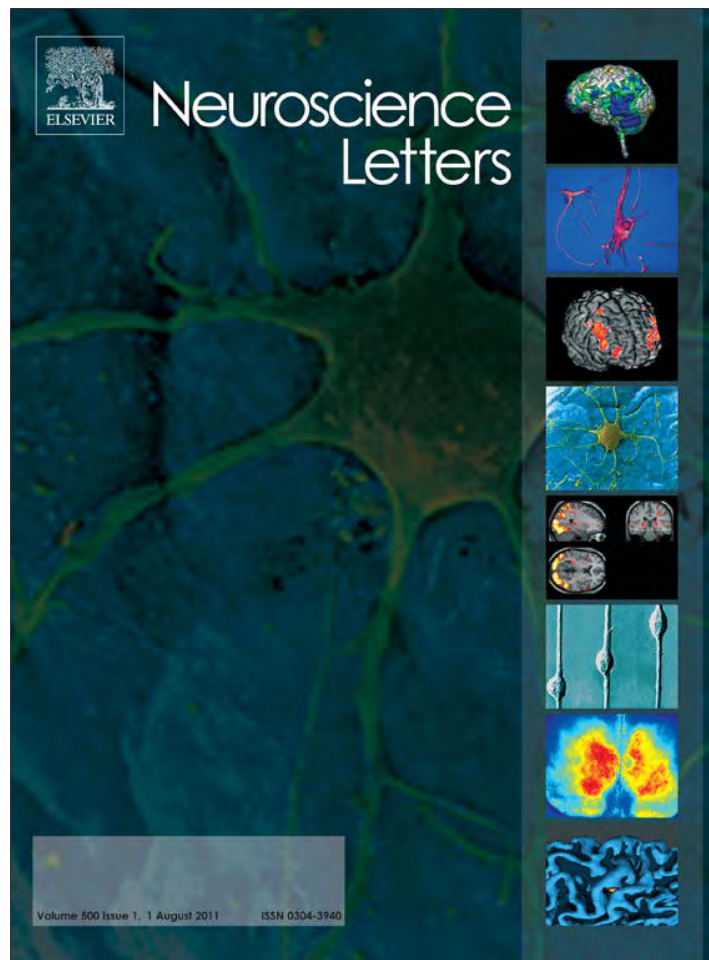


Figure S4. A. CACA (500 μ M) evoked currents were partially blocked by TPMPA ($n = 8$ responses from 2 neurons out of 5). B. Summary of experiments with CACA and the partial block of TPMPA. Data are mean \pm S.E.M. Asterisk represent significant differences: $P < 0.05$ (*).
169x117mm (150 x 150 DPI)

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

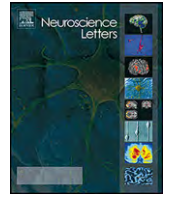
In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Neuroscience Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neulet

The GABA(A) ρ receptors in hippocampal spontaneous activity and their distribution in hippocampus, amygdala and visual cortex

Abraham Rosas-Arellano^a, Jorge Parodi^b, Arturo I. Machuca-Parra^a, Adriana Sánchez-Gutiérrez^c, Nivaldo C. Inestrosa^b, Ricardo Miledi^a, Ataúlfo Martínez-Torres^{a,*}

^a Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular, Instituto de Neurobiología, Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro, QRO 76230, Mexico

^b Centro de Envejecimiento y Regeneración (CARE), Departamento de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

^c Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología, Instituto de Neurobiología, Campus UNAM-Juriquilla, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 March 2011

Received in revised form 13 May 2011

Accepted 31 May 2011

Keywords:

GABA ρ

Patch-clamp

TPMPA

Amygdala

Visual cortex

ABSTRACT

A bicuculline-resistant and TPMPA-sensitive GABAergic component was identified in hippocampal neurons in culture and in acute isolated brain slices. In both preparations, total GABAergic activity showed two inactivation kinetics: fast and slow. RT-PCR, *in situ* hybridization (ISH) and immunohistochemistry detected expression of GABA ρ subunits. Immunogold and electron microscopy indicated that the receptors are mostly extrasynaptic. In addition, by RT-PCR and immunofluorescence we found GABA ρ present in amygdala and visual cortex.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Hippocampal neurons in culture develop a series of neurotransmitter-activated ionic conductances mediated mainly by glutamate and γ -aminobutyric acid (GABA) receptors. In several species, the functional and pharmacological properties of those receptors have been studied at different development stages, including electrophysiological recordings from isolated neurons in culture and slices *e.g.* [13,22]. The molecular conformation of ionotropic GABA receptors expressed in hippocampus corresponds to a combination of several GABA-A subunits, of which the α 1, β 2 and γ 2 are the most abundant, whereas α 5 and δ subunits confer unique pharmacological properties to the receptor [8,25]. Thus, the physiological characteristics of the receptors expressed are largely determined by the subunit composition of the receptors expressed in the neurons at any given time and experimental condition.

The ionotropic GABA ρ receptors were first identified at the vertebrate retina [20], where they play a central role in modulating presynaptic inhibition at the axon terminal of the ON bipolar cells [24]. Currently, it is known that GABA ρ receptors are present in several areas of the brain where their functional role is still elusive [1,14,15,23].

Several studies have described GABA ρ responses that are clearly evident at early developmental stages of the hippocampus. Cherubini's group [6] elegantly defined the pharmacological and single channel properties of those responses while recording from neurons isolated from the CA3 area during the early post-natal development [9]. Further investigations indicate that GABA ρ receptors may, or may not form part of functional synapses in adult hippocampus. For example, Cheng et al. [4] found that the GABA ρ 1 subunit expressed *via* adenoviral transduction is not properly delivered to the synapses in culture hippocampal neurons; whereas, Alakuijala et al. [1] described that GABA ρ receptors are mainly extrasynaptic and most probably activated by GABA spillover from the synaptic cleft in CA1 neurons.

While recording the synaptic activity in mouse hippocampal pyramidal neurons in culture, it came to our attention that a small component of spontaneous activity was not blocked even in the presence of a combination of tetrodotoxin (TTX), bicuculline, Mg²⁺ and 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione (CNQX). This report shows that this GABAergic component can be attributed to the expression of GABA ρ receptors. Additionally, we show that a slow-inactivating GABA-component is also present in hippocampal slices. By means of RT-PCR, ISH and immunohistochemistry; we detected the GABA ρ subunits in this area. Furthermore, electron microscopy disclosed their presence in specific synaptic regions. In addition, we localized the receptors in amygdala and visual cortex.

* Corresponding author.

E-mail address: ataulfo@unam.mx (A. Martínez-Torres).

In the present study, we used CD1 and C57BL/6 mice. All the animals were handled in accordance with the NIH Guide for Care and Use of Laboratory Animals and approved by the Institutional Animal Care and ethic committee of the INB-UNAM.

Hippocampal neurons were obtained from 18 day embryos (C57BL/6). Whole-cell patch clamp recordings of 12DIV neurons were performed as in previous report [19]. Hippocampal slices were prepared according to previously published standard procedures from 22 to 30 day old C57BL/6 mice and used ACFS for external solution [3]. Neuron membrane currents were recorded by whole-cell patch clamp using the Axopatch-200B amplifier (Axon Instruments, Inc., Burlingame, CA). The membrane potential was clamped at -60 mV and the currents were recorded every 50 μ s and filtered at 2 kHz. TTX (100 nM), was added to the external solution to block evoked synaptic activity, thus allowing the detection of the spontaneous miniature synaptic currents (mIPSCs and mEPSCs); CNQX (4 μ M) and bicuculline (10 μ M) blocked glutamatergic and most of the GABAergic components, respectively. In this study 5 μ M, of 1,2,5,6-tetrahydropyridin-4-

yl-methylphosphinic acid (TPMPA) was used for blocking GABA_A transmission.

RNA was isolated from retina, hippocampus, visual cortex and amygdala using TRIzol[®] reagent (Invitrogen), following manufacturer's instructions. Total RNA was reverse transcribed into cDNA and PCR was performed using gene-specific primers (Table S1). Probes for ISH were isolated by RT-PCR (Table S2). The cDNAs were cloned into pGEM-T-Easy (Promega) and sequenced. *In vitro* transcription was performed following the manufacture specifications using digoxigenin-11-UTPs (Invitrogen).

For ISH, CD1 mice (25–30 g) were anesthetized with pentobarbital, perfused transcardially with 0.9% NaCl, and 4% paraformaldehyde in phosphate buffer saline (PBS). The brain and ocular globes were removed, postfixed, cryoprotected and then 150 μ m slices were obtained in cryostat (LeicaCM 1850). Hybridization was performed using the method described by the manufacturer (Roche). The slices were placed (Superfrost[®]/Plus DAIGGER), mounted (Fluoromont G SouthernBiotech, Electron Microscopy Sciences), observed and photomicrographed (Olympus

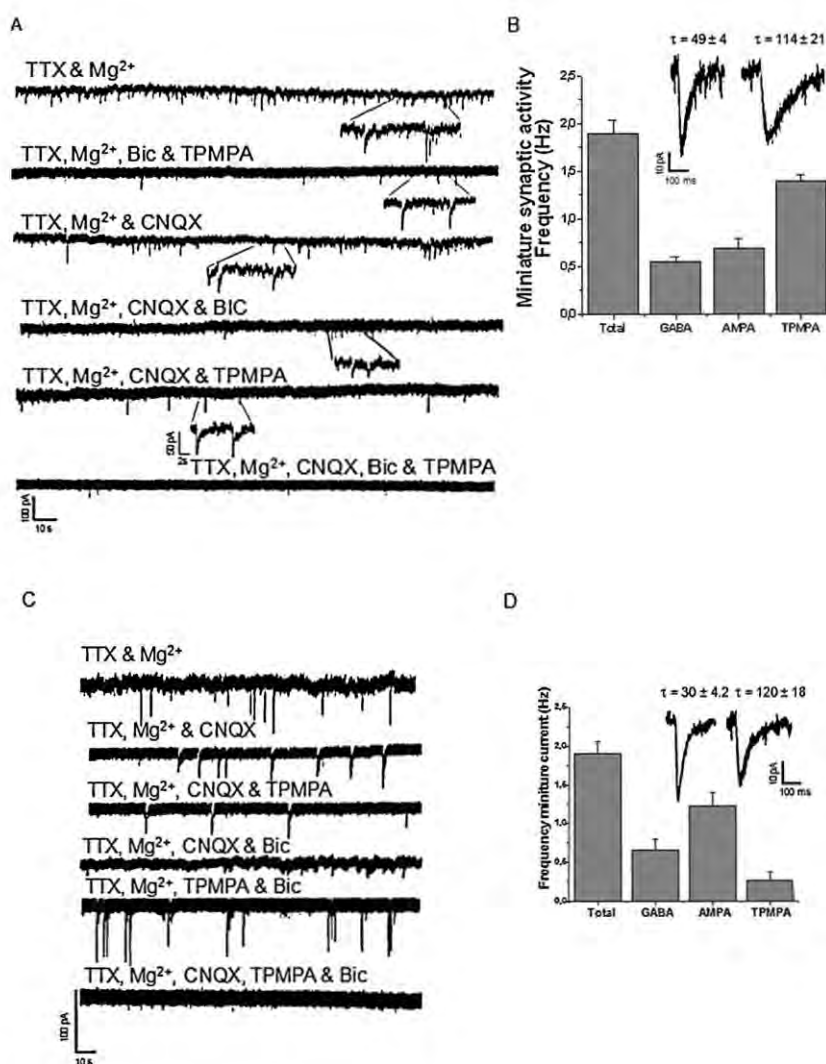


Fig. 1. (A) Culture hippocampal neurons recordings. Miniature spontaneous activity recording in the presence of TTX and Mg²⁺. GABA ionotropic receptors are eliminated with bicuculline (Bic) and TPMPA. GABA-activity is revealed with TTX, Mg²⁺ and CNQX. Most spontaneous activity is wiped out with bicuculline; however some activity remains (inset). Remaining activity was eliminated partially with TPMPA, and totally with TPMPA-bicuculline. (B) Frequency of spontaneous events due to GABA or glutamate receptors; inset: traces are sample traces (without filtering) of fast and slow components. (C) GABA_A subunits in hippocampal slices. Evidence of the recordings of slow and fast GABA-components and partial (TPMPA or bicuculline) and total blocking (TPMPA and bicuculline). (D) Frequencies of synaptic after blocking the glutamatergic component (bar GABA) evidencing the GABA receptors activity. TPMPA reduced to $61.3 \pm 2.1\%$ of the GABA-currents. The inset shows two sample-currents of either fast or slow decay time.

BX60 microscope). Sense probes did not show any label, the anti-sense probes specificity was tested in retina (not shown).

Immunohistochemistry was performed as previously described, in 30 μm slices of whole brain and ocular globes [23]. For imaging, we used Zeiss LSM510 Meta confocal microscope; wave length of 561 nm (Alexa 594) and 750 nm (DAPI) were used for excitation of Alexa 594 and DAPI, respectively. The z-stack images were obtained and processed in Aim Image Examiner. The antibodies specificity was previously tested in retina and STC-1 cells (data not shown). Finally, immunogold labeling was performed as previously described [15].

Spontaneous synaptic activity was recorded from 12 pyramidal neurons that were maintained *in vitro* for 12 days. The frequency of spontaneous miniature synaptic currents was about 1.8 Hz (2 min of recording per cell) when TTX (100 nM) and Mg^{2+} (2 mM), were added to the medium (Fig. 1A). After adding CNQX (4 μM) to block glutamate receptors, the spontaneous miniature synaptic activity due to GABA receptors was evidenced. This GABA activity was mostly abolished when 10 μM bicuculline was also included in the bath to inhibit GABA-A receptors. Nevertheless, a detailed analysis of the recordings revealed that in 9 neurons some spontaneous activity remained (0.29 Hz), standard error of the mean (S.E.M. \pm 0.11). When we combined TTX, Mg^{2+} , CNQX, TPMPA and bicuculline the spontaneous activity was eliminated. The total GABAergic synaptic activity was generated by two different com-

ponents (Fig. 1B, inset): (a) a frequent component that made up to the 90% of the GABA-activity and that showed a *fast* inactivation constant ($\tau = 49 \pm 4$ ms) and (b) a *slow* inactivating component ($\tau = 114 \pm 21$ ms) that correspond to $11 \pm 1\%$ of the GABA-activity (Fig. 1B).

Pyramidal cells of hippocampal slices exposed to TTX (100 nM) and Mg^{2+} (2 mM) showed classical miniature synaptic activity (1.9 ± 0.15 Hz) (Fig. 1C). Addition of TTX (100 nM), Mn^{2+} (2 mM) and CNQX (1 μM) to the recording bath revealed clearly the GABAergic component which exhibited two kinetics: (1) a frequent fast inactivating component ($\tau = 30 \pm 4.2$ ms) that made up about 83% of the GABAergic transmission. (2) A slow inactivating ($\tau = 120 \pm 18$ ms) that formed the remaining 17%. These two kinetically different components resemble those observed in cultured pyramidal neurons (*c.f.* 1B) and sample traces of these two components and their frequencies are compared with the total miniature synaptic activity (Fig. 1D). Additionally, 5 μM of TPMPA wiped out 17% of the GABA activity (0.5 ± 0.1 Hz), which was recovered after washing out the compound and substitution of TPMPA with 10 μM bicuculline eliminated most of the GABAergic component and evidenced solely GABA ρ activity (0.11 ± 0.02 Hz). Combining TPMPA and bicuculline in CNQX absence showed the glutamatergic activity (1.2 ± 0.17 Hz). Finally, the presence of CNQX in combination with GABA-A and GABA ρ blockers eliminated most of the miniature synaptic activity. Comparative analysis of the ampli-

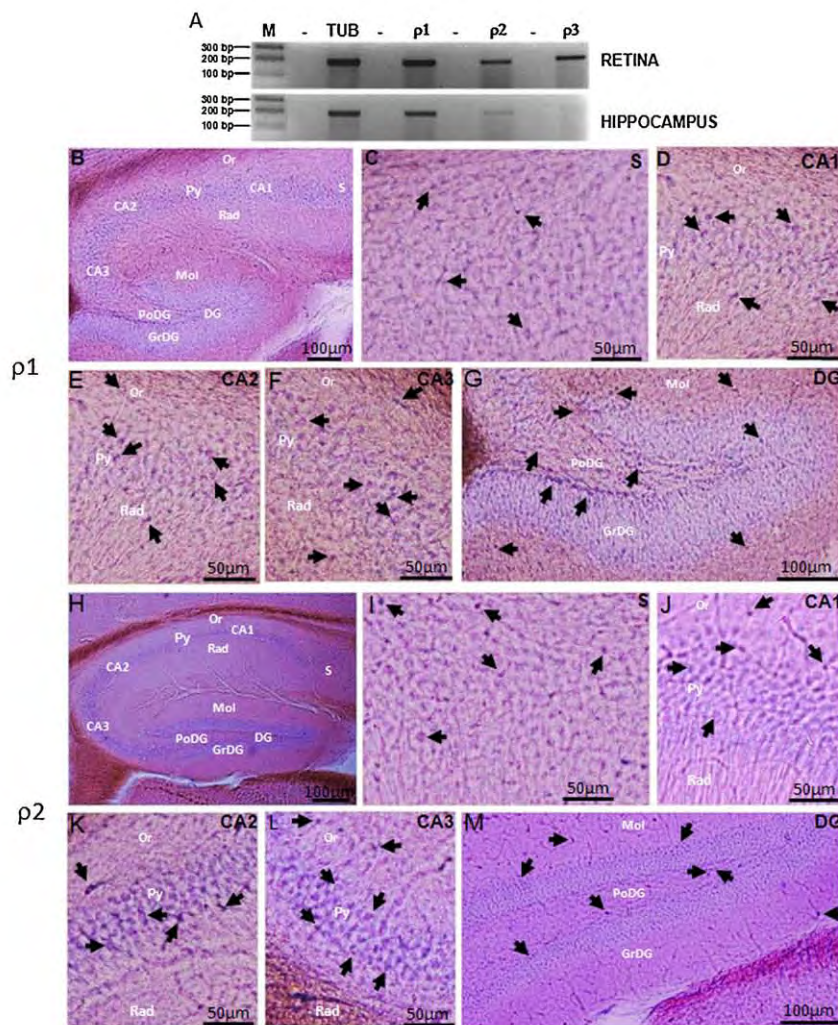


Fig. 2. GABA ρ mRNA expression. (A) RT-PCR GABA ρ expression in retina and hippocampus by (B and H) ISH for GABA ρ 1 and ρ 2 respectively, in subiculum (S), CA1-3, and dentate gyrus (DG). (C and I) GABA ρ 1 and ρ 2 are present in subiculum. (D-F) GABA ρ 1 and J-L. GABA ρ 2 mRNAs in CA1-3 in pyramidal layer (Py), oriens layer (Or), and stratum radiatum (Rad). (G and M) In DG are localized in granular (GrDG), polymorph (PoDG), and molecular layer (Mol).

tudes of the fast and slow kinetics were not significantly different in neurons (52 ± 4 pA and 43.7 ± 7 for the fast and slow component, respectively, ANOVA $p > 0.05$) or in slices (53 ± 6 pA for the fast and 42 ± 7 pA for the slow, ANOVA $p > 0.05$). Considering that the remaining synaptic activity suggested the presence of a slow-inactivating TPMPA-sensitive, we therefore tried to determine which of the GABA ρ subunits are expressed in the hippocampus.

RNA was isolated from 20 retinas and from 20 hippocampi of 30 days old mice. In independent preparations, we found that all the GABA ρ subunits were amplified (Fig. 2A). Even though this assay was not quantitative it seemed that the GABA ρ 3 subunit was less represented in the hippocampus, and we therefore decided

to concentrate on describing the GABA ρ 1 and GABA ρ 2 distribution.

Four brains in sagittal slices were used for ISH. We detected the expression of GABA ρ 1 and GABA ρ 2 in CA1–3 areas, dentate gyrus as well as subiculum (Fig. 2B and H). In the subiculum, the expression of both subunits was found in sparsely cells (Fig. 2C and I). In CA1, CA2 and CA3 the label was found mostly in pyramidal neurons whereas a small population of interneurons also showed some mark (Fig. 2D–F and J–L); whereas, GABA ρ 2 was also observed in the processes of pyramidal cells of CA1. Finally, in dentate gyrus most of the label was detected towards the granular, molecular and polymorph layers (Fig. 2G and M). In four brains, immunofluorescence revealed that GABA ρ 1 was detected in CA1–CA2, mostly

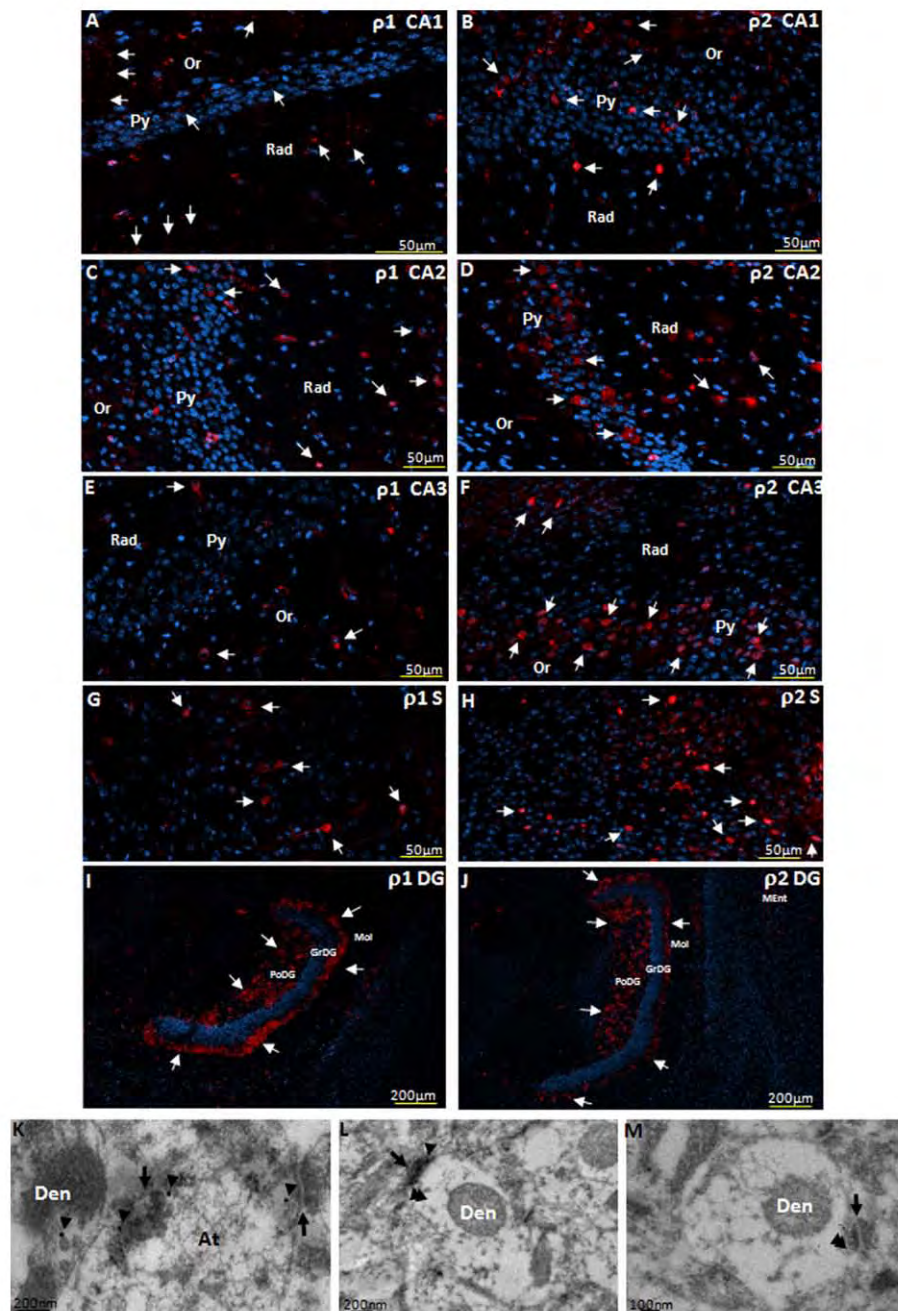


Fig. 3. GABA ρ immunolocalization. (A and B) Distribution in pyramidal layer (Py), stratum radiatum (Rad) and oriens layer (Or) in CA1. (C and D) In CA2 in Py and Rad. (E and F) In CA3 GABA ρ 1 in Or and Rad, GABA ρ 2 in Py and Or. (G and H) Expression in subiculum. (I and J) In dentate gyrus (DG) both subunits are present in polymorph (PoDG), and molecular (Mol) layers. (K) At ultrastructural localization GABA ρ 1 was found mainly in extrasynaptic sites (arrowheads). The arrows point towards postsynaptic densities. (L) GABA ρ 1 in synaptic cleft (arrowheads). (M) GABA ρ 2 (arrowheads) outside of synaptic density. *Abbreviations:* At, axon terminal; Den, dendrite.

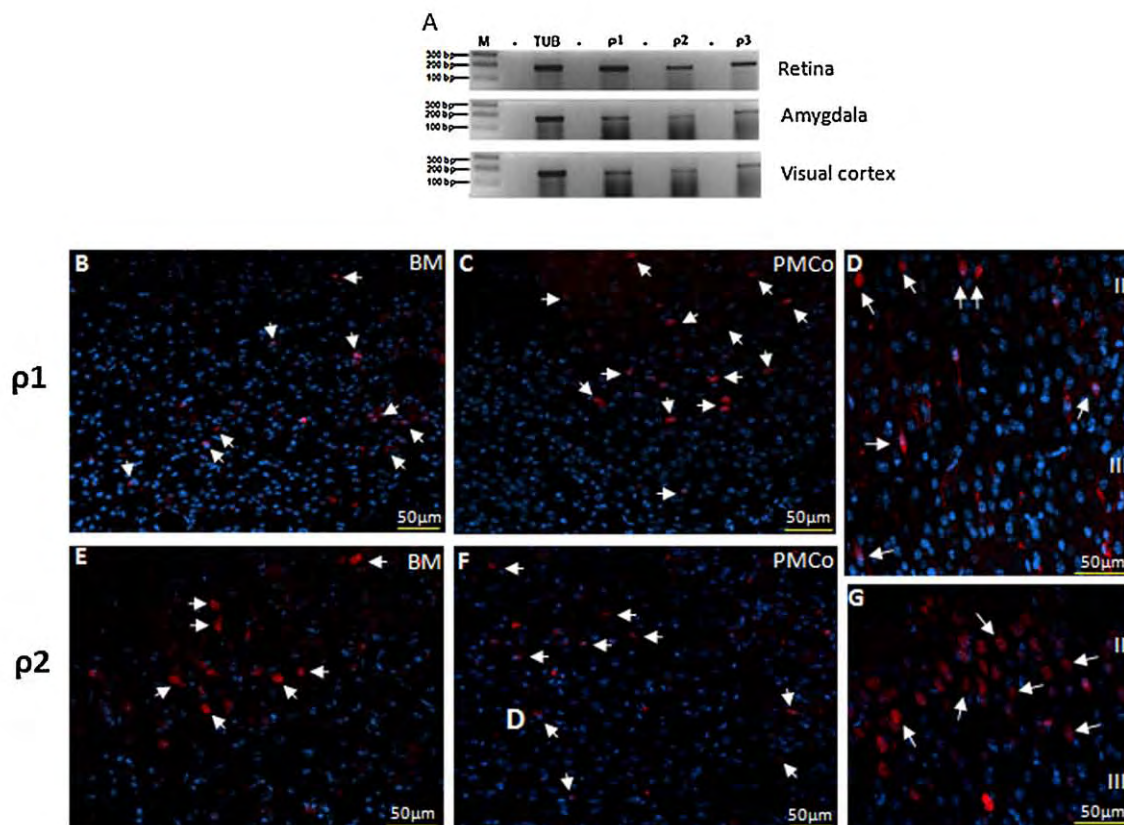


Fig. 4. GABA ρ expression and localization in amygdala and visual cortex. (A) RT-PCR of GABA ρ expression. (B, C, E and F) Immunolocalization of both subunits in the same nuclei of amygdala. (D) Immunofluorescence of GABA ρ 1 was detected mostly in somas. (G) Whereas GABA ρ 2 was localized in soma and processes in II and III layers, and sparsely distributed in V and VI layers (not shown). *Abbreviations:* BM, basomedial nucleus; PMCo, posteromedial cortical nucleus.

in the neuron processes, several somas of interneurons and pyramidal layer of CA1, CA2 (Fig. 3A and C), while only a few cells and processes were positive in CA3 (Fig. 3E). The GABA ρ 2 was detected mostly in somas and some processes of pyramidal layer of CA1 and CA2. In CA3 its distribution was wider than GABA ρ 1 (Fig. 3B, D and F).

The two subunits were also found in the subiculum (Fig. 3G and H). In dentate gyrus, both subunits are distributed in somas of the polymorph and molecular layers (Fig. 3I and J); we did not find evidence of their presence in neither the somas or processes of the granular neurons, where we observed the expression of their mRNAs.

The fluorescence was localized to puncta in the hippocampal neurons, suggesting that the receptors are at the synapses. To examine this question we used immunogold and electron microscopy. We found most of the label at extrasynaptic sites, either in the plasma membrane or near the cell surface, and only 3 out of more of 20 postsynaptic densities showed some label for either GABA ρ 1 (Fig. 3K and L) or GABA ρ 2 (Fig. 3M).

Additionally, we found some label for GABA ρ receptors by immunofluorescence in anterior and posterior areas of the basomedial nucleus, as well as in the posteromedial cortical nucleus in the amygdala (Fig. 4B, C, E and F), and towards the mediomedial area of the secondary visual cortex (V2MM) (Fig. 4D and G). RT-PCR assays confirmed the expression of the three subunits (Fig. 4A). ISH confirm this mRNA expression in the same areas of amygdala and in visual cortex (data not shown).

As in previous studies we found very little spontaneous synaptic activity in mice pyramidal neurons exposed to antagonists of GABA-A and glutamate receptors [13,18]. At first, we presumed that this activity was due to an incomplete block of the receptors expressed by the neurons in culture. However, an alternative expla-

nation immediately arose, when we obtained partial blockage of the GABA-currents by including TPMPA, a good blocker of GABA ρ receptors [21]. This result suggested that the spontaneous synaptic activity which remained after the combined exposure to bicuculline and CNQX was due to the action of GABA ρ receptors.

Protocols of stimulus-evoked postsynaptic potentials have suggested the presence of GABA ρ in perisynaptic regions of the hippocampus CA1 area [1]. It is also known that GABA-A receptors containing the α 5 subunit mediate the phasic inhibition in CA1 [26,29]. However, since we found that pyramidal neurons generate a TPMPA-sensitive component, complementary to the more abundant bicuculline-blocked GABA-A receptors, a role for GABA ρ in tonic inhibition should not be discarded.

The presence of GABA ρ receptors in CA1 perisynaptic regions has been documented [1]. These observations are partially consistent with our findings, since immunogold revealed most of the label at extrasynaptic sites; although additional label was also found in postsynaptic densities. This suggests a potential role for GABA ρ receptors in fast synaptic transmission either as independent receptors or forming heteromeric complexes with others GABA-A subunits, such as those reported in brainstem [16], and in CA1 [13]. On the other hand, although we observed the expression of the GABA ρ mRNAs along the granular layer of DG, the immunofluorescence did not detect the receptors, thus suggesting the possibility that the proteins are expressed at much lower levels [16]. It is worth mentioning that the GABA-A α 1 subunit has been found in both synaptic and extrasynaptic sites [2], of pyramidal neurons of CA1 and this subunit is known to associate with GABA ρ 1 [11,13,16].

The functional properties of the GABA ρ receptors in the subiculum need to be investigated further. We have not found evidence in the literature of electrophysiological recordings indicating a

bicuculline resistant receptor in this area; and the GABA-A receptors microtransplanted to frog oocytes from subicula retrieved from epileptic patients did not show evidence of a GABA ρ component [17]. However, our molecular and immunological evidence suggests the presence of GABA ρ receptors in neurons of the subiculum.

In the amygdala, electrophysiological recordings identified a population of TPMPA-sensitive ionotropic GABA receptors that was segregated from classic GABA-A receptors in dendritic synapses [7]. Previous studies showed that GABA ρ subunits are present in several nuclei of the amygdala [10,12]; however, for the first time in this study we show by means of RT-PCR, ISH and immunolabeling evidence that these subunits are found in neurons of the basomedial and cortical nuclei. Our results are consistent with a recent study that showed that TPMPA injected in the amygdala modulates fear and anxiety [10].

The distribution of GABA ρ receptors in the brain cortex is very sparse. Wegelius et al., suggested the expression of mRNAs for GABA ρ 2 and GABA ρ 3 in neurons of the VI layer of the rat visual cortex [28]. This distribution is in part consistent with our findings, where we found some GABA ρ 1 and GABA ρ 2 in the V–VI layers of the V2MM. Our results correlate well with those of Wahle and Schmidt [27], that indicate that GABA ρ 1 and ρ 2 mRNAs are expressed in pyramidal neurons throughout layers II–VI in the rat visual cortex.

All our results provide some anatomical and molecular evidence that defines the presence of GABA ρ receptors in unexplored areas such as the amygdala, subiculum and visual cortex. The scattered information of the distribution of GABA ρ is just beginning to yield a general view of their potential involvement in higher functions such as memory, learning and visual processing [5,10].

Acknowledgments

Dr. I.A. Martínez, E. Ruiz, A.E. Espino for technical assistance. M.L. Palma, E.N. Hernández, provided support in electron and confocal microscopy. A. Antaramian, A. Sánchez for DNA sequencing. We are indebted to Dr. R.F. Halliwell (University of the Pacific) and Dr. D. Palanivelu (UCSF) for critical reading of the manuscript. Dr's R. Arellano, A. Cárabez, A. Varela, J. Larriva (INB-UNAM), R. Gutiérrez (CINVESTAV), and members of their laboratories for facilities and suggestions. Dr. D. Hanahan (UCSF), provided STC-1 cell line. This work was supported by grants from PAPIIT-UNAM 202609-21 and 205308-21 (AM-T and RM), CONACYT 101851 (AM-T). JP is a recipient of postdoctoral fellowship from DGAPA-UNAM. AR-A (189290) and AIM-P (210374) are recipients of fellowships from CONACYT-México. Thanks to UNAM, INB and Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas. AM-T acknowledges support from The A. & W. Shedid Fund.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.neulet.2011.05.235.

References

- [1] A. Alakuijala, J. Alakuijala, M. Pasternack, Evidence for a functional role of GABA receptors in the rat mature hippocampus, *Eur. J. Neurosci.* 23 (2006) 514–520.
- [2] A. Baude, C. Bleasdale, Y. Dalezios, P. Somogyi, T. Klausberger, Immunoreactivity for the GABAA receptor α 1 subunit, somatostatin and Connexin36 distinguishes axoaxonic, basket, and bistratified interneurons of the rat hippocampus, *Cereb. Cortex* 17 (2007) 2094–2107.
- [3] W. Cerpa, G.G. Fariás, J.A. Godoy, M. Fuenzalida, C. Bonansco, N.C. Inestrosa, Wnt-5a occludes β oligomer-induced depression of glutamatergic transmission in hippocampal neurons, *Mol. Neurodegener.* 18 (5) (2010) 3.
- [4] Q. Cheng, P.M. Burkat, J.C. Kulli, J. Yang, GABA(C) ρ 1 subunits form functional receptors but not functional synapses in hippocampal neurons, *J. Neurophysiol.* 86 (2001) 2605–2615.
- [5] Y. Chen, D. Zhou, K. Zhou, Y. Ren, W. Dai, M. Xu, L. Lu, Z. Lu, Study on olfactory function in GABAC receptor/channel ρ 1-subunit knockout mice, *Neurosci. Lett.* 427 (2007) 10–15.
- [6] E. Cherubini, M. Martina, M. Sciancalepore, F. Strata, GABA excites immature CA3 pyramidal cells through bicuculline-sensitive and -insensitive chloride-dependent receptors, *Perspect. Dev. Neurobiol.* 5 (1998) 289–304.
- [7] A. Delaney, P. Sah, GABA receptors inhibited by benzodiazepines mediate fast inhibitory transmission in the central amygdala, *J. Neurosci.* 19 (1999) 9698–9704.
- [8] F. Didelon, M. Mladinic', E. Cherubini, A. Bradbury, Early expression of GABA(A) receptor δ subunit in the neonatal rat hippocampus, *J. Neurosci. Res.* 62 (2000) 638–643.
- [9] F. Didelon, M. Sciancalepore, N. Savic', M. Mladinic', A. Bradbury, E. Cherubini, GABAA ρ receptor subunits in the developing rat hippocampus, *J. Neurosci. Res.* 67 (2002) 739–744.
- [10] C. Flores-Gracia, A. Nuche-Bricaire, M. Crespo-Ramírez, R. Miledi, K. Fuxe, M. Pérez de la Mora, GABA(A) ρ receptor mechanisms in the rat amygdala and its role in the modulation of fear and anxiety, *Psychopharmacology (Berl)* 212 (2010) 475–484.
- [11] R. Frazao, M.I. Nogueira, H. Wässle, Colocalization of synaptic GABA(C)-receptors with GABA(A)-receptors and glycine-receptors in the rodent central nervous system, *Cell Tissue Res.* 330 (2007) 1–15.
- [12] J. Fujimura, M. Nagano, H. Suzuki, Differential expression of GABA(A) receptor subunits in the distinct nuclei of the rat amygdala, *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2138 (2005) 17–23.
- [13] K. Hartmann, F. Stief, A. Draguhn, C. Frahm, Ionotropic GABA receptors with mixed pharmacological properties of GABAA and GABAC receptors, *Eur. J. Pharmacol.* 497 (2004) 139–146.
- [14] A. López-Chávez, R. Miledi, A. Martínez-Torres, Cloning and functional expression of the bovine GABA-C ρ 2 subunit. Molecular evidence of a widespread distribution in the CNS, *Neurosci. Res.* 53 (2005) 421–427.
- [15] C. Mejía, G. García-Alcocer, L.C. Berumen, A. Rosas-Arellano, R. Miledi, A. Martínez-Torres, Expression of GABA ρ subunits during rat cerebellum development, *Neurosci. Lett.* 432 (2008) 1–6.
- [16] C.J. Milligan, N.J. Buckley, M. Garret, J. Deuchars, S.A. Deuchars, Evidence for inhibition mediated by coassembly of GABA-A and GABA-C receptor subunits in native central neurons, *J. Neurosci.* 24 (2004) 7241–7250.
- [17] E. Palma, G. Torchia, C. Limatola, F. Trettel, A. Arcella, G. Cantore, G. Di Gennaro, M. Manfredi, V. Esposito, P.P. Quarato, R. Miledi, F. Eusebi, BDNF modulates GABAA receptors microtransplanted from the human epileptic brain to *Xenopus* oocytes, *PNAS* 102 (2005) 1667–1672.
- [18] L.D. Partridge, C.F. Valenzuela, Neurosteroid-induced enhancement of glutamate transmission in rat hippocampal slices, *Neurosci. Lett.* 301 (2001) 103–106.
- [19] J. Parodi, F.J. Sepúlveda, J. Roa, C. Opazo, N.C. Inestrosa, L.G. Aguayo, β -amyloid causes depletion of synaptic vesicles leading to neurotransmission failure, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 2506–2514.
- [20] L. Polenzani, R.M. Woodward, R. Miledi, Expression of mammalian GABA receptors with distinct pharmacology in *Xenopus* oocytes, *PNAS* 88 (1991) 4318–4322.
- [21] D. Ragozzino, R.M. Woodward, Y. Murata, F. Eusebi, L.E. Overman, R. Miledi, Design and in vitro pharmacology of a selective GABA-C receptor antagonist, *Mol. Pharmacol.* 50 (1996) 1024–1030.
- [22] H. Romo-Parra, M. Treviño, U. Heinemann, R. Gutiérrez, GABA actions in hippocampal area CA3 during postnatal development: differential shift from depolarizing to hyperpolarizing in somatic and dendritic compartments, *J. Neurophysiol.* 99 (2008) 1523–1534.
- [23] A. Rosas-Arellano, L.D. Ochoa-de la Paz, R. Miledi, A. Martínez-Torres, Brain distribution and molecular cloning of the bovine GABA ρ 1 receptor, *Neurosci. Res.* 57 (2007) 347–353.
- [24] T. Schubert, D. Kerschensteiner, E.D. Eggers, T. Misgeld, M. Kerschensteiner, J.W. Lichtman, P.D. Lukasiewicz, R.O. Wong, Development of presynaptic inhibition onto retinal bipolar cell axon terminals is subclass-specific, *J. Neurophysiol.* 100 (2008) 304–316.
- [25] D.R. Serwanski, C.P. Miralles, S.B. Christie, A.K. Mehta, X. Li, A.L. De Blas, Synaptic and nonsynaptic localization of GABA-A receptors containing the α 5 subunit in the rat brain, *J. Comp. Neurol.* 499 (2006) 458–470.
- [26] M. Vargas-Caballero, L.J. Martin, M.W. Salter, B.A. Orser, O. Paulsen, α 5 Subunit-containing GABA(A) receptors mediate a slowly decaying inhibitory synaptic current in CA1 pyramidal neurons following Schaffer collateral activation, *Neuropharmacology* 58 (2010) 668–675.
- [27] P. Wahle, M. Schmidt, GABA(C) receptors are expressed in GABAergic and non-GABAergic neurons of the rat superior colliculus and visual cortex, *Exp. Brain Res.* 199 (2009) 245–252.
- [28] K. Wegelius, M. Pasternack, J.O. Hiltunen, C. Rivera, K. Kaila, M. Saarma, M. Reeben, Distribution of GABA receptor ρ subunit transcripts in the rat brain, *Eur. J. Neurosci.* 10 (1998) 350–357.
- [29] J.Y. Xu, B. Yang, B.R. Sastry, The involvement of GABA-C receptors in paired-pulse depression of inhibitory postsynaptic currents in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons, *Exp. Neurol.* 216 (2009) 243–246.

Table S1

Gene	Forward primers	Reverse primers	Size	GenBank accession numbers
Tub	5'-gcctcccactgtggtacctg-3'	5'-ccctcctccatgccctcacc-3'	174bp	NM_001081190
ρ1	5'-cgaggagcacacgacgatgcc-3'	5'-ctgcacatccacgcccacagg-3'	174bp	NM_011653
ρ2	5'-cctgatggctctcgtggagag-3'	5'-ccaaaggctggcctcatggtg-3'	180bp	NM_008075
ρ3	5'-cctcaccacagtggaggagtg-3'	5'-ctgcacaggggcttctgtg-3'	197bp	NM_008076

Table S2

Gene	Forward primers	Reverse primers	Size	Region
ρ1	5'-gtgtcctacatcaaagctgtgg-3'	5'-tatgggcctgtgggctcaatgc-3'	819bp	TM3 and TM4 segments
ρ2	5'-ttacagcctctcagagaagcgc-3'	5'-ttcaccagccggccatcaaagg-3'	514bp	non-coding 5' end

Compendio de resultados

Abraham Rosas-Arellano, Arturo I. Machuca-Parra, Daniel Reyes-Haro, Ricardo Miledi, Ataúlfo Martínez-Torres. *Expression of GABA ρ receptors in the neostriatum: localization in aspiny, medium spiny neurons and GFAP-positive cells*. En revisión.

- Ensayos cuantitativos mediante qRT-PCR sugirieron que los ARNm de GABA ρ se expresados en menor proporción en el neostriado respecto a la retina (< 10%) y que la expresión de GABA ρ 2 en el neostriado es más abundante (4.6%) que GABA ρ 1 (1.2%).
- Indicamos que la distribución a lo largo de diferentes planos sagitales en relación a la línea interhemisférica corresponde de la siguiente manera: a 3.00 mm, GABA ρ 1 está presente en un 33.3%, mientras que GABA ρ 2 en 66.7%; a 2.28 mm, 54.8% y 45.2%; a 1.44 mm, 32.3% y 67.7%; a 1.32 mm, 19.1% y 80.2%; finalmente a 0.84 mm, 32% y 68%, respectivamente. El análisis estadístico mostró que GABA ρ 2 es más abundante que GABA ρ 1 en cada plano analizado excepto a 2.28mm (ANOVA y Fisher PLSD $p < 0.05$).
- Mostramos que las s-GABA ρ se expresan en interneuronas, en especial en todas aquellas que expresan calretinina y que GABA ρ 1 fue expresado en un 8.7% y GABA ρ 2 en un 36.7% de células que expresan calbindina.
- Adicionalmente, indicamos que una pequeña población de células (4.1%), con características morfológicas de neuronas medianas espinosas y que expresan receptores D2 de dopamina expresan la subunidad GABA ρ 2.
- Además, análisis electrofisiológicos en cortes de cerebro mostraron que concentraciones de 10 μ M de GABA generan corrientes con amplitud de 756 ± 147 pA ($n = 37$), de ellas sólo una fracción (7 de 18 neuronas) respondieron a 100 μ M TPMPA (antagonista selectivo de las subunidades GABA ρ), el cual bloqueó parcialmente corrientes inducidas por GABA (756 ± 147 a 421 ± 105 ; $n=19$; $p<0.01$). Además mostramos que algunas corrientes generadas por GABA (11 de 18 neuronas) no fueron afectadas por el TPMPA (603 ± 122 de 753 ± 140 ; $n=18$; $p=0.42$). Se observó que las

respuestas a GABA fueron eliminadas cuando se co-aplicó una alta concentración de bicuculina (200 μ M) en conjunto con 100 μ M de TPMPA (n = 5). Cuando se utilizó CACA (agonista selectivo de las subunidades GABA ρ) en altas concentraciones (500 μ M) se obtuvieron corrientes con una amplitud de 134 ± 7 pA (n = 8), que fueron reducidas en un 37% en presencia de 100 μ M de TPMPA (2 de 5 neuronas; p<0.05). Estos resultados mostraron que las subunidades GABA ρ son funcionales en el neocóstriado.

- De manera interesante mostramos mediante análisis de hibridación *in situ* que GABA ρ 1 y ρ 2 se expresan en somas con diámetros ≤ 10 μ m y que fueron relacionados a una considerable proporción (33.9%, 791 vs 2,332 de señal dada por DAPI) de células positivas a la proteína gliofibrilar ácida (GFAP), mediante análisis de doble inmunofluorescencia.
- El análisis de microscopía electrónica de transmisión acoplado al uso de inmuno-oro mostramos que 1 de cada 50 regiones sinápticas del neocóstriado expresan las subunidades GABA ρ 1, ρ 2 o ambas, siendo su localización específica en sitios extrasinápticos y perisinápticos y con escasa o nula presencia en regiones de la hendidura sináptica. GABA ρ 1 fue localizado de la siguiente manera: 57.1% extrasináptica, 33.3% perisináptica, y 9.5% sináptica. Mientras que GABA ρ 2 se localizó en un 54.1%, 43.7%, y 2.0%, respectivamente; mediante análisis estadístico reportamos diferencias significativas en la distribución en los tres compartimentos (Kruskal-Wallis test, p < 0.05) y que dichas diferencias se observan cuando se comparan las regiones extrasinápticas vs sinápticas y las regiones perisinápticas vs sinápticas (análisis *post-hoc* no paramétrico U-Mann–Whitney dos colas, p < 0.05). Respecto a la abundancia el análisis estadístico indicó que GABA ρ 2 es más abundante que GABA ρ 1 (U-Mann–Whitney, dos colas p < 0.05).
- Finalmente los análisis de doble inmunofluorescencia y doble inmuno-oro para GABA ρ 1/ ρ 2, indicaron que ambas subunidades pueden co-expresarse en las mismas células y en las mismas regiones sinápticas.

Rosas-Arellano A, Parodi J, Machuca-Parra AI, Sánchez-Gutiérrez A, Inestrosa NC, Miledi R, Martínez-Torres A. 2011. The GABA(A) ρ receptors in hippocampal spontaneous activity and their distribution in hippocampus, amygdala and visual cortex. *Neurosci Lett.* **500**, 20-5.

- Actividad espontánea en presencia de TTX (100nM) y Mg²⁺ (2mM) fue registrada de 12 células piramidales, mostrándose una corriente sináptica miniatura de 1.8Hz, cuando se bloquearon los receptores glutamatérgicos (CNQX 4 μ M), se evidenció la actividad sináptica miniatura debida al GABA y que fue eliminada a la colocación de 10 μ M de bicuculina (antagonista específico de subunidades GABA-A, excepto de GABA ρ); sin embargo, en 9 neuronas se observó un remanente de corriente (0.29Hz) que fue eliminado cuando se añadió 5 μ M de TPMPA. Estos ensayos farmacológicos permitieron observar dos componentes GABAérgicos, uno que mostró una rápida inactivación ($\tau = 49 \pm 4$ ms) y que corresponde al 90% de la actividad GABAérgica y un componente de inactivación lenta ($\tau = 114 \pm 21$ ms) y que correspondió al restante 10% de la actividad GABAérgica. Estos mismos componentes fueron observados en neuronas hipocámpales registradas en rebanadas de cerebro donde la inactivación del componente rápido presentó $\tau = 30 \pm 4$ ms y que correspondió al 83% de la transmisión GABAérgica, mientras que el componente lento tuvo $\tau = 120 \pm 18$ ms y que conformó el restante 17%.
- Mediante ensayos de RT-PCR mostramos que las tres subunidades GABA ρ (ρ 1-3) se expresan en el hipocampo, aunque la subunidad GABA ρ 3 expresada escasamente. Ensayos de hibridación *in situ* indicaron que la expresión se localiza en las áreas CA1-3 (en somas y procesos de células piramidales e interneuronas), giro dentado (células de las capas granular, molecular y polimórfica) y el subiculum (células esparcidas).
- Ensayos de inmunohistoquímica en cortes sagitales de cerebro de ratón mostraron que GABA ρ 1 se expresa en somas y procesos de las áreas CA1 y CA2 y en menor proporción en somas y procesos de la región CA3; mientras que GABA ρ 2 está presente en las tres áreas del *cornu ammonis*. El ensayo también mostró que ambas subunidades se expresan en el subiculum y de manera interesante fueron localizadas

en las capas polimórfica y molecular, no así en la capa granular donde habíamos localizado la expresión de los mensajeros mediante análisis de ISH.

- La microscopía electrónica de transmisión acoplada al uso de inmuno-oro indicó que los receptores GABA ρ tienen una ubicación preferencialmente extrasináptica y que 3 de 20 regiones sinápticas expresan una o ambas subunidades.
- Adicionalmente, mediante análisis de RT-PCR e inmunofluorescencia encontramos la expresión de los receptores en las áreas anteriores y posteriores de los núcleos basomedial y posteromedial cortical de la amígdala y en el área medio-medial y medio-lateral de la corteza visual secundaria de ratón.

Discusión

La localización de las s-GABA ρ ha sido descrita en diversas áreas del SNC de diferentes especies, la localización específica en el neocóstriado permanecía aún desconocida. En el presente reporte se aportó nueva información sobre su distribución, identidad neuroquímica de las neuronas que las expresan y localización sináptica de este componente GABAérgico. Además en esta estructura se reportó una población de células GFAP positivas que expresan a los receptores. En la región hipocámpal determinamos que aquellas corrientes sinápticas espontáneas sensibles al TPMPA corresponden al componente GABA ρ y que este se localiza en diversas estructuras de la región hipocámpal (subiculum, hipocampo propio y giro dentado).

Existe evidencia no detallada que indica la expresión de mensajeros de las s-GABA ρ en el neocóstriado; estudios en pollos de edad postnatal P1 sugieren la expresión del ARNm de la s-GABA ρ 1 en el ectocóstriado (componente neocóstriatal en las aves) (Albrecht *et al.*, 1997). Hallazgos en mamíferos (López-Chávez *et al.*, 2005), indican que mediante RT-PCR se pueden localizar los transcritos de las subunidades GABA ρ 1 y ρ 2 en la cabeza del núcleo caudado bovino, estudio donde además se indicó que en esta estructura la s-GABA ρ 1 presenta una diversidad molecular que puede corresponder a la reportada previamente en la retina humana (Martínez-Torres *et al.*, 1998). Referente a la expresión de ARNm, nuestros resultados mediante hibridación *in situ* indican que los ARNm de GABA ρ 1 como de GABA ρ 2 están presentes en diversas áreas del neocóstriado de ratón con relativa mayor abundancia en las regiones rostrales, ventrales y dorso-caudales. Además observamos que los ARNm se localizan tanto en el soma como en proyecciones que sugieren su expresión en la región dendrítica y axonal.

Diversos estudios han mostrado la expresión de los ARNm de las s-GABA ρ en el hipocampo (Wegelius *et al.*, 1998; Didelon *et al.*, 2002; Rozzo *et al.*, 2002); aunque solo había sido reportada la expresión en las áreas CA1, CA3 y giro dentado de la región hipocámpal (Wegelius *et al.*, 1998; Rozzo *et al.*, 2002). En el presente estudio mediante análisis de hibridación *in situ*, mostramos que los ARNm de la subunidad GABA ρ 1 y

GABA ρ 2 se localizan además en el área CA2 y el subiculum en una población de células segregadas. Consistente con los hallazgos, el análisis de inmunohistoquímica confirmó la expresión de ambas subunidades; sin embargo, pese a que los ARNm fueron detectados en la capa granular del giro dentado no fue detectada la presencia de las proteínas mediante análisis de inmunohistoquímica. Este fenómeno ha sido descrito previamente (Milligan *et al.*, 2004), y es probable que los anticuerpos no detecten al receptor cuando su expresión es baja.

La distribución de las s-GABA ρ en el núcleo caudado bovino fue reportada en células poligonales y fusiformes dispersas en la región interna de la cabeza del núcleo caudado (Rosas-Arellano *et al.*, 2007); sin embargo, no se indicó la localización topográfica en toda la estructura. Consistente con nuestros hallazgos de hibridación *in situ*, en el presente estudio se ha determinado mediante inmunohistoquímica la localización GABA ρ 1 y ρ 2 en neuronas ubicadas principalmente en regiones rostrales, dorso-caudales y ventrales en el neocóstriado de ratón.

El neocóstriado contiene diversos tipos de neuronas de proyección e interneuronas, los cuales difieren en su conectividad, identidad neuroquímica y función en los ganglios de la base (Kawaguchi *et al.*, 1995). La expresión y distribución de otras subunidades GABA-A en el neocóstriado ha sido estudiada previamente (Fritschy y Moller, 1995), y se ha indicado la presencia de las subunidades α 1-5, β 2-3, γ 2 y δ , sugiriendo la posible combinación de estas subunidades tanto en la matriz como en el estrioso, además se indicó que la subunidad más abundante en regiones del estrioso y el extremo ventral (*fundus striati*) es la subunidad α 5 (Ade *et al.*, 2008). En nuestro estudio hemos determinado la presencia de las s-GABA ρ 1 y ρ 2 en todas las células que expresan calretinina y una población que expresan calbindina, en estas células es posible por una parte que se formen homopentámeros y heteropentámeros de estas subunidades; y por otra, que en esta estructura también se puedan ubicar receptores híbridos conformados por subunidades GABA ρ 1- α 1, los cuales han sido reportados previamente en otras áreas del SNC (Milligan *et al.*, 2004; Harvey *et al.*, 2006; Frazao *et al.*, 2007).

Existe evidencia que indica que células colinérgicas expresan receptores de dopamina D2 (Alcantara *et al.*, 2003), sin embargo en el presente estudio no observamos evidencia de que células GFP positivas presenten la co-expresión ChAT-D2 (Fig. A3), la localización de la subunidad GABA ρ 2 en neuronas *drd2*-GFP muestra claramente que somas con diámetros menores a los 20 μ m están involucrados en la expresión. Respecto a la posible estequiometría de GABA ρ 2, que en el presente trabajo se ha localizado en un subgrupo de neuronas de proyección *Drd2* es muy probable que en estas células sólo forme homopentámeros ya que no se ha demostrado que co-ensamble con alguna otra subunidad que no sea la s-GABA ρ 1 (Feigespan *et al.*, 1993; Albrecht *et al.*, 1997; Enz y Cutting, 1999); sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de su ensamble con otras subunidades GABA-A. En resumen es posible que la s-GABA ρ 2 forme homopentámeros en células de proyección, mientras que en interneuronas donde co-localizan GABA ρ 1 y ρ 2 se formen heteropentámeros.

En relación a la presencia de GABA ρ 1 y ρ 2 en células calbindina y calretinina positivas se ha indicado que esta última población se caracteriza por localizarse de manera preferencial en regiones rostrales del neocórtico (Bennett y Bolam, 1993), misma región donde hemos localizado a estas células con expresión con GABA ρ . Por otra parte, aquellas que expresan calbindina y somatostatina no se distribuyen de manera específica en el neocórtico (Kawaguchi *et al.*, 1995), tal y como lo hemos observado en el presente estudio.

Un hallazgo inesperado fue la localización de las s-GABA ρ 1 y ρ 2 en células gliales en el córtico de ratón. Las células gliales producen GABA ya que se ha determinado que la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) se expresa en este tipo celular (Lee *et al.*, 2011); otros reportes indican que las células gliales expresan transportadores de GABA (Park *et al.*, 2009), así como diferentes combinaciones de receptores GABA de los cuales se ha sugerido que su activación puede iniciar la actividad de segundos mensajeros y conducir a la modificación de proteínas preexistentes o a la regulación de la tasa de expresión de nuevas proteínas, así como la participación en la plasticidad sináptica (Vélez-Fort *et al.*, 2011). Respecto a los receptores GABA ionotrópicos se ha sugerido la presencia

de las subunidades $\alpha 2$, $\alpha 3$ y δ en astrocitos de ratones de edad P5-P12; $\alpha 1$ y $\beta 1$ en el hipocampo (Fraser *et al.*, 1995) mientras que en los adultos se ha indicado la presencia de las subunidades $\alpha 2$ y $\gamma 1$ en la glia de Bergmann del cerebelo (Riquelme *et al.*, 2002). También se ha reportado en el cerebelo de ratas neonatales que los ARNm de las subunidades $\alpha 1-5$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$ y δ están presentes en células gliales (Bovolin *et al.*, 1992). En el presente estudio mediante análisis en tejido de doble inmunohistoquímica y doble inmunocitoquímica en células gliales en cultivo, hemos mostrado la co-expresión de las s-GABA $\rho 1$ y $\rho 2$ con el marcador GFAP. Es posible que la presencia de estas subunidades en el sistema glial permitan diversas actividades como se ha descrito en el cerebelo: una actividad coordinada con las neuronas neocóstriales en respuesta a la liberación de GABA, funcionando como un sensor GABAérgico para señalización de cambios morfológicos de células gliales o estimulando el desarrollo de dendritas, como se ha descrito para otras subunidades GABA-A (Matsutani y Yamamoto, 1997; Matsutani y Yamamoto, 1998). Respecto a la expresión de subunidades GABA ρ en células gliales se ha reportado recientemente que astrocitos en cultivo de cerebelo de ratón expresan GABA $\rho 2$ (Martínez-Delgado *et al.*, 2011). En nuestro laboratorio existen otros indicios de la expresión de GABA ρ en células gliales, por ejemplo en células gliales en cultivo se ha demostrado la expresión de las s-GABA $\rho 1$ y $\rho 2$ a nivel de RT-PCR e inmunocitoquímica y adicionalmente se ha demostrado su funcionalidad mediante análisis electrofisiológico (Petritz-Reyes, 2011). Además en tejidos obtenidos de ratones CD1 adultos se ha demostrado mediante análisis de RT-PCR, hibridación *in situ*, e inmunohistoquímica que células gliales de la región limitante del cuarto ventrículo expresan GABA $\rho 1$ y $\rho 2$ (González-González, 2011). Estos estudios en conjunto con los nuestros evidencian que células de identidad glial expresan las s-GABA ρ . Diversos estudios deberán realizarse para determinar el papel funcional, estequiometría y tipos específicos de células gliales que expresan a estos receptores.

Mediante análisis de microscopía electrónica e inmuno-oro mostramos que aproximadamente en 1 de cada 50 sinapsis en el neocóstriado y 3 de cada 20 en el área CA1 del hipocampo presentan las s-GABA $\rho 1$ y $\rho 2$. Su función en estas regiones es muy

posible de carácter tónico inhibitorio, como se ha propuesto para otras subunidades tónicas GABA-A ($\alpha 5$, $\beta 3$ y δ). (Pirker *et al.*, 2000; Schwarzer *et al.*, 2001; Ade *et al.*, 2008; Kaur *et al.*, 2009; Santhakumar *et al.*, 2010; Janssen *et al.*, 2011) y la s-GABA $\rho 1$ en el tallo cerebral de ratón (Milligan *et al.*, 2004). Diversos estudios han mostrado la localización del receptor en posiciones peri, extra y sináptica; por ejemplo se ha reportado a la s-GABA $\rho 1$ en la región perisináptica, sola o en combinación con la s-GABA $\alpha 1$ en neuronas del núcleo vagal dorsal en el tallo cerebral de rata (Milligan *et al.*, 2004); también se ha indicado que las s-GABA ρ pueden presentarse en las regiones extrasinápticas en conos, bastones y células bipolares de la retina de rata (Koulen *et al.*, 1997); además se ha mostrado que las s-GABA $\rho 1$ y $\rho 2$ se localizan sináptica y extrasinápticamente en células de Purkinje en el cerebelo de rata (Mejía *et al.*, 2008).

La localización extrasináptica de receptores con alta afinidad al GABA y con actividad tónica inhibitoria ya ha sido reportada en el neocórtico, en esta estructura se ha indicado la presencia de receptores conformados por subunidades $\alpha 5$, $\beta 3$ y δ (Banard *et al.*, 1998; Pirker *et al.*, 2000; Schwarzer *et al.*, 2001; Ade *et al.*, 2008; Kaur *et al.*, 2009; Santhakumar *et al.*, 2010; Janssen *et al.*, 2011), estas subunidades presentan una EC₅₀ a GABA menor que la de las s-GABA ρ (0.3 - 0.7 μ M de GABA) (Farrant y Nusser, 2005). Mientras que en el hipocampo además de las s-GABA ρ han sido descritas subunidades GABA $\alpha 5$ y δ con actividad inhibitoria tónica en el área CA1 (Glykys *et al.*, 2008). Además se tiene evidencia de la presencia de receptores tónicos GABA-A en células granulares del giro dentado (Nusser y Mody 2002; Overstreet y Westbrook 2001). Estos estudios en conjunto con nuestros resultados sugieren la participación sináptica de las s-GABA ρ en diversas ubicaciones; en ellas pueden funcionar en la despolarización prolongada o como un sensor de la difusión del neurotransmisor proveniente de regiones sinápticas, manteniendo así la concentración del neurotransmisor en un proceso de retroalimentación negativa en células GABAérgicas, cuando se ubica tanto a niveles extrasináptico como perisináptico y en la inhibición tónica en la densidad sináptica. De manera interesante se ha reportado que la inhibición tónica mediada por subunidades GABA-A proporciona protección celular a través de una inhibición persistente,

disminuyendo el daño y la muerte celular (Ade *et al.*, 2008; Santhakumar *et al.*, 2010; Janssen *et al.*, 2011). Mientras que en regiones sinápticas pueden participar en la actividad espontánea como ya se ha demostrado en el hipocampo (Rosas-Arellano *et al.*, 2011), en esta ubicación estratégica pueden proporcionar una inhibición prolongada que impida el inicio de potenciales de acción cuando vías vecinas son activadas.

Estudios electrofisiológicos donde se evidencie la actividad de receptores peri y extrasinápticos mediante el bloqueo de la recaptura de GABA que permitan la difusión de este neurotransmisor y registros en rebanada en el neostriado que consideren la vía cortico-estriatal, tálamo-estriatal, pálido-estriatal, nigro-estriatal, estrio-cortical, estrio-nigral, estrio-subtalámica y estrio-palidal aportarían nueva evidencia sobre el papel funcional que tienen las s-GABA ρ en redes neuronales; sin embargo, por su localización puede jugar un papel en la inhibición tónica de interneuronas permitiendo en el neostriado una potenciación de la actividad de neuronas de proyección que extienden sus axones al globo pálido externo en el caso de las neuronas calbindina-GABA ρ . Sin embargo, aún no podemos sugerir la consecuencia que tendría esta inhibición en células calretinina-GABA ρ debido al desconocimiento en su conectividad. Por otra parte, en el caso de inhibir tónicamente a un subgrupo de neuronas Drd2 positivas mediante la activación de GABA ρ 2, se permitiría la actividad oscilatoria de los restantes subtipos Drd2 en un procesamiento de señalización selectiva.

También determinamos por microscopía electrónica que ambas subunidades se localizan tanto en la región pre como en la postsináptica. En ambas condiciones es posible que las subunidades permitan una despolarización prolongada; generando por una parte la inhibición en la liberación de GABA en el caso de las neuronas GABAérgicas o inhibiendo la liberación de otro tipo de neurotransmisor.

En el caso del neostriado es posible que la inhibición prolongada de interneuronas permita el disparo de las células espinosas; o inhiban un subgrupo de neuronas Drd2 en aquellas que expresan GABA ρ 2 y la subsecuente activación del disparo de neuronas ubicadas en el globo pálido externo. Diversos análisis deberán considerarse para

determinar por una parte, la vía involucrada en las células que expresan los receptores y por otra las consecuencias fisiológicas de esta modulación. Existen diversos estudios que describen la presencia de las subunidades en regiones pre y postsinápticas, algunos de estos indican que se les puede localizar en la región presináptica, por ejemplo en las células bipolares de la retina de ratas adultas, células en donde también se ha evidenciado su localización en regiones postsinápticas en ratas de edad postnatal P7 (Koulen *et al.*, 1997). Además, se ha reportado en el núcleo vagal dorsal en el tallo cerebral, que la s-GABA ρ 1 se encuentra en la membrana postsináptica (Milligan *et al.*, 2004). Finalmente, se ha evidenciado en el cerebelo que las regiones sinápticas de las dendritas de las células de Purkinje expresan GABA ρ 1 y ρ 2 sugiriendo la ubicación postsináptica (Mejía *et al.*, 2008).

Los hallazgos en el presente trabajo también muestran que la s-GABA ρ 2 es más abundante que la s-GABA ρ 1. Esta variación en la expresión de ambas subunidades ha sido bien documentada, por ejemplo Albrecht y cols., (1997) y Bormann (2000), indican que la subunidad GABA ρ 2 se expresa más que GABA ρ 1 y con distribución más amplia fuera de la retina, lo que además concuerda con los datos del presente estudio donde hemos localizado a esta subunidad en las mismas poblaciones neuronales que GABA ρ 1, pero además expresada independientemente en las células de proyección en el caso del neocórtico.

Respecto a la pregunta si GABA ρ 1 y ρ 2 pueden ser expresadas en un mismo tipo celular, en nuestro estudio se muestra mediante doble inmunofluorescencia e inmuno-oro que ambas subunidades se encuentran en neuronas neocórticas en el cerebro de ratón (Fig. A7). Así, existe una alta probabilidad de que formen la combinación GABA ρ 1- ρ 2 en interneuronas calbindina y calretinina positivas. Además, mostramos que la s-GABA ρ 2 está presente en un subgrupo de neuronas de proyección D2 positivas, donde es probable que existan homopentámeros de esta subunidad, ya que esta subunidad puede formar receptores funcionales. Será importante determinar el subtipo de población que expresa esta subunidad, para esclarecer su participación funcional.

Conclusiones

Con los resultados anteriores, se sugiere que:

- Los ARNm y las proteínas de GABA ρ 1 y ρ 2 están presentes en el neocóstriado e hipocampo de ratón.
- El análisis de inmunohistoquímica muestra que en el neocóstriado las neuronas que expresan GABA ρ 1 y ρ 2 se distribuyen preferencialmente en regiones dorso-posterior, ventro-posterior y fronto-medial del neocóstriado, mientras que en el complejo hipocámpal se localizan en el subiculum, hipocampo propio y en las capas polimórfica y molecular del giro dentado.
- Mediante análisis de inmunohistoquímica determinamos en el neocóstriado que una población con características morfológicas correspondientes a las neuronas de proyección y que expresan el receptor D2 de dopamina expresan GABA ρ 2, mientras que en un grupo de interneuronas calbindina positivas expresa a las subunidades GABA ρ 1 y GABA ρ 2. Por otra parte todas las células calretinina positivas expresan a ambas subunidades.
- El doble inmuno marcaje GABA ρ 1/GABA ρ 2 en el neocóstriado muestra que ambas subunidades se co-expresan en una misma neurona, hallazgo que confirmamos mediante inmuno oro donde observamos la presencia de estas proteínas tanto en somas como en regiones sinápticas.
- Este mismo análisis de inmuno-oro indica que ambas subunidades son expresadas en células del neocóstriado y sus terminales, así como en células hipocámpales, donde su localización es preferencialmente extra y perisináptica, en posiciones tanto de pre como de postsináptica.
- De manera interesante reportamos que un grupo de células GFAP positivas neocóstriatales expresan GABA ρ 1 y GABA ρ 2.

Otros resultados

Además, como se mencionó en la parte del método de inmunohistoquímica, en el presente estudio se utilizó el cerebro completo de ratón en vista lateral, esta estrategia permitió determinar la distribución de GABA ρ 1 y ρ 2 en varias estructuras; estos resultados se muestran en la tabla No. 3 Mientras que en las figuras A8-A10 se presentan algunas de las fotomicrografías obtenidas.

TABLA No. 3
Localización mediante análisis de IHQ de las s-GABA ρ en el SNC

Estructura	Localización	GABA ρ 1	GABA ρ 2
Corteza	Motora primaria	-	+
	Motora secundaria	+	+
	Somatosensorial primaria	+	+
	Insular agranular	+	ND
	Entorrinal lateral	+	+
	Frontal de asociación	+	+
Bulbo Olfativo	Capa granular	+	+
	Capa glomerular	+	+
	Capa plexiforme externa	+	-
Hipotálamo	Lateral	+	ND
Colículo Inferior	Corteza externa	+	+
	Núcleo central	+	+
Pedúnculo Cerebeloso	Medio	+	-
Cerebelo	Núcleo interpuesto anterior	+	+
	Núcleo Interpuesto posterior	+	+
Tallo Cerebral	Núcleo vestibular medial	+	+
	Núcleo trigeminal espinal	-	+
	Núcleo paragiganto celular lateral	-	+
	Núcleo espinal vestibular	+	+
Zona Subventricular	Ventrículos laterales	+	+
	Cuarto ventrículo	ND	+
Plexo coroideo	Ventrículos laterales y cuarto ventrículo	+	+
Glia limitante perivascular	Cerebro completo	+	+

ND: No determinado

Perspectivas

En el presente trabajo se identificó la expresión de los GABA ρ en el neocóstriado e hipocampo de ratón en varias poblaciones celulares; sin embargo el aporte funcional a nivel de redes neuronales que confieren estas subunidades no ha sido abordado; por lo que estudios futuros mediante análisis electrofisiológicos definirán su papel. Además, se muestra evidencia de su expresión en células GFAP positivas, pero aún no se definen los subtipos gliales en las cuales se les ubica; por tanto deben ser realizados análisis específicos de identidad glial, seguidos de análisis funcional en este tipo celular. Finalmente estudios de trazado neuronal retrogrado iniciando en el globo externo, seguido de la inmunolocalización de GABA ρ 2 evidenciarán la vía en la que participa este receptor.

La inhibición tónica es importante para la protección celular, mediante ésta se disminuye la hiperexcitabilidad. Fenómenos de desequilibrio entre la inhibición y excitación son comunes en diversos desórdenes neuronales incluyendo el Parkinson. La enfermedad de Parkinson es causada en general por la degeneración de las neuronas dopaminérgicas y sus proyecciones nigro-estriatales. Estos cambios inducen cambios postsinápticos en neuronas medianas espinosas, produciendo hiperactividad celular, siendo la inhibición tónica un recurso de protección celular en esta condición. Considerando las características funcionales de las subunidades GABA ρ , es importante en un futuro explorar como puede estar relacionada la expresión de estas subunidades durante el transcurso de la enfermedad de Parkinson con la finalidad de considerarlas como posibles blancos farmacológicos que atenúen algunos signos y síntomas de la enfermedad.

Diversos estudios tales como qRT-PCR, hibridación *in situ*, etc., deberán realizarse para apoyar los hallazgos arrojados por el ensayo de inmunohistoquímica, en donde se encontraron al menos 23 áreas en las cuales no se ha reportado la presencia de las s-GABA ρ .

Otros artículos publicados

Martínez-Delgado G, Reyes-Haro D, Espino-Saldaña AE, **Rosas-Arellano A**, Pétriz A, Juárez-Mercado P, Miledi R, Martínez-Torres A. 2011. Dynamics of GABA ρ 2 receptors in retinal bipolar neurons and cerebellar astrocytes. *Neuroreport*. 2011. **22**, 4-9.

Se describe que los receptores GABA ρ son selectivamente dirigidos hacia el axón terminal de neuronas bipolares de la retina. El tráfico de una proteína quimérica: proteína verde fluorescente fusionada a GABA ρ 2 (GABA ρ 2-GFP), fue examinada en neuronas bipolares de retina y en astrocitos de cerebelo. Los resultados obtenidos mediante microscopía confocal indican que en las células bipolares que expresan la proteína quimérica GABA ρ 2-GFP, el receptor se distribuye en el soma y a lo largo del axón. Por otra parte en los astrocitos cerebelares, GABA ρ 2-GFP, fue observada relativamente inmóvil, principalmente ubicada en el soma y escasamente distribuida en los procesos de los astrocitos.

- Mejía C, García-Alcocer G, Berumen LC, **Rosas-Arellano A**, Miledi R, Martínez-Torres A. 2008. Expression of GABA ρ subunits during rat cerebellum development. *Neurosci Lett*. **432**, 1-6.

En este estudio se mostró evidencia de la expresión de las tres subunidades GABA ρ (ρ 1-3) a través de diferentes etapas del cerebelo en desarrollo. El estudio consistió en microinyectar ARNm en ovocitos de *Xenopus laevis*, que dio lugar a la expresión de receptores GABA-A, incluyendo GABA ρ . Por otra parte la qRT-PCR obtenida de ARN aislado de cerebelo postnatal, mostró que la expresión de cada subunidad es relativamente baja y que comparativamente se presenta de la siguiente forma: ρ 3 > ρ 1 > ρ 2. Mediante análisis de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica se distinguió una distribución limitada de los receptores en las células de Purkinje y neuronas de Golgi. Finalmente mediante ensayos de inmuno-oro y microscopía electrónica se detectó a las subunidades GABA ρ 1 y ρ 2 principalmente en posición peri y extrasináptica en el soma y árboles dendríticos de las células de Purkinje.

Dynamics of GABA ρ 2 receptors in retinal bipolar neurons and cerebellar astrocytes

Gustavo Martínez-Delgado, Daniel Reyes-Haro, Angeles E. Espino-Saldaña, Abraham Rosas-Arellano, Adriana Pétriz, Patricia Juárez-Mercado, Ricardo Miledi and Araulfo Martínez-Torres

Gamma-aminobutyric acid (GABA) ρ receptors are selectively targeted to the axon terminals of the retinal bipolar neurons. The traffic of a green fluorescent protein-tagged GABA ρ 2 was examined in retinal bipolar neurons and cerebellar astrocytes. In bipolar neurons, time-lapse laser confocal microscopy revealed that the fluorescence emitted by GABA ρ 2–green fluorescent protein accumulates first, in clusters, in the soma and is then distributed along the axon in at least two populations: one that remains relatively immobile and a second population of smaller clusters that moved constantly to and from the axon end. In astrocytes, the fluorescent clusters were relatively immobile and located mainly in the soma. *NeuroReport*

Introduction

Inotropic γ -aminobutyric acid (GABA) ρ receptors are widely distributed along the central nervous system with a predominant expression in the retina [1–3]. During early postnatal development, GABA ρ receptors are distributed diffusely in retinal bipolar neurons; later, they end clustered at the axon terminal to receive the GABAergic input from amacrine cells, and when activated they inhibit the release of glutamate from the bipolar neurons toward the ganglion cells, thus modulating the retina dynamic range, temporary resolution, and light contrast [4,5].

Detailed studies of the dynamic events that govern the selective targeting of GABA ρ receptors during ontogeny and in the mature retina are crucial to understand how they modulate signal processing and neuronal coding. So far, there is no clear evidence of how GABA ρ receptors are inserted into the cell plasma membrane, or of the molecular mechanisms that drive their location, number, and assembly.

To elucidate the traffic of GABA ρ receptors, we constructed an adenoviral vector carrying a gene fusion between the green fluorescent protein (GFP) and the GABA ρ 2 subunit [6]. The functional properties of the receptors expressed by this chimera were studied and their traffic was visualized in primary cultures of retinal cells, tracking the GFP-tagged receptors by time-lapse confocal microscopy. In addition, we compared the traffic and distribution of the GABA ρ 2 receptors in neurons of the retina and cerebellar astrocytes.

22:4–9 © 2010 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

NeuroReport 2011, 22:4–9

Keywords: axon targeting, patch clamp, voltage clamp, xenopus oocytes

Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular, Instituto de Neurobiología-UNAM, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, México

Correspondence to Araulfo Martínez-Torres, PhD, Departamento de Neurobiología Celular y Molecular, Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular, Instituto de Neurobiología-UNAM, Universidad Nacional Autónoma de México, Blvd. Universitario 3001, Campus UNAM-Juriquilla, Querétaro, CP 76230, México
Tel/fax: +52 442 2381064; e-mail: ataulfo@unam.mx

Received 6 July 2010 accepted 23 September 2010

Methods

Cell primary culture

Retinas of postnatal Wistar rats were used as described earlier [7]. The animals were anesthetized and euthanized according to the ethical policies for animal care and handling of Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Bipolar neurons were identified by their pearly soma, long axon, and arborized dendritic tree on the opposite end [3], and identified by anti-GABA ρ 2 immunofluorescence as described earlier for anti-GABA ρ 1 [8]. Cerebellar astrocyte primary cultures were obtained similar to those reported from corpus callosum [9].

Molecular biology and electrophysiology

The chimeric receptor was generated by cloning GABA ρ 2 [6] in pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, California, USA). The nuclei of *Xenopus* oocytes were injected with 20 ng of the plasmid and expression was assessed by two-microelectrode voltage clamp [10] and laser confocal microscopy. The replication-deficient adenovirus, AdGABA ρ 2–GFP, was generated using the pAdEasy system [11] and GABA currents recorded in the whole-cell patch clamp configuration [9] were obtained from HEK cells transduced with the virus.

Live cell confocal imaging

HEK cells, astrocytes, and bipolar neurons expressing AdGABA ρ 2–GFP or AdGFP were imaged by a laser scanning confocal microscope (LSM 510 META Zeiss, Göttingen, Germany) with 63 \times /1.4 NA or 40 \times /NA 1.35 oil immersion objectives. In most experiments the optical

slice (z dimension) was set to 1 or 2 μm . A receptor cluster was defined as being from 0.5–5 μm in diameter and 2–3-fold more intense than the diffuse background fluorescence. Data analysis was performed using Image J software 1.52 (NIH, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

Results

GABA ρ 2-GFP produces functional receptors

GABA ρ 2-GFP-mediated currents were recorded in oocytes (Fig. 1a), the GABA currents desensitized very little, even after prolonged exposures to 100 μM GABA and they were reversibly blocked by 10 μM of 1,2,5,6-tetrahydropyridin-4-yl methylphosphinic acid. Oocytes injected with GABA ρ 2-GFP showed a clear polarization of receptor distribution, with strong fluorescence in the animal hemisphere and faint or undetectable expression near the vegetal pole (Fig. 1b).

HEK cells infected with AdGABA ρ 2-GFP generated nondesensitizing GABA currents when exposed to several concentrations of the neurotransmitter (Fig. 1c), and the fluorescence emitted by those cells was observed in discrete compartments, in contrast to the homogenous distribution of soluble GFP (Fig. 1d–e).

GABA ρ 2-GFP in retinal cells and astrocytes

Six to 10 days after plating retinal immature cells, some neurons fitted well the morphological characteristics of bipolar and ganglion neurons [3,12] and immunocytochemistry with an anti-GABA ρ 2 evidenced the presence of the receptor in axon terminals (Fig. 2a) [13].

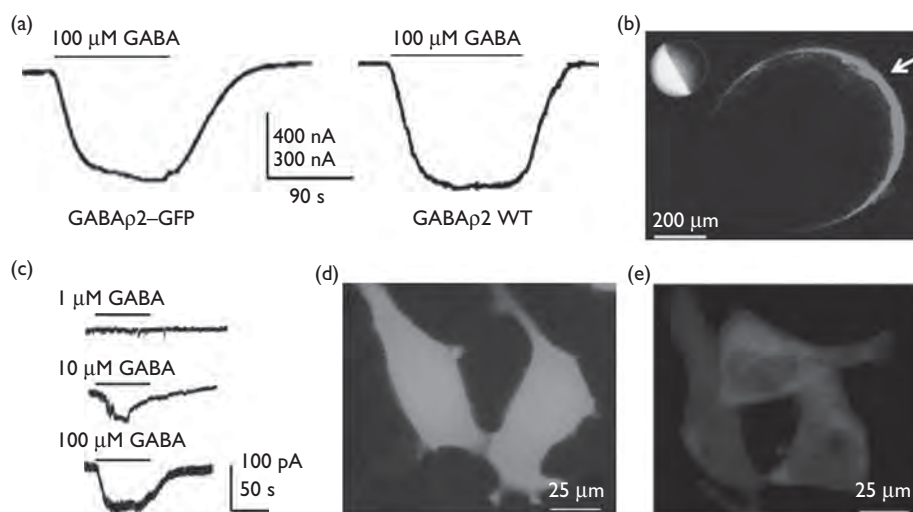
In bipolar neurons infected with AdGFP, the distribution of fluorescence was homogeneous, whereas it was clustered

in those infected with AdGABA ρ 2-GFP (Fig. 2b). To verify the targeting of GABA ρ 2-GFP expressed in the plasma membrane, we imaged infected cells that were stained by extracellular application of the red-emitting amphiphilic styryl dye, FM4-64, which allowed determining the extent of GABA ρ 2-GFP at the cell surface by overlapping of the red and green fluorescence (Fig. 2c). The accumulation of fluorescence produced by GABA ρ 2-GFP was time-dependent (Fig. 2c). The bipolar neurons expressing GABA ρ 2-GFP showed clusters of different sizes. The largest clusters accumulated around the nucleus and correspond to the space occupied by the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus (ranging from 2.5–4.5 μm of diameter with an average of $3.33 \mu\text{m} \pm 0.84$, eight neurons, Fig. 3a); whereas along the neuron hillock and the axon extension several fluorescent clusters (1.5–2 μm of diameter, average of $1.75 \mu\text{m} \pm 0.25$ from 267 clusters in 8 neurons) were stationary during the period recorded; whereas the smallest clusters (0.5–1.0 μm diameter, average 0.75 ± 0.35 from 1044 clusters in eight neurons), traveled anterogradely or retrogradely. In addition, we observed the presence of resting pools of fluorescent clusters (arrows in Fig. 3b).

The dynamics of the GABA ρ 2-GFP complexes showed a wide variability, and a maximal displacement of less than 1 μm was considered as immobile. The clusters were found mainly in the soma, around the nucleus, and their distribution extended to the axon, sometimes more than 100 μm from the soma (Fig. 3c).

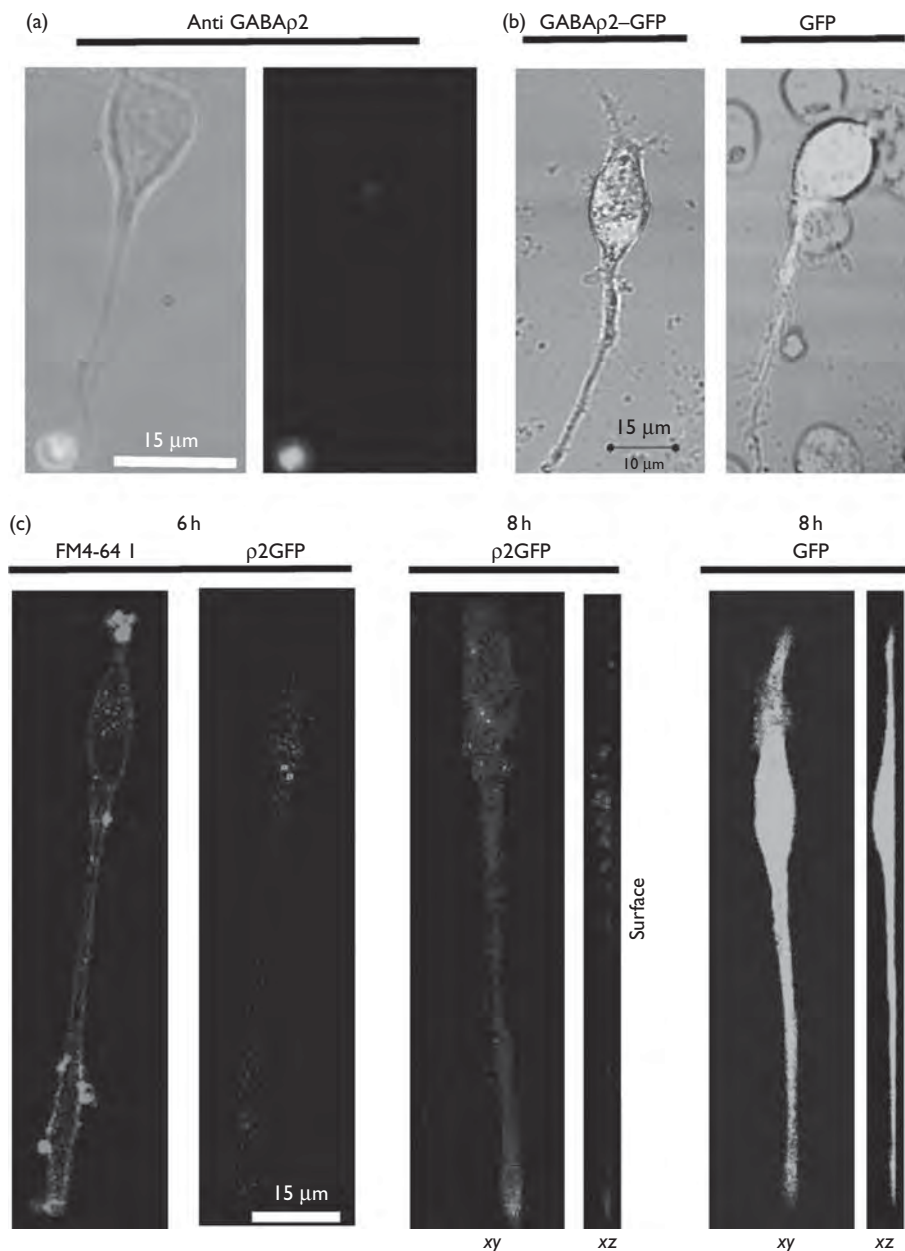
Immunocytochemistry in primary cultured astrocytes derived from the mouse cerebellum showed that these cells express GABA ρ 2 receptors that are located in the soma and in

Fig. 1



(a) Gamma-aminobutyric acid (GABA) currents generated by 100 μM GABA in oocytes. (b) GABA ρ 2-green fluorescent protein (GFP) fluorescence was located mainly at the animal hemisphere of the oocytes (arrow). (c) GABA currents of HEK cells expressing GABA ρ 2-GFP. (d) HEK cells infected with GFP. (e) HEK cells infected with AdGABA ρ 2-GFP.

Fig. 2



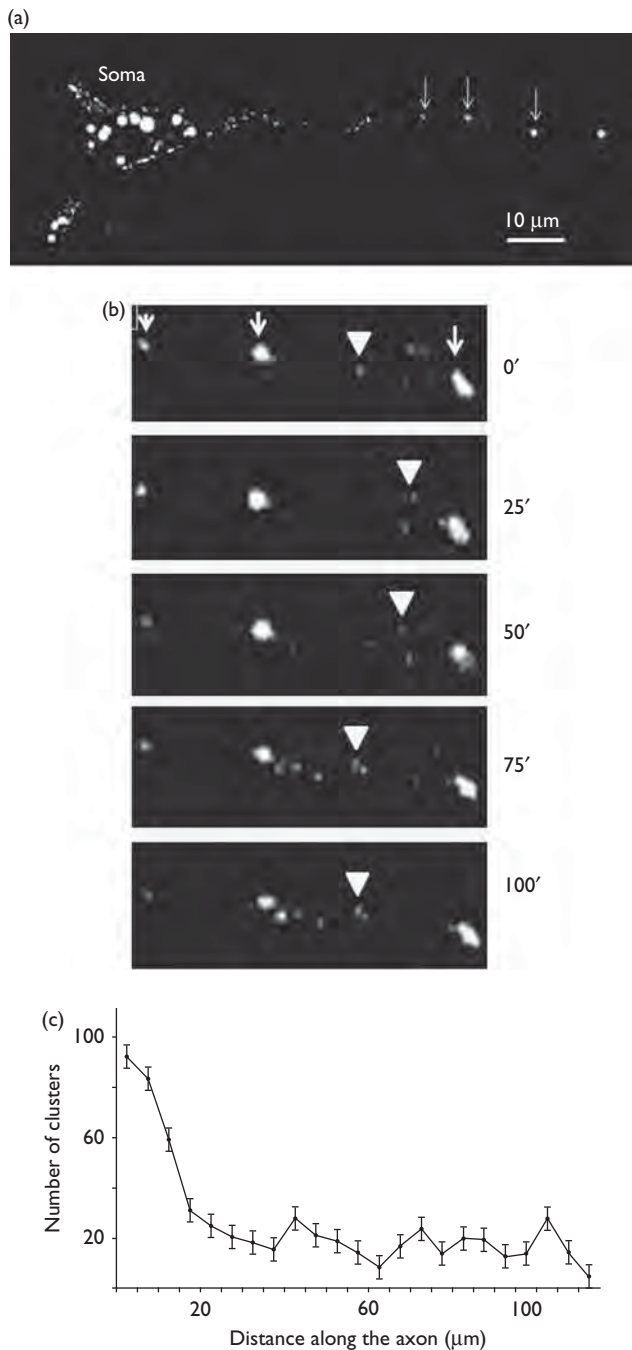
(a) Bipolar neurons *in vitro* were immunopositive for anti γ -aminobutyric acid (GABA) ρ located at the axon end. (b) Bipolar cells expressing GABA ρ 2- green fluorescent protein (GFP) or GFP. (c) FM4-64 shows the cell surface of a neuron infected with AdGABA ρ 2-GFP. After 8 h of infection, the fluorescence was evident in clusters located in the cell body and processes. Neurons expressing either GFP or GABA ρ 2-GFP are shown in the xy and xz planes to contrast the clustered distribution of the receptor with the homogenous fluorescence of GFP alone.

some clusters distributed to the proximal processes (Fig. 4a-c). In these cells, the GABA ρ 2-GFP chimera was found in clusters whose size was more uniform than that found in neurons, averaging $0.106 \pm 0.005 \mu\text{m}$ of diameter (343 clusters from nine cells). The distribution of the receptor contrasted with that of GFP, which was homogeneously distributed (Fig. 4d-e). Expression of the receptor was first observed in the soma and proximal segment of the processes, and only after 48 h a few clusters

were detected in distal processes. The distribution of fluorescent clusters shows that the number of clusters is larger around the soma. Finally, most of the clusters remained stationary during the image recordings with a maximal displacement of less than 1 μm .

Discussion

The functional expression of GFP-tagged GABA ρ 2 receptors showed that the basic electrophysiological

Fig. 3

(a) A neuron expressing γ -aminobutyric acid ρ 2-green fluorescent protein. The arrows point to the receptor clusters imaged during 100 min and shown in the panels in (b). The arrows point to the clusters with little or undetectable movement, whereas the arrowheads point to smaller clusters traveling along the axon. (c) Number of clusters in 5 μ m segments. Data are expressed as mean \pm SEM.

properties of the receptor were preserved, that is, they desensitized very little, were not blocked by bicuculline, and were antagonized by 1,2,5,6-tetrahydropyridin-4- γ l methylphosphinic acid [14].

Information was obtained about the traffic of GABA ρ 2 receptors in bipolar neurons and astrocytes. Average diameters of GABA ρ 2-GFP clusters traveling along the axon of bipolar cells were similar to those reported for glutamate and acetylcholine receptors [15,16]. However, there were clear differences between the average size of clusters found in the soma and those traveling to and from the axon. The dynamics of the clusters were also diverse, whereas the large clusters in the soma remained mostly static, trajectories followed by the small clusters (0.5–3 μ m) varied from periods of relatively fast movement to slow mobility. Some clusters even retraced their pathway during the period of observation. Interestingly, the velocity of moving GABA ρ 2-GFP clusters (-0.4μ m/s; data not shown) was similar to earlier studies on GABA ρ receptors in cultured neurons of the hippocampus [17].

This study describes the expression of GABA ρ receptors in astrocytes, and their electrophysiological and pharmacological characterization is still in process. The properties of protein traffic in astrocytes have recently begun to be studied for G-protein-coupled receptors [18]. We found that the size of the GABA ρ 2-GFP clusters was \sim 100 nm, similar to other studies of protein traffic in astrocytes [19,20]. Similarly, most of the GABA ρ 2-GFP clusters showed no clear directional selectivity, a behavior that is similar to that of CBR1 receptors in astrocytes [18].

The targeting of neurotransmitter receptors is subjected to regulation over time and is reactive to activity, but how newly synthesized receptors are incorporated into the synaptic buttons is still not well understood. Classic GABA ρ receptors are not inserted directly into the synaptic membrane, but are incorporated first in the juxtasympatic membrane and then moved by lateral diffusion until they reach their final synaptic location [21,22]. It remains to be determined whether GABA ρ receptors follow alternative pathways to their synaptic membrane sites.

Conclusion

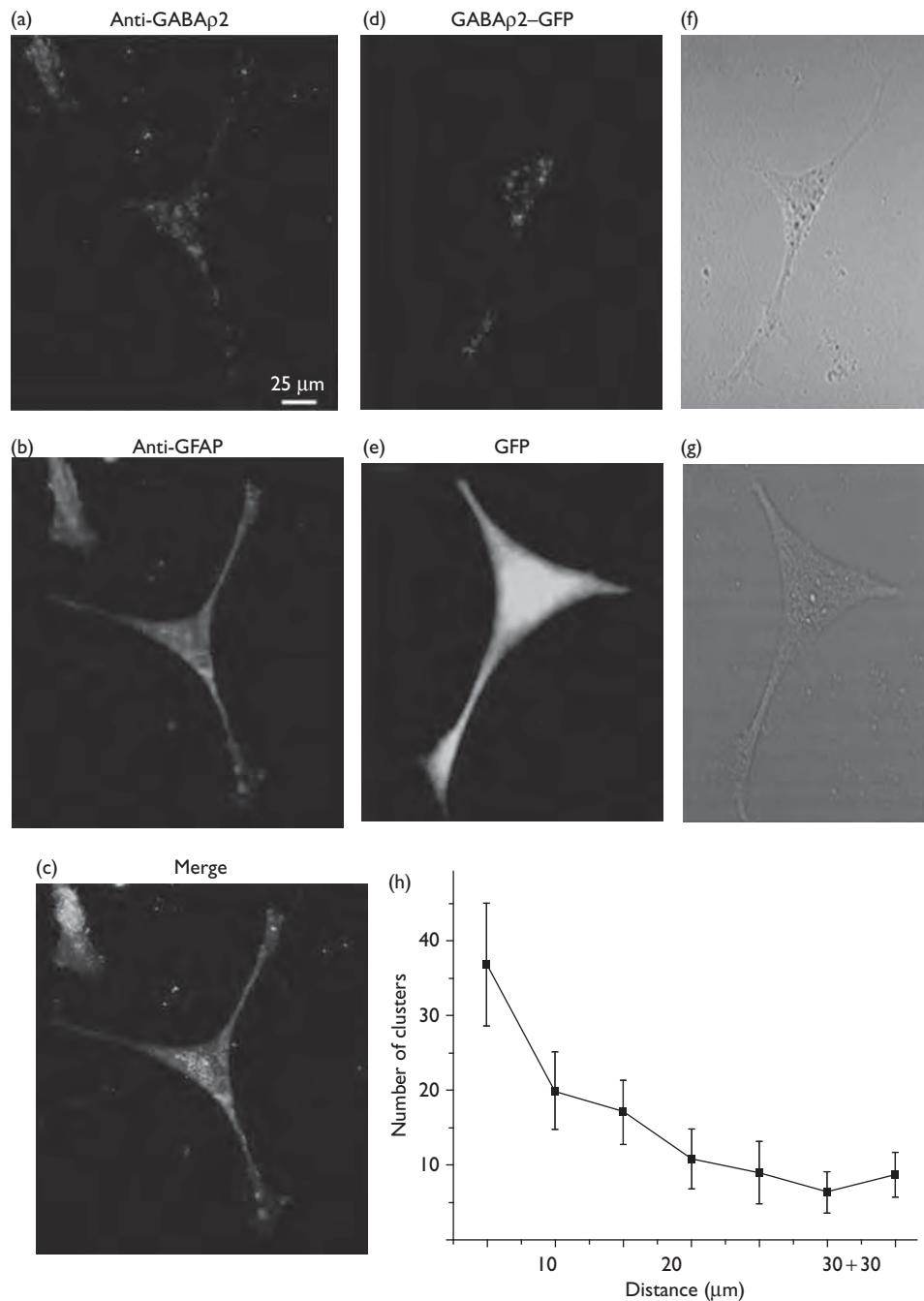
GABA ρ 2-GFP clusters were visualized in three major populations in bipolar neurons in culture: (i) large and static clusters around the nucleus, (ii) smaller dynamic clusters in the axon hillock, and (iii) highly dynamic small clusters along the axon.

GABA ρ 2 was found to be expressed in cerebellar astrocytes, in which they are found mainly in the soma as small static clusters whose displacement is less than 1 μ m/s.

Acknowledgements

The authors thank I.A. Martínez, F. Castro, D.M. Arzate, A.M. Lopez, E. Ruiz, A. Antaramian, N. Hernández, M. Servin and A. Limon for help with the paper. This study was supported by grants from PAPIIT-UNAM 202609 and 205308 (A.M.-T. and R.M.), CONACYT 101851 and 117888 (A.M.-T. and D.R.H.). G.M.D., A.R.A., A.P., P.J.M. were supported by fellowships from CONACYT. G.M.D. was supported by COMECYT.

Fig. 4



In-vitro expression of γ -aminobutyric acid (GABA) ρ 2 in glial fibrillary acidic protein (GFAP) positive astrocytes from cerebellum. Distribution of: GABA ρ 2 (a), GFAP (b), and merged (c). Expression of GABA ρ 2-green fluorescent protein (GFP) (d) or GFP (e) in astrocytes. (f) and (g) Corresponding differential interference contrast of the same cells. (h) Distribution of the GABA ρ 2-GFP fluorescence clusters along the astrocyte process.

References

- Polenzani L, Woodward RM, Miledi R. Expression of mammalian γ -aminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci* 1991; **88**:4318–4322.
- Cutting GR, Lu L, O'Hara BF, Kasch LM, Montrose-Rafizadeh C, Donovan DM, *et al*. Cloning of the γ -aminobutyric acid (GABA) ρ 1 cDNA: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. *Proc Natl Acad Sci* 1991; **88**:2673–2677.
- Enz R, Brandstätter JH, Wässle H, Bormann J. Immunocytochemical localization of the GABA ρ receptor ρ subunits in the mammalian retina. *J Neurosci* 1996; **16**:4479–4490.
- Sagdullaev BT, McCall MA, Lukasiewicz PD. Presynaptic inhibition modulates spillover, creating distinct dynamic response ranges of sensory output. *Neuron* 2006; **50**:923–935.
- Eggers ED, Lukasiewicz PD. Receptor and transmitter release properties set the time course of retinal inhibition. *J Neurosci* 2006; **26**:9413–9425.

- 6 Lopez-Chavez A, Miledi R, Martínez-Torres A. Cloning and functional expression of the bovine GABA_C ρ2 subunit molecular evidence of a widespread distribution in the CNS. *Neurosci Res* 2005; **53**:421–427.
- 7 Watanabe T, Voyvodic JT, Chan-Ling T, Sagara H, Hirosawa K, Mio Y, *et al.* Differentiation and morphogenesis in pellet cultures of developing rat retinal cells. *J Comp Neurol* 1997; **3**:341–350.
- 8 Rosas-Arellano A, Ochoa-de la Paz LD, Miledi R, Martínez-Torres A. Brain distribution and molecular cloning of the bovine GABA rho1 receptor. *Neurosci Res* 2007; **57**:347–353.
- 9 Reyes-Haro D, Miledi R, García-Colunga J. Potassium currents in primary cultured astrocytes from the rat corpus callosum. *J Neurocytol* 2005; **34**:411–420.
- 10 Miledi R. A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proc R Soc London Ser B* 1982; **215**:491–497.
- 11 He TC, Zhou SB, da Costa LT, Yu Y, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci* 1998; **95**:2509–2514.
- 12 Euler T, Wässle H. Immunocytochemical identification of cone bipolar cells in the rat retina. *J Comp Neurol* 1995; **361**:461–478.
- 13 Vaquero CF, de la Villa P. Localisation of the GABA_C receptors at the axon terminal of the rod bipolar cells of the mouse retina. *Neurosci Res* 1999; **35**:1–7.
- 14 Murata Y, Woodward RM, Miledi R, Overman LE. The first selective antagonist for a GABA_C receptor. *Biomed Chem Lett* 1998; **17**:2073–2076.
- 15 Pakkanen JS, Stenfors J, Jokitalo E, Tuominen RK. Effect of chronic nicotine treatment on localization of neuronal acetylcholine receptors at cellular level. *Synapse* 2006; **59**:383–393.
- 16 Pielage J, Fetter R, Davis W. A postsynaptic Spectrin scaffold defines active zone size, spacing, and efficacy at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Cell Biol* 2006; **175**:491–503.
- 17 Tweelvetrees AE, Yuen EY, Arancibia-Cárcamo IL, MacAskill AF, Rostaing P, Lumb MJ, *et al.* Delivery of GABA-A receptors to synapses is mediated by HAP1-KIF5 and disrupted by mutant Huntingtin. *Neuron* 2010; **65**:53–65.
- 18 Osborne KD, Lee W, Malarkey EB, Irving AJ, Parpura V. Dynamic imaging of cannabinoid receptor 1 vesicular trafficking in cultured astrocytes. *ASN Neuron* 2009; **1**:283–296.
- 19 Crippa D, Schenk U, Francolini M, Rosa P, Verderio C, Zonta M, *et al.* Synaptobrevin 2-expressing vesicles in rat astrocytes: insights into molecular characterization, dynamics and exocytosis. *J Physiol* 2006; **570**:567–582.
- 20 Potokar M, Kreft M, Panqrsic T, Zorec R. Vesicle mobility studied in cultured astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **329**:678–683.
- 21 Bogdanov Y, Michels G, Armstrong-Gold C, Haydon PG, Lindstrom J, Pangalos M, *et al.* Synaptic GABA receptors are directly recruited from their extrasynaptic counterparts. *EMBO J* 2006; **25**:4381–4389.
- 22 Jacob TC, Moss SJ, Jurd R. GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci* 2008; **9**:331–343.

Expression of GABA ρ subunits during rat cerebellum development

Carmen Mejía^a, Guadalupe García-Alcocer^b, Laura C. Berumen^b,
Abraham Rosas-Arellano^a, Ricardo Miledi^a, Ataúlfo Martínez-Torres^{a,*}

^a Instituto de Neurobiología, Departamento de Neurobiología Molecular y Celular, Universidad Nacional Autónoma de México-Campus Juriquilla, (Boulevard) Universitario 3001, Querétaro, 76230, Mexico

^b Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro Centro Universitario, 76010 Querétaro, México

Received 8 August 2007; received in revised form 2 November 2007; accepted 29 November 2007

Abstract

In the present study, we provide evidence for the expression of all three GABA_C receptor ρ subunits through development of the rat cerebellum. Injection of cerebellum mRNA into frog oocytes gave rise to the expression of both GABA_A and GABA_C receptors. qRT-PCR of RNA isolated from postnatal developing cerebella showed that the expression of each ρ subunit is relatively low, with a relative comparative expression of $\rho_3 > \rho_1 > \rho_2$. *In situ* hybridization and immunohistochemistry revealed a limited distribution of GABA_C receptors in the Purkinje and Golgi neurons whereas electron microscopy detected the ρ_1 and ρ_2 subunits in the soma and dendritic tree of the Purkinje cells.

The expression of GABA_C receptors in the cerebellum adds a new dimension to the regulation of GABAergic neurotransmission and suggests further experiments to determine their functional consequences.

© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Neurotransmitter receptor; Purkinje cell; qRT-PCR

In the adult central nervous system (CNS), the neurotransmitter γ -aminobutyric acid (GABA) is widely distributed, mediating inhibitory synaptic transmission and regulating the excitatory activity of neurons. The importance of GABAergic neurotransmission in the cerebellum is highlighted by the fact that four of five types of cerebellar cortex neurons: Purkinje, stellate, basket and Golgi, all release GABA [10,14].

GABA_A and GABA_B receptors are widely distributed in the cerebellum, where they play a central role in the inhibition of synaptic transmission [10,17,20]. On the other hand, GABA_C receptors are present mainly in the retina [16], where they are expressed in the bipolar neurons and upon activation they generate bicuculline-resistant, non-desensitizing Cl⁻ currents. Nevertheless, strong evidence indicates that GABA_C receptors are also expressed in several populations of brain neurons, where they may play significant functional roles, acting either alone or forming heteromeric receptors in combination with GABA_A subunits [3,9,15]. Thus, the unique functional and pharmacological properties of the GABA_C receptors [4,16,21,22] may give rise to synaptic characteristics not previously identified.

GABA_C receptors are formed by functional homo- or heteropentamers composed of ρ_1 , ρ_2 and/or ρ_3 subunits [7]. Although the distribution of the ρ subunit mRNAs in the adult brain has been studied using RT-PCR and *in situ* hybridization, information on the developmental regulation of the receptor in the brain is scattered and incomplete [3,8,15,18]. Alakuijala et al. [1] described the distribution of the three GABA_C subunits during postnatal development of the superior colliculus, lateral geniculate nucleus and hippocampus evidencing a temporal regulation of the genes encoding the GABA_C subunits.

Further evidence of the presence of GABA_C receptors in the bovine cerebellum was obtained by means of RT-PCR, *in situ* hybridization and GABA-current recordings [15]. More recently [12] GABA_C currents were recorded from Purkinje neurons, suggesting the existence of at least three populations of ionotropic GABA receptors: GABA_A, GABA_C and heteromeric receptors formed by GABA_A and GABA_C receptors. Therefore a full description of the cellular distribution of the subunits that form the GABA_C receptor now becomes necessary. In this study, we have combined functional expression of mRNA in frog oocytes, real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR), *in situ* hybridization, immunohistochemistry and electron microscopy to determine the developmental expression of the three GABA_C receptor ρ subunits in the rat cerebellum.

* Corresponding author. Tel.: +52 442 2381064; fax: +52 442 2381064.
E-mail address: ataulfo@inb.unam.mx (A. Martínez-Torres).

Table 1
Nucleotide sequence of primers used for qRT-PCR of the ρ subunits

Primers	Sequence	Fragment size
Rho1S	5'-TGGACAGCAGCTACAGTGACGG-3'	209
Rho1A	5'-AAGCAGCTGGGAAAATGATC-3'	
Rho2S	5'-AGAACCATGACGCTGGATGG-3'	248
Rho2A	5'-AACTATGTAGAAGCGAGGAAT-3'	
Rho3S	5'-TGACGGTGAGACTGACGTGGAC-3'	193
Rho3A	5'-CGGGGAAGACAATTCTAGAGTAGG-3'	
TubS	5'-CCAGATGCCAAGTGACAAGACC-3'	522
TubA	5'-GCCTCATTGTCTACCATGAAGC-3'	

The table shows the primer sequences and the size of the corresponding amplicons for GABA_C subunits as well as for the isoform-6 of human tubulin, used for quantitative PCR.

Wistar rats were anesthetized and sacrificed in compliance with protocols approved by the UNAM ethics committee. Cerebella were isolated, placed immediately in liquid nitrogen, and stored at -80 °C until processed.

100–200 mg of resected rat cerebellum at different ages (P1, P12, P18 and P60, n = 3), were processed using the Chomczynski and Sacchi (1987) method [5]. For each RNA extraction we used three cerebella of each stage, each preparation was repeated at least three times. Reverse transcription was performed with the Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, No. cat. 18064-014) and the cDNA was amplified with Taq DNA Polymerase (Invitrogen, No. cat. 11615-010). PolyA⁺ RNA from adult cerebella was selected by affinity chromatography using an oligo (dT) cellulose column.

Frogs were obtained from Nasco (Fort Atkinsons WI) and oocytes removed and processed as previously described [4,15]. The two-microelectrodes voltage-clamp technique was performed as previously described [4,15,16]. GABA and/or bicuculline were applied by bath perfusion while the oocyte plasma membrane was held at -60 or -80 mV.

Expression levels of GABA_C receptor subunit mRNAs (ρ 1, ρ 2 and ρ 3) were determined for the cerebellar RNA isolated from each age. The cDNA was synthesized and pooled into microtiter tubes containing cDNA from 100 μ g of total RNA. To determine the relationship between cycle number (C_t) and expression of each mRNA subunit, primers (Table 1) were calibrated by using serial dilutions of cDNA. In all cases, data from three inde-

pendently synthesized cDNA samples were collected and each amplification was carried out in duplicate. Reactions were performed with TAQurate GREEN Real Time PCR Master Mix enzyme (EPICENTRE TECHNOLOGIES, No. cat. TM046400) using α -tubulin as standard control. PCR amplifications were generated in an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). An amplification plot for each sample was generated showing the increase in fluorescence with each amplification cycle. The negative control (no reverse transcription) consistently showed no increase in fluorescence.

C_t values were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, as described in the user Bulletin 2 for the ABI Prism 7700 Sequence Detection System: Relative Quantification of Gene Expression Comparative C_t Method (Applied Biosystems, product no.4303859). As a reference control, we used the sum of values obtained from all subunits under examination; data are presented as number of copies of mRNA of each GABA_C subunit for postnatal days 1, 12, 18 and 60.

Whole adult cerebella were fixed in 3.5% paraformaldehyde in phosphate buffer saline (PBS), preserved in Superfrost Plus[®] media, frozen immediately and stored at -80 °C. *In situ* hybridization was performed on 12 μ m cryosections using the method described by the manufacturer (Roche). The ρ 1– ρ 3 probes correspond to the region encoding the large intracellular loop of each subunit, where the DNA nucleotide sequence is quite divergent. These fragments were obtained by RT-PCR and cloned into the plasmid pT7 (Novagen). Identity of the cloned fragments was corroborated by DNA sequencing. No hybridization was detected with the sense probe.

P1, P12, P18 and P60 male Wistar rats were anesthetized with sodium pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) and decapitated. The brains were rapidly removed and fixed overnight in 5% paraformaldehyde in PBS. The fixed tissues were stored in sucrose 30%/PBS at 4 °C overnight, immersed in tissue freezing medium and frozen at -80 °C. Sagittal sections were cut at 10 μ m on a cryostat, thaw mounted onto superfrost slides and stored at -20 °C. Sections on the glass slides were treated with methanol containing 0.3% H₂O₂ for 30 min, PBS for 10 min, 3% non-fat dry milk in PBS for 1 h and incubated overnight with antibodies against each of the GABA_C subunit, diluted 1:100 in PBS; ρ 1 (Santa Cruz, sc-16879), ρ 2 (Santa Cruz, sc-30254) and ρ 3 (Santa Cruz, sc-22362). After rinsing three times with PBS for 15 min, sections were treated with secondary antibody (diluted

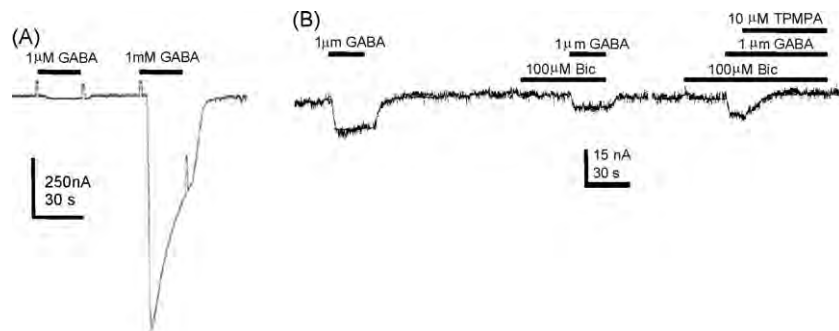


Fig. 1. Functional expression in *X. laevis* oocytes. (A) GABA-currents were mainly non-desensitizing due to activation of predominant GABA_A receptors. (B) The GABA-currents activated by 1 μ M GABA were mostly bicuculline-resistant and blocked by TPMPA. Oocytes were voltage-clamped at -60 mV (A) or -80 mV (B).

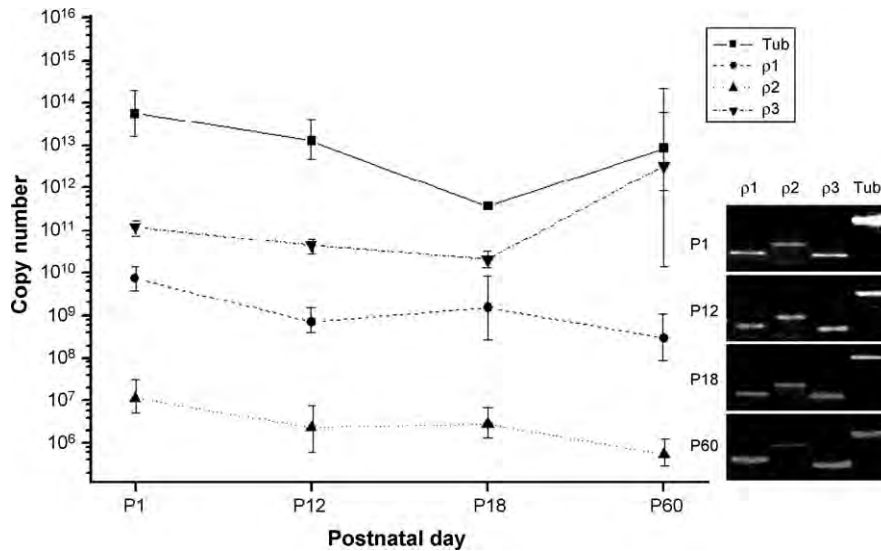


Fig. 2. qRT-PCR of GABA_C subunits. Three animals from separate litters were used for each age, and each data point was obtained in triplicate. For each subunit, the number of copies of mRNA is plotted from three separate experiments \pm S.E. Inset shows an agarose gel of the PCR products of ρ 1, ρ 2, ρ 3 and tubulin.

1:1000 in PBS, Santa Cruz, sc-2949) and developed with 3-3'-diaminobenzidine (DAB) tetrachloride with 0.02% hydrogen peroxide in PBS.

Male adult rats (60 days old) were anesthetized with an overdose of pentobarbital injected intraperitoneally and then perfused transcardially with 0.9% NaCl and the fixative solution (4% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde). The whole brain was removed and the region corresponding to the vermis cerebellosum was dissected, this was cut in coronal sections and fixed for 30 min in the same solution [6].

Sixty micrometers slices were washed three times in 0.1 M sodium cacodylate, pH 7.0, dehydrated in ethanol and encapsulated in gelatine, LR white resin was added and left to polymerize for 24 h at 60 °C, 500 nm slices were obtained with a glass knife to select an area that included the cerebellar cortex. Following, 60 nm slices were obtained in an ultramicrotome (MRC-MTXL) using a diamond point knife, the sections were placed in nickel grids covered with Formvar; washed twice with water and PBS and submerged in 0.5 M glycine in PBS, then washed again in PBS and incubated in 0.1% albumine and tween 20 in PBS. Unspecific sites were blocked with 5% albumine in PBS and incubated with the primary antibody (1:50 goat IgG anti-GABA ρ 1 or anti-GABA ρ 2, Santa Cruz Technologies); then washed three times in PBS and incubated with the secondary antibody (1:200 20 nm gold-conjugated rabbit anti-goat IgG, PELCO), finally the samples were dyed with 2% uranyl acetate and lead, rinsed and observed in the electronic microscope (JEOL JEM 1010) [19].

Injection in oocytes of cerebellum polyA⁺ RNA led to the expression of a large GABA_A component, averaging a current of 689 ± 116 nA (1 mM GABA) in 24 oocytes and seven independent injections. Fig. 1A, shows sample currents generated by an oocyte exposed to either 1 μ M or 1 mM GABA, revealing the fast desensitizing component, which is typical of GABA_A receptors. Including 100 μ M bicuculline to the medium bath while perfusing with 1 μ M GABA, a concentration similar to the GABA_C

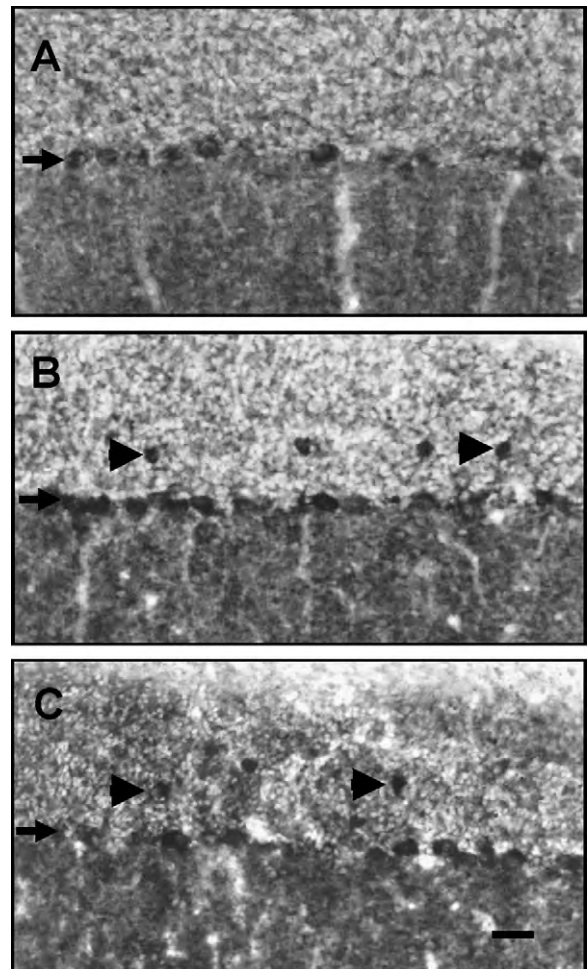


Fig. 3. *In situ* hybridization. ρ subunit mRNAs were localized to the cortical layer in the adult cerebellar cortex. Arrows point to positively labeled Purkinje cells, arrowheads indicate the Golgi neurons positive for ρ 2 and ρ 3. Bar = 50 μ m.

EC₅₀ [16], drastically reduced the GABA_A currents and evinced a small non-desensitizing GABA response (Fig. 1B); this remaining current is similar, although much smaller (5–17 nA), to that found in oocytes injected with retina polyA⁺ [16]. In addition, the bicuculline-resistant component was blocked when 10 μM TPMPA was included in the perfusion bath (Fig. 1B). Expression in oocytes clearly suggested that the RNA samples isolated from cerebellum contained a mixture of both GABA_A and GABA_C receptors; this observation prompted us to use RT-PCR, using the same RNA as template, to confirm or discard the presence of GABA_C subunits. The results showed that cerebellum RNA contain the three ρ subunits (not shown), and thus we decided to analyze the relative abundance of each GABA_C subunit mRNA in the adult as well as during cerebellar postnatal development.

The results shown in Fig. 2 indicate that expression of ρ1 and ρ2 remains fairly constant, without any large oscillations, whereas expression of ρ3 significantly increased during the adult life (P60). Of the three subunits, ρ3 predominated during cerebellar development and reached its highest expression at P60; whereas ρ1 and ρ2 showed the most regular expression. The ρ2 mRNA was constantly the less abundant of the three subunits and in all cases and ages the transcript for tubulin expressed more than the GABA_C. Therefore, in the adult and developing cerebellum the relative abundance of GABA_C receptor subunit mRNAs is ρ3 > ρ1 > ρ2. The low expression of ρ mRNAs is one

possible explanation for the small GABA_C currents found in the oocyte expression experiments, and may be due to a limited distribution of the receptor in the cerebellar neurons, thus we decided to determine where the corresponding GABA_C mRNAs and protein subunits are located.

Fig. 3A–C shows the detection of each subunit by *in situ* hybridization in the adult cerebellum. We found positive signal mainly along the cerebellar cortex and towards the Purkinje cell line and several cells that most possibly correspond to basket neurons; confirming what was previously found for ρ1 and ρ2 and providing additional evidence of the distribution of ρ3. In addition, using subunit specific antibodies, we found that most of the GABA_C receptor subunit expression is restricted to the cortical layers through postnatal development (Fig. 4) and most of the label was found in the Purkinje neurons.

Immunogold and electron microscopy indicated that the ρ1 and ρ2 subunits are located in the soma and dendritic tree of the Purkinje neurons, such as those illustrated in Fig. 5. Fig. 5A shows a postsynaptic density with some ρ1; however most of the positive marks for ρ1 and ρ2 were found in extrasynaptic sites and in the endoplasmic reticulum (Fig. 5B–D).

This report describes the temporal expression of the GABA_C receptor subunits during the development of the rat cerebellum. We provide evidence that mRNA isolated from cerebellum induced the expression of GABA_A and GABA_C receptors when expressed in frog oocytes and that all three GABA_C subunit

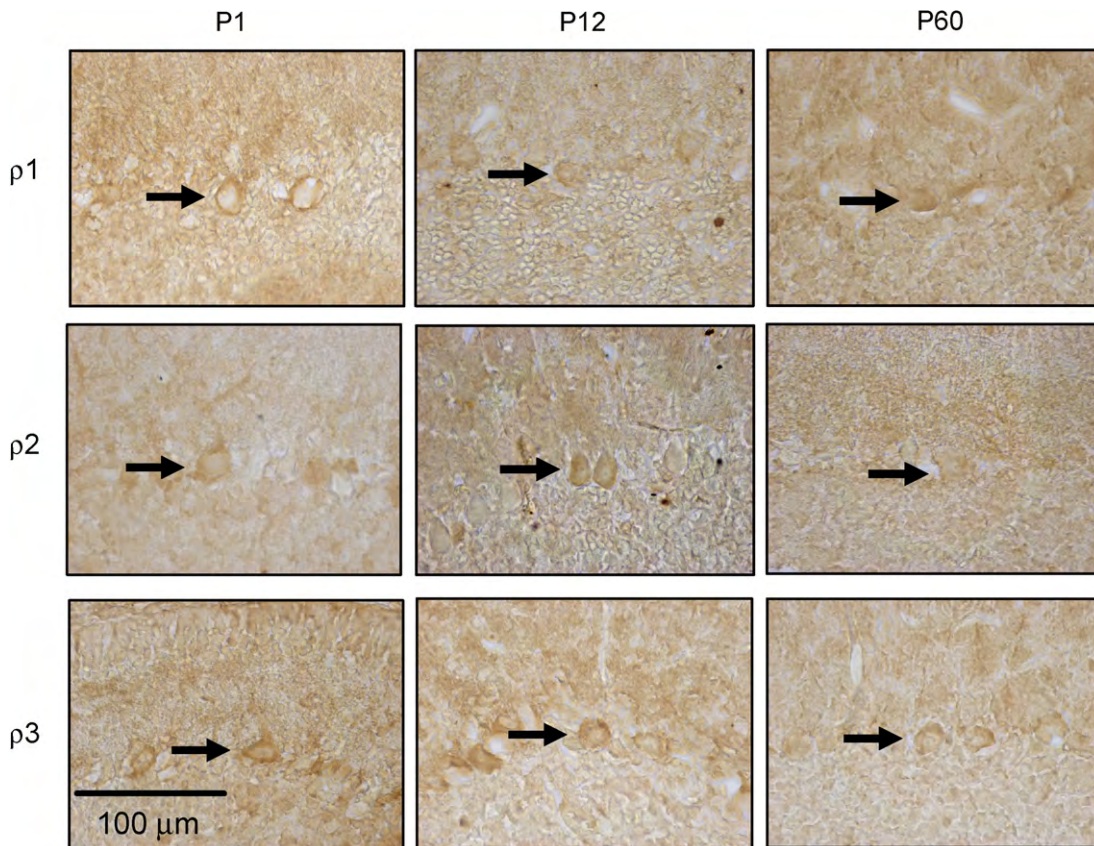


Fig. 4. Immunolocalization during postnatal development in cerebellar cortex. The three GABA_C subunits were found mainly along the cortical layers (arrows). The arrows point to the Purkinje cells.

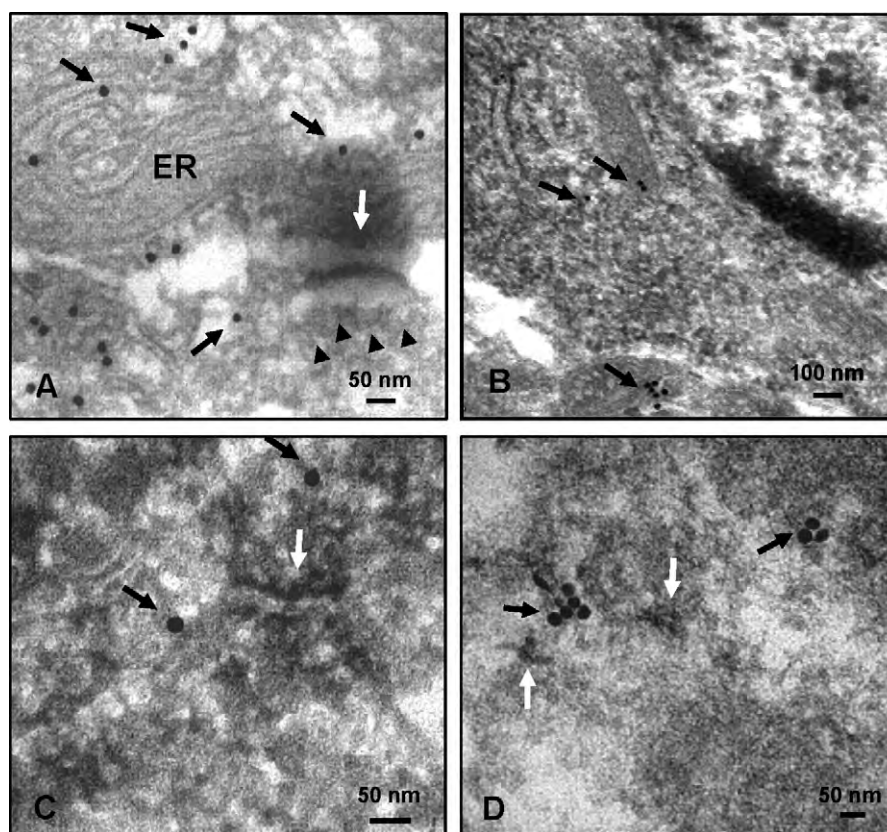


Fig. 5. Immunogold and electron microscopy. (A) The white arrow points to some $\rho 1$ label localized in a density of an axodendritic connection of one Purkinje cell. Arrowheads indicate presynaptic vesicles. However (A and B), most of the label (black arrows) was found in the extrasynaptic space and endoplasmic reticulum (ER). (C and D) $\rho 2$ was found in the proximal dendritic tree of the Purkinje neurons (black arrows) and was not detected in postsynaptic densities (white arrows).

mRNAs are expressed at relatively low levels. In addition, we determined that their mRNAs and corresponding proteins are located in the Purkinje and probably basket cells. Earlier experiments already showed that the injection of bovine cerebellar cortex mRNA into *X. laevis* oocytes induce the expression of functional GABA_C receptors [15] and other studies localized the $\rho 1$ and $\rho 2$ subunits to the Purkinje, Golgi and basket neurons of the cerebellar cortex [15,18]. Furthermore, functional evidence of GABA_C receptors was found recently by electrophysiological recordings in mouse Purkinje neurons [12].

To study the relative level of expression of the three GABA_C subunit mRNAs during development of the cerebellum we carried out qRT-PCR using RNA from four postnatal stages. Although the structural organization of the cerebellum is not completed until the second week after birth [13], we found expression of GABA_C subunit mRNAs through all the stages. The role and mechanisms of GABA neurotransmission during early cerebellar development is not completely known, although it may contribute important developmental cues, such as is the case for the glycine receptor in the photoreceptors and neocortex [11,24]. The presence of GABA_C receptors during early stages could represent a new potential role of neurotransmission regulation.

Previous observations suggested that GABA_r mRNA expression is regulated through retina development [23]. For example,

GABA_C transcripts were not detected in the new born or even before P7, suggesting a precise regulation of the expression of GABA_C receptors according to the differentiation of the retina neurons. In contrast, we observed GABA_C RNA expression in cerebellum since P1, an age at which the neuronal development of the cerebellum is still incomplete. Differences in the mRNA expression of the receptor may be due to a genetically regulated developmental program. Whether expression of GABA_C receptors is involved in these events is only speculative at the moment; nevertheless they may be related to GABA signals necessary for the proper neural wiring.

The expression of GABA_A and GABA_B receptors has been well documented in the Purkinje and Golgi neurons, where they provide modulatory actions on neuronal excitability and neurotransmitter release, in contrast little is known about the role played by GABA_C receptors in the cerebellar cortex circuitry. Harvey et al. [12] found a population of Purkinje cells expressing an ionotropic GABA receptor with mixed GABA_A/GABA_C pharmacology, suggesting a role in the phasic inhibitory transmission at interneurone-Purkinje cell synapses. This class of chimeric receptors has been found also in the neurons of the superior colliculus and pretectum [2]. In addition, Harvey et al. [12] localized the GABA_C receptors mainly in the soma of the Purkinje cells, a site of GABAergic contact of the basket cells axons that corresponds to the immunolabeling revealed by electron microscopy in our study.

Acknowledgements

We thank to Dr. I. Martínez-Dávila, E. Ruiz-Alcázar, M.L. Palma-Tirado and A.I Machuca-Parra for technical assistance. We are indebted with Dr. R. Arellano's laboratory (INB-UNAM) for the facilities. This work was supported by PAPIIT-UNAM IN228205 and CONACYT 550205.

References

- [1] A. Alakuijala, M. Palgi, K. Wegelius, M. Schmidt, R. Enz, L. Paulin, M. Saarna, M. Pasternack, GABA receptor ρ subunit expression in the developing rat brain, *Brain Res. Dev. Brain Res.* 154 (2005) 15–23.
- [2] M. Boller, M. Schmidt, GABAC receptors in the rat superior colliculus and pretectum participate in synaptic neurotransmission, *J. Neurophysiol.* 89 (2003) 2035–2045.
- [3] E. Boué-Grabot, M. Roudbaraki, L. Bascles, G. Tramu, B. Bloch, M. Garret, Expression of GABA receptor ρ subunits in rat brain, *J. Neurochem.* 70 (1998) 899–907.
- [4] D.J. Calvo, R. Miledi, Activation of GABA ρ 1 receptors by glycine and β -alanine, *Neuroreport* 6 (1995) 1118–1120.
- [5] M. Chebib, GABAC receptor ion channels, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 31 (1994) 800–804.
- [6] P. Chomczynski, N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction, *Anal. Biochem.* 162 (1997) 156–159.
- [7] L. Cintra, A. Aguilar, L. Granados, A. Galván, T. Kemper, W. Debassio, J. Galler, P. Morgan, P. Durán, S. Díaz-Cintra, Effects of prenatal protein malnutrition on hippocampal CA1 pyramidal cells in rats of four age groups, *Hippocampus* 7 (1997) 192–203.
- [8] F. Didelon, M. Sciancalepore, N. Savic', M. Mladinic', A. Bradbury, E. Cherubini, γ -Aminobutyric acid ρ receptor subunits in the developing rat hippocampus, *J. Neurosci. Res.* 67 (2002) 739–744.
- [9] R. Enz, G.R. Cutting, GABAC receptor ρ subunits are heterogeneously expressed in the human CNS and form homo- and heterooligomers with distinct physical properties, *Eur. J. Neurosci.* 11 (1999) 41–50.
- [10] M.L. Fiszman, Insights into GABA functions in the developing cerebellum, *Int. Rev. Neurobiol.* 71 (2005) 95–112.
- [11] A.C. Flint, X. Liu, A.R. Kriegstein, Nonsynaptic glycine receptor activation during early neocortical development, *Neuron* 20 (1998) 43–53.
- [12] V.L. Harvey, I.C. Duguid, C. Krasel, G.J. Stephens, Evidence that GABA ρ subunits contribute to functional ionotropic GABA receptors in mouse cerebellar Purkinje cells, *J. Physiol.* 577 (2006) 127–139.
- [13] M. Hatten, N. Heintz, Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum, *Annu. Rev. Neurosci.* 18 (1995) 385–408.
- [14] R. Llinas, K.D. Walton, *Cerebellum*, in: *The Synaptic Organization of the Brain*, Oxford University Press, Oxford, 1990.
- [15] A. López-Chavez, R. Miledi, A. Martínez-Torres, Cloning and functional expression of the bovine GABA ρ 2 subunit. Molecular evidence of a widespread distribution in the CNS, *Neurosci. Res.* 53 (2005) 421–427.
- [16] L. Polenzani, R.M. Woodward, R. Miledi, Expression of mammalian γ -aminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in *Xenopus* oocytes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 4318–4322.
- [17] R. Riquelme, C.P. Miralles, A.L. De Blas, Bergmann glia GABA-A receptors concentrate on the glial processes that wrap inhibitory synapses, *J. Neurosci.* 22 (2002) 10720–10730.
- [18] A. Rozzo, M. Armelin, J. Franzot, C. Chiaruttini, A. Nistri, E. Tongiorgi, Expression and dendritic mRNA localization of GABA ρ receptor ρ 1 and ρ 2 subunits in developing rat brain and spinal cord, *Eur. J. Neurosci.* 15 (2002) 1747–1758.
- [19] J. Ruiz-Herrera, B. Xoconostle-Cázares, C.G. Reynaga-Peña, C. León-Ramírez, A. Cárabez-Trejo, Immunolocalization of chitin synthases in the phytopathogenic dimorphic fungus *Ustilago maydis*, *FEMS Yeast Res.* 6 (2006) 999–1009.
- [20] C. Takayama, Formation of GABAergic synapses in the cerebellum, *Cerebellum* 4 (2005) 171–177.
- [21] R.M. Woodward, L. Polenzani, R. Miledi, Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive (ρ -like) γ -aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes. II. Pharmacology of γ -aminobutyric acidA and γ -aminobutyric acidB receptor agonists and antagonists, *Mol. Pharmacol.* 43 (1993) 609–625.
- [22] R.M. Woodward, L. Polenzani, R. Miledi, Characterization of bicuculline/baclofen-insensitive γ -aminobutyric acid receptors expressed in *Xenopus* oocytes. I. Effects of Cl⁻ channel inhibitors, *Mol. Pharmacol.* 42 (1992) 165–173.
- [23] Y. Wu, G.R. Cutting, Developmentally regulated expression of GABA receptor rho1 and rho2 subunits, L7 and cone-rod homeobox (CRX) genes in mouse retina, *Brain Res.* 912 (2001) 1–8.
- [24] T.L. Young, C.L. Cepko, A role for ligand-gated ion channels in rod photoreceptor development, *Neuron* 41 (2004) 867–879.

APÉNDICE

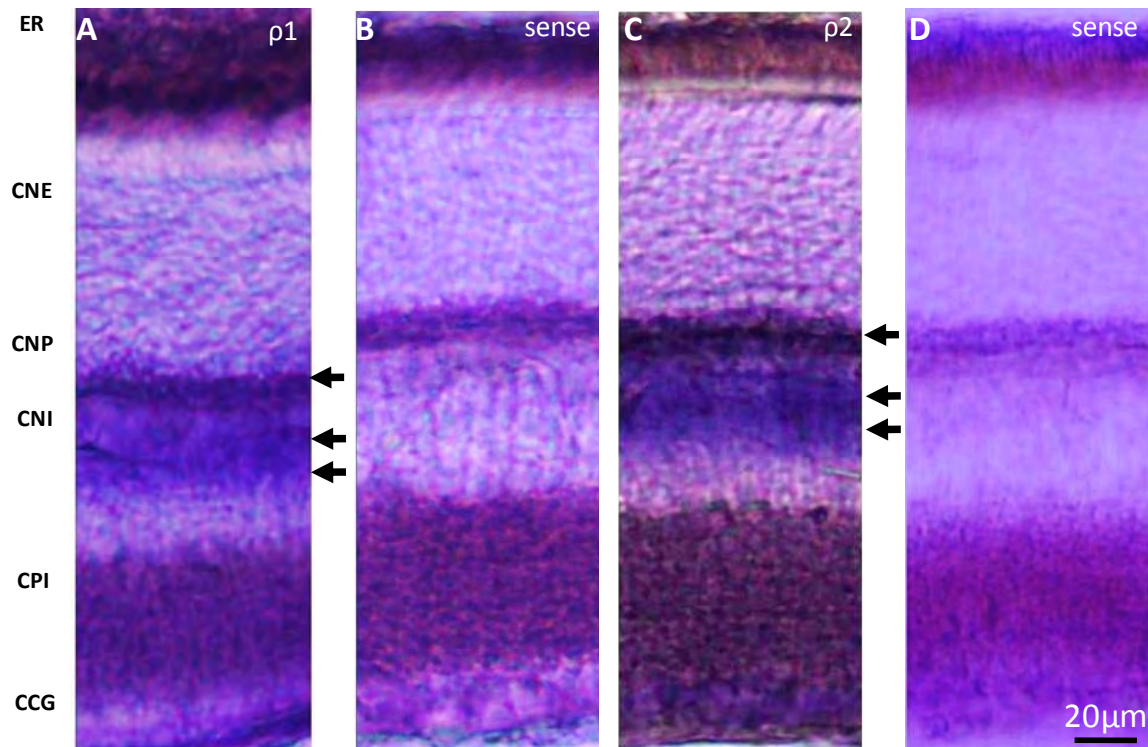


Figura A1. Hibridación *In situ* para las subunidades GABA ρ 1 y ρ 2 en la retina de ratón CD1. A y C. ARNm de GABA ρ 1 y ρ 2 fueron localizados en la capa plexiforme externa y en la capa plexiforme interna (CPI) (flechas). **B y D.** Muestras incubadas con sondas sentido para GABA ρ 1 y ρ 2 respectivamente. Abreviaciones ER: epitelio retiniano; CNE: capa nuclear externa; CPE: capa plexiforme externa; CNI: capa nuclear interna; CPI: capa plexiforme interna; CCG: capa de células ganglionares.

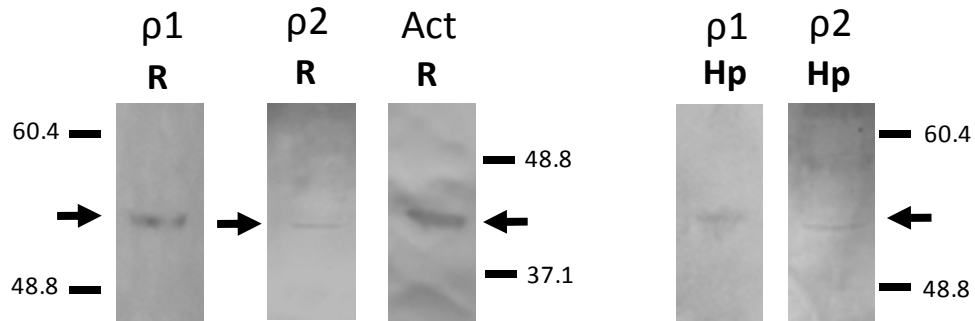


Figura A2. A. Western blot de GABA $\rho 1$, GABA $\rho 2$ y actina (Act) (control) (flechas) en extractos de retina de ratón (R). **B.** Detección de ambas subunidades en el hipocampo (Hp). Los números indican el peso molecular en kDa.

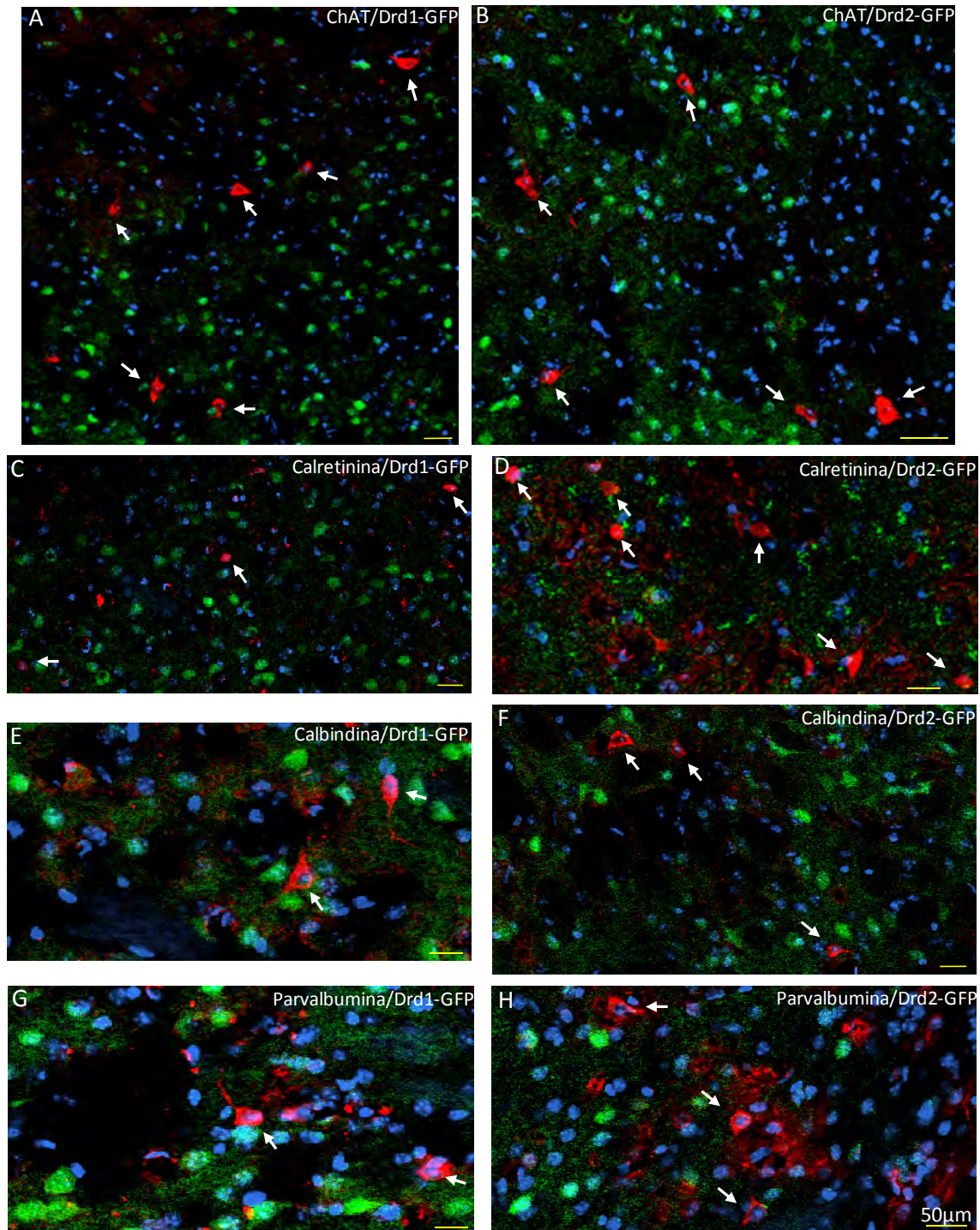


Figura A3. Inmunolocalización de los diferentes tipos de interneuronas en ratones transgénicos *Drd1-GFP* y *Drd2-GFP*. Las flechas muestran en coloración roja dada por Alexa 594 neuronas inmunorreactivas a: **A** y **B**. Colina acetiltransferasa (ChAT). **C** y **D**. Calretinina. **E** y **F**. Calbindina. **G** y **H**. Parvalbumina. Se observa que ninguna tinción Alexa 594 empalma con la coloración verde generada por GFP. Barras 50µm

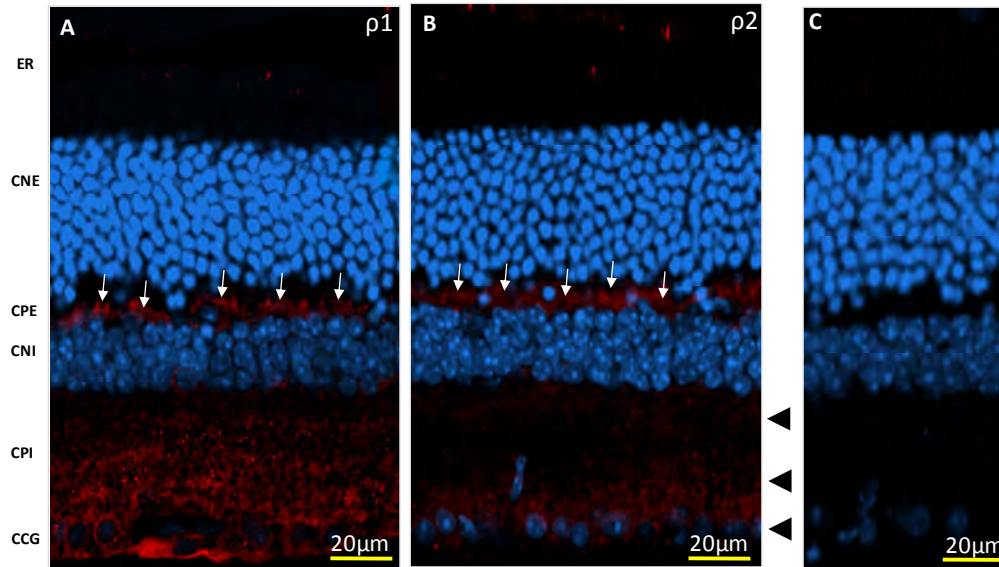


Figura A4. Inmunolocalización de las subunidades GABA ρ 1 y ρ 2 en la retina de ratón CD1. A. Inmunolocalización de la subunidad ρ 1 (rojo), las flechas muestran la región de las terminales de las células horizontales y dendritas de células bipolares. Las cabezas de flecha a la derecha de las imágenes B y C, indican su expresión en las capas plexiformes externa e interna. D. Localización de la subunidad ρ 2. C. Control donde se omitió la colocación del anticuerpo primario. El color azul es dado por la contratinción con DAPI. Abreviaciones ER: epitelio retiniano; CNE: capa nuclear externa; CPE: capa plexiforme externa; CNI: capa nuclear interna; CPI: capa plexiforme interna; CCG: capa de células ganglionares.

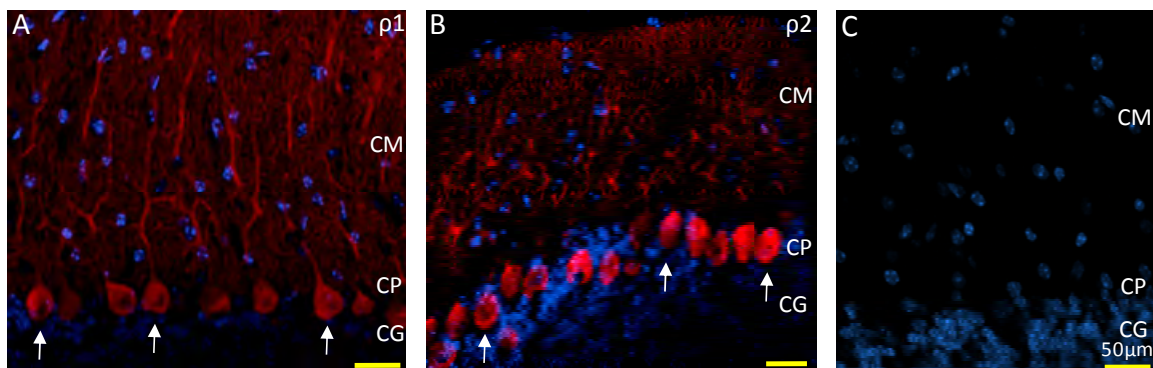


Figura A5. Inmunolocalización de las subunidades GABA ρ 1 y ρ 2 en el cerebelo de ratón CD1. A. Inmunolocalización de la subunidad ρ 1 (rojo) y B. subunidad ρ 2, las flechas muestran la de las células de Purkinje. C. Control donde se omitió la colocación del anticuerpo primario. El color azul es generado por la contratinción con DAPI. Abreviaciones CM: capa molecular; CP: capa de células de Purkinje; CG: capa ganglionar.

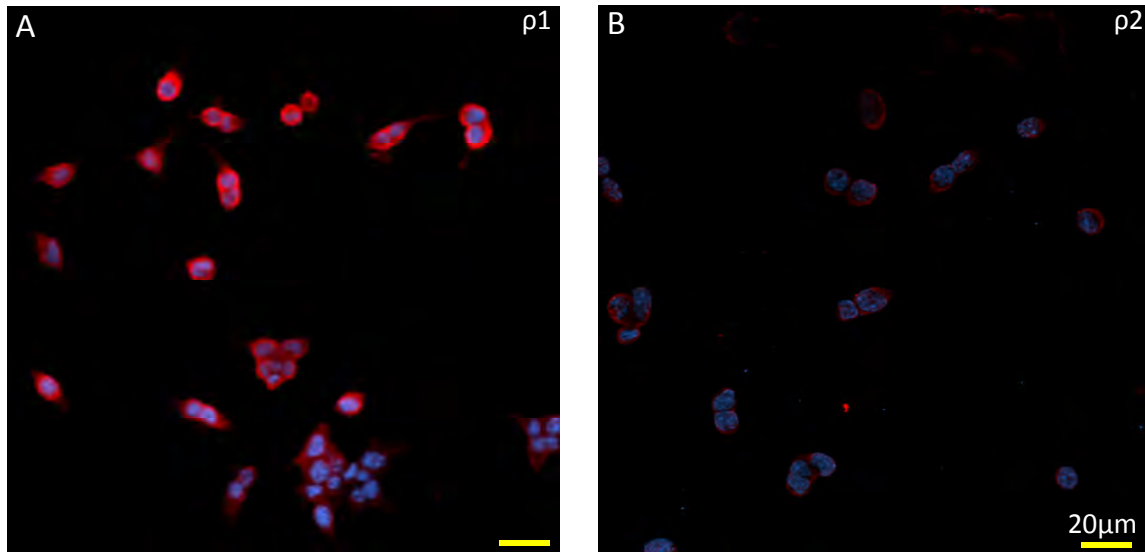


Figura A6. Localización de las subunidades GABA ρ 1 y ρ 2 en células STC-1. **A.** Expresión de la subunidad GABA ρ 1 y **B.** GABA ρ 2.

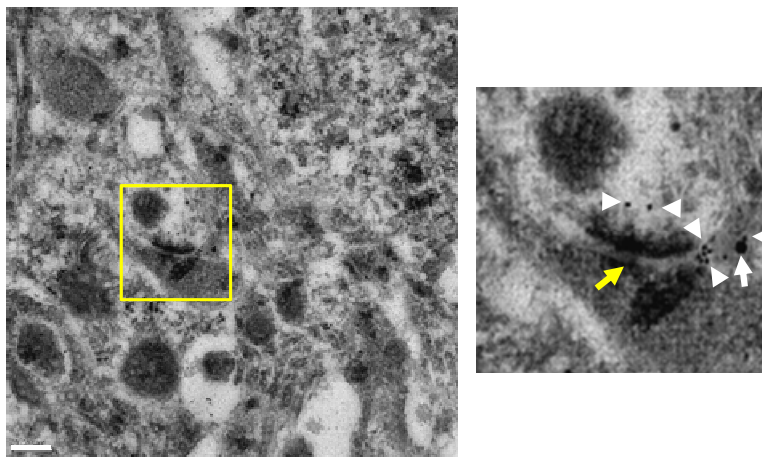


Figura A7. Co-localización de las subunidades GABA ρ 1 y GABA ρ 2 en el neocórtico de ratón. Se muestra una sinapsis asimétrica que es ampliada en la imagen derecha, donde las cabezas de flecha y flecha blanca indican la presencia de partículas de oro coloidal de 10 y 20nm que localizan a GABA ρ 2 y ρ 1 respectivamente. Flecha amarilla: región sináptica. Barra: 200nm.

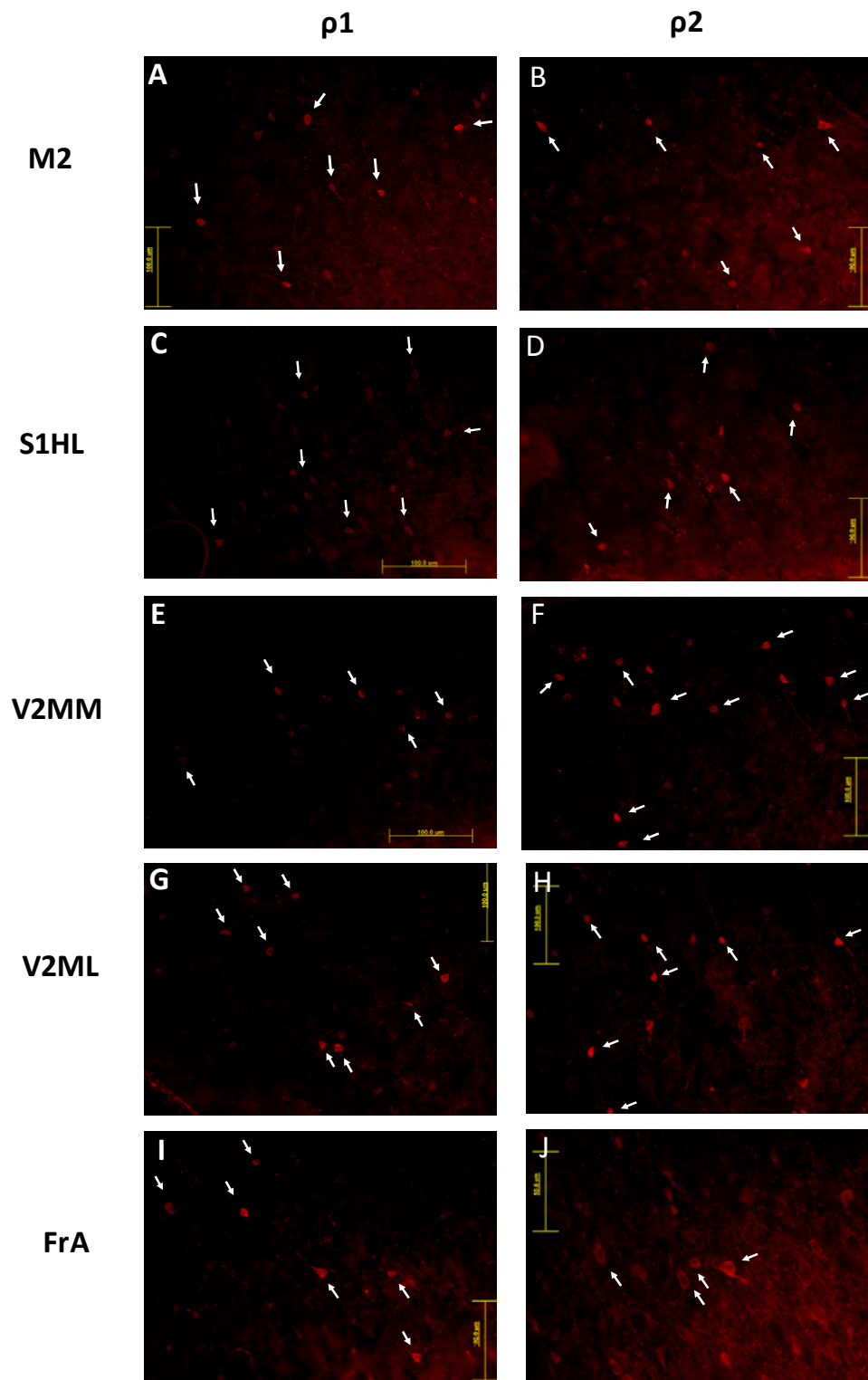


Figura A8. Localización de las subunidades GABA $\rho 1$ y $\rho 2$ en diversas áreas corticales en ratones CD1. Las flechas muestran somas con procesos positivos para ambas subunidades GABA ρ . Abreviaciones: M2: corteza motora secundaria; S1HL: corteza sensorial primaria, área de extremidades posteriores; V2MM: corteza visual secundaria medio medial; V2ML: corteza visual secundaria medio lateral; FrA: corteza frontal de asociación. Barras: 100 μ m

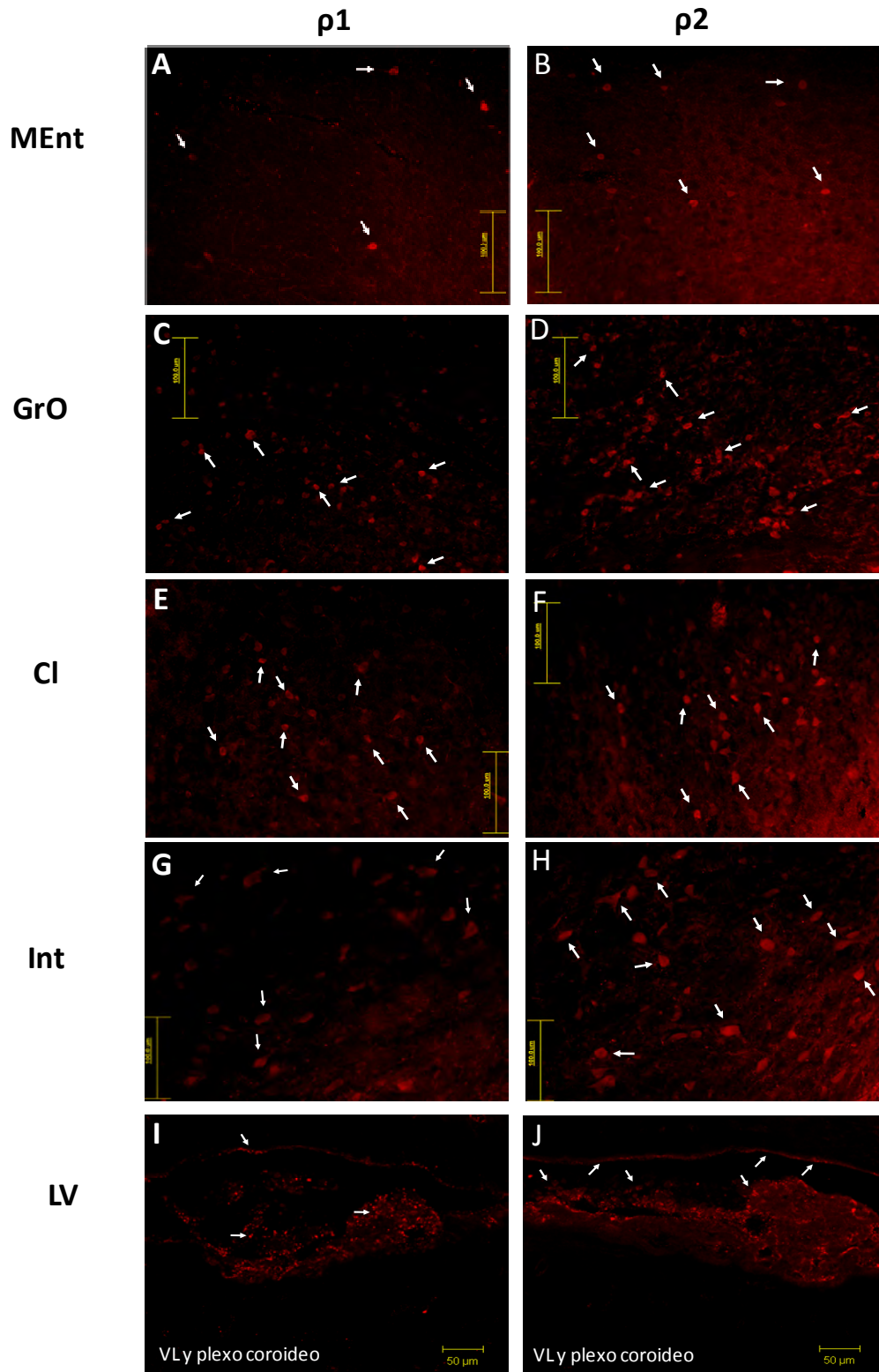


Figura A9. Localización de las subunidades GABA ρ 1 y ρ 2 en diversas áreas cerebrales en ratones CD1. Las flechas muestran somas con procesos positivos para ambas subunidades GABA ρ . En las figuras I y J se muestra localización de las subunidades en la región subventricular (flechas superiores) y en el plexo coroideo (flechas inferiores). Abreviaciones: MEnt: corteza entorrinal medial; GrO: capa de células granulares del bulbo olfativo; Cl: colículo inferior; Int: núcleo cerebelar interpuesto; VL: ventrículo lateral. Barras A-H: 100 μ m.

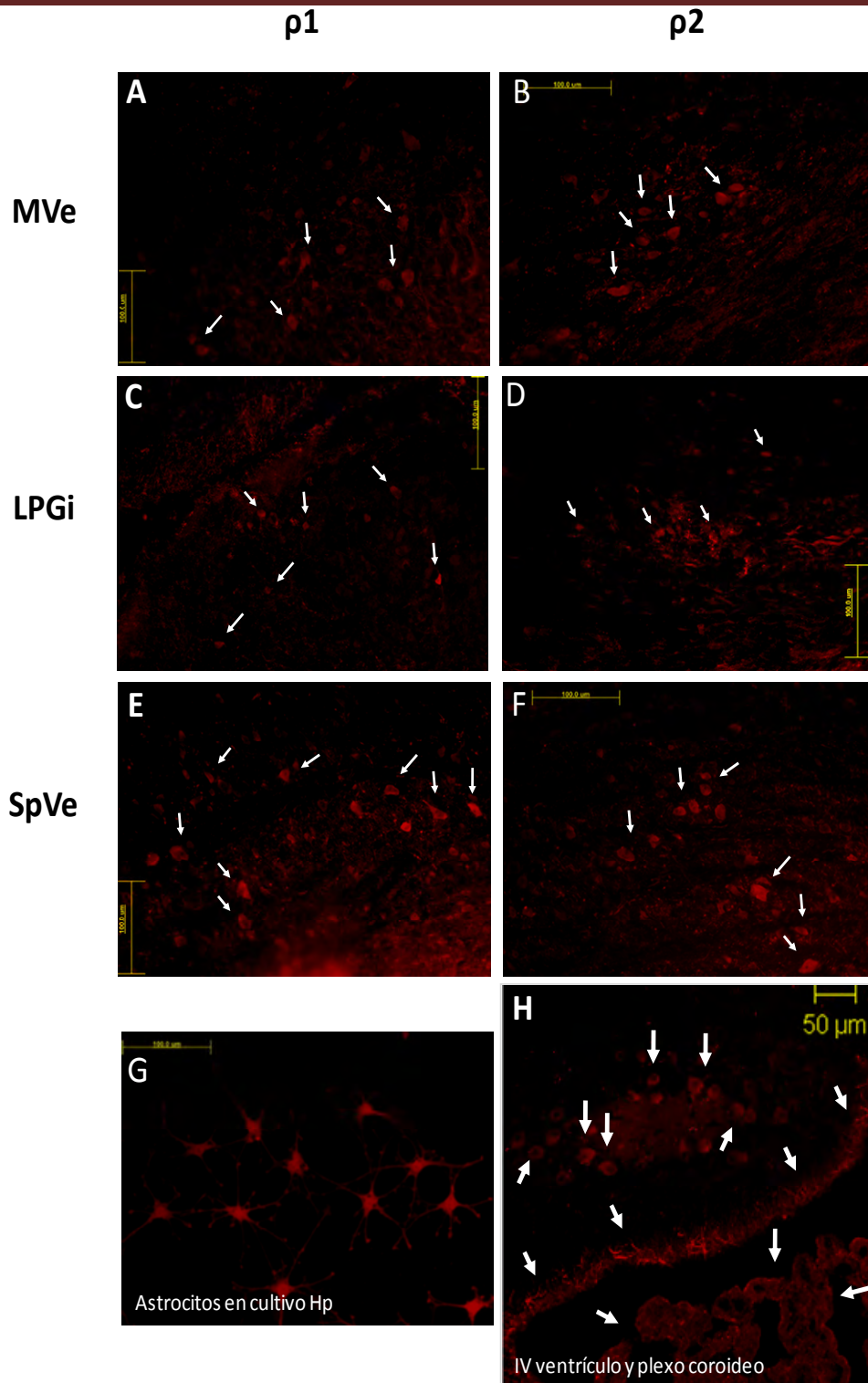


Figura A10. Localización de las subunidades GABA $\rho 1$ y $\rho 2$ en diversas áreas cerebrales en ratones CD1 y en astrocitos hipocámpales en cultivo. Las flechas muestran somas con procesos positivos para ambas subunidades GABA ρ . **G.** Astrocitos en cultivo del hipocampo con señal GABA $\rho 1$, este fue el primer indicio de la localización de subunidades GABA en glia. **H.** *In vivo* demostramos la expresión en somas de Purkinje (control) y en la glia limitante del 4^o ventrículo así como en el plexo coroideo (flechas inferiores) de la subunidad GABA $\rho 2$. Abreviaciones: MVe: núcleo vestibular medial; LPGi: núcleo paragigante celular lateral; SpVe: núcleo vestibular espinal; Hp: hipocampo. Barras A-F: 100 μm .

Tabla A1
Anticuerpos primarios usados

Antígeno	Especie de origen	No. de Catálogo	Usado para
GABAρ1 (N-19)	Cabra IgG (policlonal)	sc-21336 Santa Cruz Biotechnology	Inmunofluorescencia (IF) Doble IF Inmuno-oro
GABAρ1 (H-70)	Conejo IgG (policlonal)	sc-25707 Santa Cruz Biotechnology	IF Doble IF Inmuno-oro
GABAρ2 (S-19)	Cabra IgG (policlonal)	sc-30254 Santa Cruz Biotechnology	IF Doble IF Inmuno-oro
Calretinina (I-13)	Cabra IgG (policlonal)	sc-26512 Santa Cruz Biotechnology	Doble IF
Colina acetiltransferasa (H-95)	Conejo IgG (policlonal)	sc-20672 Santa Cruz Biotechnology	Doble IF
Calbindina D28K (C-20)	Cabra IgG (policlonal)	sc-7691 Santa Cruz Biotechnology	Doble IF
Parvalbumina α (H-70)	Conejo IgG (policlonal)	sc-25727 Santa Cruz Biotechnology	Doble IF
Proteína gliofibrilar ácida (N-18)	Cabra IgG (policlonal)	sc-6171 Santa Cruz Biotechnology	Doble IF
Actina (I-19)	Cabra IgG (policlonal)	sc-1616 Santa Cruz Biotechnology	Western blot (WB)

Tabla A2
Anticuerpos secundarios usados

Antígeno	Especie de origen	Catálogo	Usado para
Cabra	Burro IgG, conjugado con Alexa Fluor 594	A-11058 Molecular Probes	IF Doble IF
Conejo	Burro IgG, conjugado con Alexa Fluor 488	A-21206 Molecular Probes	IF Doble IF
Cabra	Burro IgG, conjugado con Alexa Fluor 488	A-11055 Molecular Probes	IF Doble IF
Cabra	Conejo IgG, conjugado con oro coloidal de 10nm	TED PELLA, INC.	Inmuno-oro
Conejo	Cabra IgG, conjugado con oro coloidal de 20nm	TED PELLA, INC.	Inmuno-oro
Cabra	Conejo IgG conjugado con fosfatasa alcalina	sc-2771 Santa Cruz Biotechnology	WB

Referencias

Ade KK, Janssen MJ, Ortinski PI, Vicini S. 2008. Differential tonic GABA conductances in striatal medium spiny neurons. *J Neurosci.* **28**, 1185-97.

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.

Alcantara AA, Chen V, Herring BE, Mendenhall JM, Berlanga ML. 2003. Localization of dopamine D2 receptors on cholinergic interneurons of the dorsal striatum and nucleus accumbens of the rat. *Brain Res.* **986**, 22-9.

Albin RL, Young AB, Penney JB. 1989. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci.* **12**, 366-75. Review.

Albrecht BE, Breitenbach U, Stühmer T, Harvey RJ, Darlison MG. 1997. In situ hybridization and reverse transcription-polymerase chain reaction studies on the expression of the GABA(C) receptor rho1- and rho2-subunit genes in avian and rat brain. *Eur J Neurosci.* **9**, 2414-22.

Alexander GE, Crutcher MD. 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends in Neurosci* **13**, 266-271.

Barnard EA. 1992. Receptor classes and the transmitter-gated ion channels. *Trends Biochem Sci.* **17**, 368-74.

Barnard EA, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ. 1998. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev.* **50**, 291-313. Review.

Benke D, Cicin-Sain A, Mertens S, Mohler H. 1991a. Immunochemical identification of the α 1- and α 3- subunits of the GABA_A receptor in rat brain. *J Recept Res.* **1**, 407-424

Benke D, Mertens S, Mohler H. 1991b. Ubiquitous presence of GABA_A receptors containing the α -subunit in rat brain demonstrated by immunoprecipitation and immunohistochemistry. *Mol Neuropharmacol.* **1**, 103-110.

Benke D, Fritschy JM, Trzeciak A, Bannwarth IV, Mohler H. 1994. Distribution, prevalence and drug binding profile of GABA_A receptor subtypes differing in β -subunit isoform. *J Biol Chem.* **269**, 27100- 27107.

Bennett BD, Bolam JP. 1993. Two populations of calbindin D28k-immunoreactive neurones in the striatum of the rat. *Brain Res.* **610**,305-10.

Bennett, BD, Wilson CJ. 2000. Synaptology and physiology of neostriatal neurones. In R. Miller & J. R. Wickens (Eds.), Brain dynamics and the Striatal Complex. Harwood Academic Publishers; Australia.

Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M. 2004. Molecular structure and physiological functions of GABA_B receptors. *Physiol Rev.* **84**: 835-67.

Bormann J. 1988. Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes. *Trends Neurosci.* **11**, 112-116.

Bormann J. 2000. The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci.* **21**, 16-9. Review.

Bormann J, Hamill OP, Sakmann B. 1987. Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J Physiol.* **385**, 243-86. Review.

Bormann J, Feingenspen A. 1995. GABAC receptors. *Trends Neurosci.* **18**, 515-519.

Born G, Schmidt M. 2008. A reciprocal connection between the ventral lateral geniculate nucleus and the pretectal nuclear complex and the superior colliculus: an in vitro characterization in the rat. *Vis Neurosci.* **25**, 39-51.

Boue-Grabot E, Roudbaraki M, Bascles L, Tramu G, Bloch B, Grte M. 1998. Expression of GABA receptor rho subunits in rat Brain. *J. Neurochem.* **70**, 899-907.

Bovolin P, Santi MR, Puia G, Costa E, Grayson D. 1992. Expression patterns of gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit mRNAs in primary cultures of granule neurons and astrocytes from neonatal rat cerebella. *Proc Natl Acad Sci USA.* **89**, 9344-48

Bowery NG, Brown DA. 1974. Depolarizing actions of gamma-aminobutyric acid and related compounds on rat superior cervical ganglia in vitro. *Br J Pharmacol.* **50**, 205-18.

Bowery NG, Doble A, Hill DR, Hudson AL, Shaw JS, Turnbull MJ. 1979. Baclofen: a selective agonist for a novel type of GABA receptor. *Br J Pharmacol.* **67**, 444-445.

Braak H, Tredici K. 2008. Cortico-basal ganglia-cortical circuitry in Parkinson's disease reconsidered. *Exp Neurol.* **212**, 226-9.

Calvo DJ, Vazquez AE, Miledi R. 1994. Cationic modulation of rho 1-type gamma-aminobutyrate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 12725-9.

Charara A, Pare JF, Levey AI, Smith Y. 2005. Synaptic and extrasynaptic GABA-A and GABA-B receptors in the globus pallidus: an electron microscopic immunogold analysis in monkeys. *Neuroscience.* **4**, 917-33.

Chen Y, Zhou D, Zhou K, Ren Y, Dai W, Xu M, Lu L, Lu Z. 2007. Study on olfactory function in GABAC receptor/channel $\rho 1$ subunit knockout mice. *Neurosci Lett.* **427**, 10-5.

Cherubini E, Martina M, Sciancalepore M, Strata F. 1998. GABA excites immature CA3 pyramidal cells through bicuculline-sensitive and -insensitive chloride-dependent receptors. *Perspect Dev Neurobiol.* **5**, 289-304.

Cope DW, Wulff P, Oberto A, Aller MI, Capogna M, Ferraguti F, Halbsguth C, Hoeger H, Jolin HE, Jones A, McKenzie AN, Ogris W, Poeltl A, Sinkkonen ST, Vekovischeva OY, Korpi ER, Sieghart W, Sigel E, Somogyi P, Wisden W. 2004. Abolition of zolpidem sensitivity in mice with a point mutation in the GABAA receptor $\gamma 2$ subunit. *Neuropharmacology.* **47**, 17-34.

Cutsuridis V, Graham B, Cobb S, Vida I. 2010. Hippocampal microcircuits: A computational modeler's resource book. Springer.

Cutting GR, Lu L, O'Hara BF, Kasch LM, Montrose-Rafizadeh C, Donovan DM, Shimada SS, Antonarakis E, Guggino WB, Uhl GR, 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.

Cutting GR, Curristin S, Zoghbi H, O'Hara B, Seldin MF, Uhl GR. 1992. Identification of a putative gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor subunit $\rho 2$ cDNA and colocalization of the genes encoding $\rho 2$ (GABRR2) and $\rho 1$ (GABRR1) to human chromosome 6q14-q21 and mouse chromosome 4. *Genomics.* **12**, 801-6.

Day M, Wang Z, Ding J, An X, Ingham C, Shering AF, Wokosin D, Ilijic E, Sun Z, Sampson AR, Mugnaini E, Deutch AY, Sesack SR, Arbuthnott GW, Surmeier DJ. 2006. Selective elimination of glutamatergic synapses on striatopallidal neurons in Parkinson disease models. *Nature Neurosci.* **9**, 251-9.

Delaney AJ, Sah P. 1999. GABA receptors inhibited by benzodiazepines mediate fast inhibitory transmission in the central amygdala. *J Neurosci.* **19**, 9698-704.

DeLong MR. 1990. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci* **13**, 281-285.

Demuro A, Martínez-Torres A, Mileti R. 2000. Functional and pharmacological properties of GABA $\rho 1$ delta 51 receptors. *Neurosci Res.* **36**, 141-6.

Deutch AY. 2006. Striatal plasticity in parkinsonism: dystrophic changes in medium spiny neurons and progression in Parkinson's disease. *J Neural Transm.* **70**, 67-70.

Devan BD, Goad EH, Petri HL. 1996. Dissociation of hippocampal and striatal contributions to spatial navigation in the water maze. *Neurobiol Learn Mem.* **66**, 305-23.

D'Hulst C, Atack JR, Kooy RF. 2009. The complexity of the GABAA receptor shapes unique pharmacological profiles. *Drug. Discov. Today.* **14**, 866-75.

Didelon F, Sciancalepore M, Savic' N, Mladinic' M, Bradbury A, Cherubini E. 2002. gamma-Aminobutyric acidA rho receptor subunits in the developing rat hippocampus. *J Neurosci Res.* **67**, 739-44.

Doble AILM. 1992. Multiple benzodiazepine receptors: no reason for anxiety. *Trends Neurosci.* **13**, 76-81.

Doig NM, Moss J, Bolam JP. 2010. Cortical and Thalamic Innervation of Direct and Indirect Pathway Medium-Sized Spiny Neurons in Mouse Striatum. *J of Neurosci,* **30**, 14610 – 14618.

Dong CJ, Picaud SA, Werblin FS. 1994. GABA transporters and GABAC-like receptors on catfish cone- but not rod-driven horizontal cells. *J Neurosci.* **14**, 2648-58.

Drew CA, Johnston GA, Weatherby RP. 1984. Bicuculline-insensitive GABA receptors: studies on the binding of (-)-baclofen to rat cerebellar membranes. *Neurosci Lett.* **52**, 317-21.

Drew CA, Johnston GA. 1992. Bicuculline- and baclofen-insensitive gamma-aminobutyric acid binding to rat cerebellar membranes. *J Neurochem.* **58**, 1087-92.

Duggan MJ, Stephenson FA. 1990. Biochemical evidence for the existence of γ -aminobutyrate_A receptor iso-oligomers. *J Biol Chem.* **265**, 3831-3835.

Duggan MJ, Pollard S, Stephenson FA. 1992. Quantitative immunoprecipitation studies with anti- γ -aminobutyric acid_A receptor γ 2 1-15 Cys antibodies. *J Neurochem.* **58**, 72-77.

Ekema GM, Zheng W, Lu L. 2002. Interaction of GABA receptor/channel rho(1) and gamma(2) subunit. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **43**, 2326-33.

Endo S, Olsen RW. 1993. Antibodies specific for α -subunit subtypes of GABA_A receptors reveal brain regional heterogeneity. *J Neurochem.* **60**, 1388-1398.

Enz R, Cutting GR. 1999. GABAC receptor rho subunits are heterogeneously expressed in the human CNS and form homo- and heterooligomers with distinct physical properties. *Eur J Neurosci.* **11**, 41-50.

Estrada-Mondragón A, Reyes-Ruiz JM, Martínez-Torres A, Miledi R. 2010. Structure-function study of the fourth transmembrane segment of the GABA ρ 1 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**, 17780-4.

Farrant M, Nusser Z. 2005. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci*. **6**, 215-29. Review.

Feigenspan A, Wässle H, Bormann J. 1993. Pharmacology of GABA receptor Cl⁻ channels in rat retinal bipolar cells. *Nature*. **361**, 159-62.

Feigenspan A, Bormann J. 1994. Differential pharmacology of GABA_A and GABA_C receptors on rat retinal bipolar cells. *Eur J Pharmacol*. **288**, 97-104.

Flores-Barrera E, Vizcarra-Chacón BJ, Tapia D, Bargas J, Galarraga E. 2010. Different corticostriatal integration in spiny projection neurons from direct and indirect pathways. *Front Syst Neurosci*. **4**:15.

Flores-Gracia C, Nuche-Bricaire A, Crespo-Ramírez M, Miledi R, Fuxe K, Pérez de la Mora M. 2010. GABA(A) ρ receptor mechanisms in the rat amygdala and its role in the modulation of fear and anxiety. *Psychopharmacology (Berl)*. **212**, 475-84.

Fraser DD, Duffy S, Angelides KJ, Perez-Velazquez JL, Kettenmann H, MacVicar BA. 1995. GABA_A/benzodiazepine receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes. *J Neurosci*. **15**, 2720-32.

Frazao R, Nogueira MI, Wässle. 2007. Colocalization of synaptic GABA_C-receptors with GABA_A-receptors and glycine-receptors in the rodent central nervous system. *Cell. Tiss. Res*. **330**, 1-15.

Freund TF, Buzsáki G. 1996. Interneurons of the hippocampus. *Hipp*. **6**, 347-470.

Fritschy JM, Benke D, Mertens S, Gao B, Mohler H. 1993. Immunohistochemical distinction of GABA_A receptor subtypes differing in drug binding profiles and cellular distribution. *Soc Neurosci Abstr*. **19**, 476.

Fritschy JM, Mohler H. 1995. GABA_A Receptor Heterogeneity in the Adult Rat Brain: Differential Regional and Cellular Distribution of Seven Major Subunits. *J Comp Neurol*. **359**, 154-194.

Froestl W, Gallagher M, Jenkins H, Madrid A, Melcher T, Teichman S, Mondadori CG, Pearlman R. 2004. SGS742: The first GABA_B receptor antagonist in clinical trials. *Biochem Pharmacol*. **68**, 1479-1487

Frostscher M, Serees L, Schwerdtfeger WK, Buhl E. 1991. The mossy cells of the fascia dentate: A comparative study of their fine structure and synaptic connections in rodents and primates. *J Comp Neurol*. **312**, 145-163.

Fujimura J, Nagano M, Suzuki H. 2005. Differential expression of GABA(A) receptor subunits in the distinct nuclei of the rat amygdala. *Brain Res Mol Brain Res.* **2138**, 17-23.

Gage PW. 1992. Activation and modulation of neuronal K⁺ channels by GABA. *Trends Neurosci.* **15**, 46-51.

Gerfen CR. 1992. The neostriatal mosaic: multiple levels of compartmental organization in the basal ganglia. *Annu Rev Neurosci.* **15**, 285-320. Review.

Gerfen CR. 2006. Indirect-pathway neurons lose their spines in Parkinson's disease. *Nat Neurosci.* **9**, 157-8.

Glykys J, Mann EO, Mody I. 2008. Which GABA(A) receptor subunits are necessary for tonic inhibition in the hippocampus? *J Neurosci.* **28**, 1421-6.

Gong S, Zheng C, Doughty ML, Losos K, Didkovsky N, Schambra UB, Nowak NJ, Joyner A, Leblanc G, Hatten ME, Heintz N.A. 2003. Gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes. *Nature.* **425**, 917-25.

González-González A. Análisis de la distribución del receptor GABA ρ en la zona periventricular del cerebelo. Instituto de Neurobiología, UNAM. Tesis de Maestría en Ciencias (Neurobiología).

Graybiel AM. 1990. Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci.* **13**, 244-54. Review.

Greka A, Koolen JA, Lipton SA, Zhang D. 1998. Cloning and characterization of mouse GABA(C) receptor subunits. *Neuroreport.* **9**, 229-32.

Goutman JD, Calvo DJ. 2004. Studies on the mechanisms of action of picrotoxin, quercetin and pregnanolone at the GABA rho 1 receptor. *Br J Pharmacol.* **141**, 717-27.

Gulyás AI, Megías M, Emri Z, Freund TF. 1999. Total number and ratio of excitatory and inhibitory synapses converging onto single interneurons of different types in the CA1 area of the rat hippocampus. *J Neurosci.* **19**, 10082-97.

Hanrajan JR, Mewett KN, Chebib M, Burden PM, Jhonston GAR. 2001. An improved versatile synthesis of the GABA-C antagonist TPMPA and P4MPA. *J. Chem Soc.* **1**: 2389-2392.

Hartmann K, Stief F, Draguhn A, Frahm C. 2004. Ionotropic GABA receptors with mixed pharmacological properties of GABAA and GABAC receptors. *Eur J Pharmacol.* **2**, 139-46.

Harvey VL, Duguid IC, Krasel C, Stephens GJ. 2006. Evidence that GABA ρ subunits contribute to functional ionotropic GABA receptors in mouse cerebellar Purkinje cells. *J Physiol.* **577**, 127-39.

Heimer L, Zahm DS, Alheid GF. 1995. Basal Ganglia. En: Paxinos G. 1995 *The Rat Nervous System*. Academic Press. 579-628.

Helm KA, Haberman RP, Dean SL, Hoyt EC, Melcher T, Lund PK, Gallagher M. 2005. GABAB receptor antagonist SGS742 improves spatial memory and reduces protein binding to the cAMP response element (CRE) in the hippocampus. *Neuropharmacology.* **48**, 956-964.

Hill DR, Bowery NG. 1981. ^3H -Baclofen and ^3H -GABA bind to bicuculine-insensitive GABA $_B$ sites in rat brain. *Nature.* **290**, 149-152.

Ishizuka N, Cowan WM, Amaral DG. 1995. A quantitative analysis of the dendritic organization of pyramidal cells in the rat hippocampus. *J Comp Neurol.* **362**, 17-45.

Janssen MJ, Yasuda RP, Vicini S. 2011. GABA $_A$ Receptor β 3 Subunit Expression Regulates Tonic Current in Developing Striatopallidal Medium Spiny Neurons. *Front Cell Neurosci.* **5**:15.

Johnston GA. 1997. Molecular biology, pharmacology, and physiology of GABA-C Receptors. In: Enna SJ, Bowery N. *The GABA receptors*. Human Press.

Johnston GA, Curtis DR, Beart PM, Game CJ, McCulloch RM, Twitchin B. 1975. Cis- and trans-4-aminocrotonic acid as GABA analogues of restricted conformation. *J Neurochem.* **24**, 157-60.

Jones KA, Borowsky B, Tamm JA. 1998. GABA $_B$ receptors function as a heteromeric assembly of the subunits GABA $_B$ R1 and GABA $_B$ R2. *Nat.* **396**, 674-679.

Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor P, Bischoff S, Mickel SJ, McMaster G, Angst C, Bittiger H, Froestl W, Bettler B. 1997. Expression cloning of GABAB receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nat.* **386**, 239 – 246.

Kaur KH, Baur R, Sigel E. 2009. Unanticipated structural and functional properties of delta-subunit-containing GABA $_A$ receptors. *J Biol Chem.* **284**, 7889-96.

Kawaguchi Y. 1993. Physiological, morphological, and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum. *J Neurosci.* **13**, 4908-23.

Kawaguchi Y. 1997. Neostriatal cell subtypes and their functional roles. *Neurosci Res.* **27**, 1-8. Review.

Kawaguchi Y, Wilson ChJ, Augood SJ, Emson PC. 1995. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *TINS*. **18**, 527-535.

Kemp JM, Powell TP. 1971. The connexions of the striatum and globus pallidus: synthesis and speculation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **262**, 441-57.

Kerr DI, Ong J. 1995. GABA β receptors. *Pharmacol. Ther.* **67**,187-246.

Kita H, Kosaka T, Heizmann CW. 1990. Parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat neostriatum: a light and electron microscopic study. *Brain Res*. **536**, 1-15.

Koos T, Tepper JM. 1999. Inhibitory control of neostriatal projection neurons by GABAergic interneurons. *Nat Neurosci* **2**, 467-472.

Koulen P, Brandstätter JH, Kröger S, Enz R, Bormann J, Wässle H. 1997. Immunocytochemical localization of the GABA(C) receptor rho subunits in the cat, goldfish, and chicken retina. *J Comp Neurol*. **380**, 520-32.

Krnjevic K, Phillis JW. Actions of certain amines on cerebral cortical neurones. *Br J Pharmacol Chemother*. **20**, 471-90.

Kubota Y, Kawaguchi Y. 1993. Spatial distributions of chemically identified intrinsic neurons in relation to patch and matrix compartments of rat neostriatum. *J Comp Neurol*. **4**, 499-513.

Lee M, McGeer EG, McGeer PL. 2011. Mechanisms of GABA release from human astrocytes. *Glia*. [Epub ahead of print]

Lei W, Jiao Y, Del Mar N, Reiner A. 2004. Evidence for differential cortical input to direct pathway versus indirect pathway striatal projection neurons in rats. *J Neurosci*. **24**, 8289-99.

Li P, Khatri A, Bracamontes J, Weiss DS, Steinbach JH, Akk G. 2010. Site-specific fluorescence reveals distinct structural changes induced in the human rho 1 GABA receptor by inhibitory neurosteroids. *Mol Pharmacol*. **77**, 539-46.

López-Chávez A, Miledi R, Martínez-Torres A. 2005 Cloning and functional expresión of the bovine GABA-C ρ 2 subunit molecular evidence of the widespread distribution in the CNS. *Neurosci. Res*. **53**, 421-427.

Macdonald RL, RW Olsen. 1994. GABA A receptors channels. *Annu Rev. Neurosci*. **17**, 569-602.

Madsen C, Jensen AA, Liljefors T, Kristiansen U, Nielsen B, Hansen CP, Larsen M, Ebert B, Bang-Andersen B, Krogsgaard-Larsen P, Frølund B. 2007. 5-Substituted imidazole-4-acetic

acid analogues: synthesis, modeling, and pharmacological characterization of a series of novel gamma-aminobutyric acid(C) receptor agonists. *J Med Chem.* **50**, 4147-61.

Marksitzer R, Benke D, Fritschy JM, Mohler H. 1993. GABA_A receptors: Drug binding profile and distribution of receptors containing the α 2-subunit *in situ*. *J Recept Res.* **13**, 467-477.

Martínez A, Lübke J, Del Río JA, Soriano E, Frotscher M. 1996. Regional variability and postsynaptic targets of chandelier cells in the hippocampal formation of the rat. *J Comp Neurol.* **376**, 28-44.

Martínez-Delgado G, Reyes-Haro D, E. Espino-Saldaña A, Rosas-Arellano A, Pétriz A, Juárez-Mercado P, Miledi R, Martínez-Torres A. 2011. Dynamics of GABA ρ 2 receptors in retinal bipolar neurons and cerebellar astrocytes. *Neuroreport.* **22**, 4-9.

Martínez-Torres A, Vázquez AE, Panicker MM, Miledi R. 1998. Cloning and functional expression of alternative spliced variants of the rho1 gamma-aminobutyrate receptor. *Proc Natl Acad Sci.* **95**, 4019-22.

Matsutani S, Yamamoto N. 1997. Neuronal regulation of astrocyte morphology in vitro is mediated by GABAergic signaling. *Glia.* **20**, 1-9.

Matsutani S, Yamamoto N. 1998. GABAergic neuron-to-astrocyte signaling regulates dendritic branching in coculture. *J Neurobiol.* **37**, 251-64.

McCall MA, Lukasiwicz PD, Gregg RG, Peachey NS. 2002. Elimination of the rho1 subunit abolishes GABA(C) receptor expression and alters visual processing in the mouse retina. *J Neurosci.* **22**, 4163-74.

McKernan RM, Quirk K, Prince R, Cox PA, Gillard NP, Ragan CI, Whiting P. 1991. GABA_A receptor subtypes immunopurified from rat brain with α subunit-specific antibodies have unique pharmacological properties. *Neuron.* **7**, 667-676.

Mejía C, García-Alcocer G, Berumen LC, Rosas-Arellano A, Miledi R, Martínez-Torres A. 2008. Expression of GABA ρ subunits during rat cerebellum development. *Neurosci Lett.* **432**, 1-6.

Mertens S, Benke D, Mohler H. 1993. GABA_A receptor populations with novel subunit combinations and drug binding profiles identified in brain by α 5- and δ -subunit-specific immunopurification. *J Biol Chem.* **268**, 5965-5973.

Miledi R, Eusebi F, Martínez-Torres A, Palma E, Trettel F. 2002. Expression of functional neurotransmitter receptors in *Xenopus* oocytes after injection of human brain membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**, 13238-42.

Miledi R, Parker I, Sumikawa K. 1982. Synthesis of chick brain GABA receptors by frog oocytes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* **1205**, 509-15.

Milligan CJ, Buckley NJ, Garret M, Deuchars J, 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**, 7241-50.

Morris KD, Moorefield CN, Amin J. 1999. Differential modulation of the gamma-aminobutyric acid type C receptor by neuroactive steroids. *Mol Pharmacol.* **56**, 752-9.

Morrison JH, Benoit R, Magistretti PJ, Ling N, Bloom FE. 1982. Immunohistochemical distribution of pro-somatostatin-related peptides in hippocampus. *Neurosci Lett.* **34**, 137-42.

Neely MD, Schmidt DE, Deutch AY. 2007. Cortical regulation of dopamine depletion induced dendritic spine loss in striatal medium spiny neurons. *Neurosci.* **149**, 457-64.

Nistri A, Sivilotti L. 1985. An unusual effect of gamma-aminobutyric acid on synaptic transmission of frog tectal neurones in vitro. *Br J Pharmacol.* **85**, 917-21.

Nusser Z, Mody I. 2002. Selective modulation of tonic and phasic inhibitions in dentate gyrus granule cells. *J Neurophysiol.* **87**, 2624-8.

Ochoa-de la Paz LD, Martínez-Dávila IA, Miledi R, Martínez-Torres A. Modulation of human GABA ρ 1 receptor by taurine. *Neurosci. Res.* **3**, 302-8.

O'Hara BF, Andretic R, Heller HC, Carter DB, Kilduff TS. 1995. GABAA, GABAC, and NMDA receptor subunit expression in the suprachiasmatic nucleus and other brain regions. *Brain Res Mol Brain Res.* **28**, 239-50.

Ogurusu T, Shingai R. 1996. Cloning of a putative gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor subunit rho 3 cDNA. *Biochim Biophys Acta.* **7**, 15-8.

Olsen RW, Sieghart W. 2008. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. *Pharmacol Rev.* **3**, 243-60. Review.

Overstreet LS, Westbrook GL. 2001. Paradoxical reduction of synaptic inhibition by vigabatrin. *J Neurophysiol.* 2001 **86**, 596-603.

Packard MG, Vecchioli SF, Schroeder JP, Gasbarri A. 2001. Task-dependent role for dorsal striatum metabotropic glutamate receptors in memory. *Learn Mem.* **8**, 96-103.

Pan ZH, Zhang D, Zhang X, Lipton SA. 2000. Evidence for coassembly of mutant GABAC ρ 1 with GABAA γ 2S, glycine α 1 and glycine α 2 receptor subunits in vitro. *Eur J Neurosci.* **12**, 3137-45.

Pan Y, Khalili P, Ripps H, Qian H. 2005. Pharmacology of GABAC receptors: responses to agonists and antagonists distinguish A- and B-subtypes of homomeric ρ receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Neurosci Lett.* **376**, 60-5.

Parent A. 1986. *Carpenter's Human Neuroanatomy*. Ninth ed. Williams & Wilkins. USA.

Park JB, Jo JY, Zheng H, Patel KP, Stern JE. 2009. Regulation of tonic GABA inhibitory function, presympathetic neuronal activity and sympathetic outflow from the paraventricular nucleus by astroglial GABA transporters. *J Physiol.* **587**, 4645-60.

Partridge JG, Janssen MJ, Chou DY, Abe K, Zukowska Z, Vicini S. 2009. Excitatory and inhibitory synapses in neuropeptide Y-expressing striatal interneurons. *J Neurophysiol.* **102**, 3038-45.

Pasternack M, Boller M, Pau B, Schmidt M. 1999. GABA(A) and GABA(C) receptors have contrasting effects on excitability in superior colliculus. *J Neurophysiol.* **82**, 2020-3.

Paxinos G. 2004. *The Rat Nervous System*, Third Edition. Elsevier, Academic Press.

Paxinos G, Franklin KBJ. 2001. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Second Edition. Academic Press. Elsevier USA.

Petriz-Reyes A. 2011. Expresión de receptores GABA ρ en astrocitos de cerebelo de ratón. Instituto de Neurobiología, UNAM. Tesis de Maestría en Ciencias (Neurobiología).

Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G. 2000. GABA $_A$ receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience.* **101**, 815-50.

Polenzani L, Woodward RM, Miledi R. 1991. Expression of mammalian gamma-aminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci.* **88**, 4318-22.

Qian H, Dowling JE. 1993. Novel GABA responses from rod-driven retinal horizontal cells. *Nature.* **361**, 162-4.

Qian H, Dowling JE. 1995. GABA A and GABA C receptors on hybrid bass retinal bipolar cells. *J. Neurofisiol.* **74**, 1920-1928.

Quirk K, Gillard NP, Ragan CI, Whiting PJ, McKernan RM. 1994. γ -Aminobutyric acid type A receptors in the rat brain can contain both $\gamma 2$ and $\gamma 3$ subunits, but $\gamma 1$ does not exist in combination with another γ subunit. *Mol Pharmacol.* **45**, 1061-1070.

Ragozzino D, Woodward RM, Murata Y, Eusebi F, Overman LE, Miledi R. 1996. Design and in vitro pharmacology of a selective gamma-aminobutyric acid receptor antagonist. *Mol. Pharmacol.* **50**, 1024-30.

Reiner A, Anderson KD. 1990. The patterns of neurotransmitter and neuropeptide co-occurrence among striatal projection neurons: conclusions based on recent findings. *Brain Res Brain Res Rev.* **15**, 251-265.

Ribak CE, Seress L, Amaral DG. 1985. The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. *J Neurocytol.* **14**, 835-57.

Ribak CE, Vaughn JE, Saito K. 1978. Immunocytochemical localization of glutamic acid decarboxylase in neuronal somata following colchicine inhibition of axonal transport. *Brain Res.* **140**, 315-32.

Riquelme R, Miralles CP, De Blas AL. 2002. Bergmann glia GABA(A) receptors concentrate on the glial processes that wrap inhibitory synapses. *J Neurosci.* **22**, 10720-30.

Roberts E, Frankel S. 1950. γ -Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *J Biol Chem* **187**, 55-63.

Rosas-Arellano A, Ochoa-de la Paz LD, Miledi R, Martínez-Torres A. 2007. Brain distribution and molecular cloning of the bovine GABA $\rho 1$ receptor. *Neurosci Res.* **57**, 347-53.

Rosas-Arellano A, Parodi J, Machuca-Parra AI, Sánchez-Gutiérrez A, Inestrosa NC, Miledi R, Martínez-Torres A. 2011b. The GABA(A) ρ receptors in hippocampal spontaneous activity and their distribution in hippocampus, amygdala and visual cortex. *Neurosci Lett.* **500**, 20-5.

Rozzo A, Armellin M, Franzot J, Chiaruttini C, Nistri A, 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.

Ruano D, Araujo F, Macbado A, Deblas AL, Vitorica J. 1994. Molecular characterization of type I GABA_A receptor complex from rat cerebral cortex and hippocampus. *Mol Brain Res* **25**, 225-233.

Salado-Castillo R, Díaz del Guante MA, Alvarado R, Quirarte GL, Prado-Alcalá RA. Effects of regional GABAergic blockade of the striatum on memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem.* **66**, 102-8.

Santhakumar V, Jones RT, Mody I. 2010. Developmental regulation and neuroprotective effects of striatal tonic GABAA currents. *Neuroscience*. **167**, 644-55

Schiff SJ. 2010. Towards model-based control of Parkinson's disease. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*. **368**, 2269-308. Review.

Schlicker K, McCall MA, Schmidt M. 2009. GABAC receptor-mediated inhibition is altered but not eliminated in the superior colliculus of GABAC rho1 knockout mice. *J Neurophysiol*. **101**, 2974-83.

Schmidt M, Boller M, Ozen G, Hall WC. 2001. Disinhibition in rat superior colliculus mediated by GABA_C receptors. *J Neurosci*. **21**, 691-9.

Schwarzer C, Berresheim U, Pirker S, Wieselthaler A, Fuchs K, Sieghart W, Sperk G. 2001. Distribution of the major gamma-aminobutyric acid(A) receptor subunits in the basal ganglia and associated limbic brain areas of the adult rat. *J Comp Neurol*. **433**, 526-49.

Sik A, Penttonen M, Buzsáki G. 1997. Interneurons in the hippocampal dentate gyrus: an in vivo intracellular study. *Eur J Neurosci*. **9**, 573-88.

Sivilotti L, Nistri A. 1989. Pharmacology of a novel effect of gamma-aminobutyric acid on the frog optic tectum in vitro. *Eur J Pharmacol*. **164**, 205-12.

Storustovu S, 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.

Strata F, Cherubini E. 1994. Transient expression of a novel type of GABA response in rat CA3 hippocampal neurones during development. *J Physiol*. **480**, 493-503.

Surmeier DJ, Reiner A, Levine MS, Ariano MA. 1993. Are neostriatal dopamine receptors co-localized?. *Trends Neurosci*. **16**, 299-305. Review.

Takahashi K, Miyoshi S, Kaneko A. 1994. Two components of GABA-induced currents in catfish retinal horizontal cells. *J Physiol*. **44**, 141-4.

Togel M, Mossier B, Fuchs K, Sieghart W. 1994. γ -Aminobutyric acid_A receptors displaying association of γ 3-subunits with β 2/3 and different α -subunits exhibit unique pharmacological properties. *J Biol Chem*. **269**, 12993-12998.

Vélez-Fort M, Audinat E, Angulo MC. 2011. Central Role of GABA in Neuron-Glia Interactions. *Neuroscientist*. [Epub ahead of print].

Vida I. 2010. Morphology of Hippocampal Neurons. In: Cutsuridis V, Graham B, Cobb S, Vida I. 2010. Hippocampal microcircuits: A computational modeler's resource book. Springer. Pp. 27-67.

Wahle P, Schmidt M. 2009. GABA(C) receptors are expressed in GABAergic and non-GABAergic neurons of the rat superior colliculus and visual cortex. *Exp Brain Res.* **199**, 245-52.

Waldvogel HJ, Kubota Y, Fritschy J, Mohler H, Faull RL. 1999. Regional and cellular localisation of GABA_A receptor subunits in the human basal ganglia: An autoradiographic and immunohistochemical study. *J Comp Neurol.* **415**, 313-40.

Wall MJ. 2001. Cis-4-amino-crotonic acid activates $\alpha 6$ subunit-containing GABAA but not GABAC receptors in granule cells of adult rat cerebellar slices. *Neurosci. Lett.* **316**, 37-40.

Wegelius K, Pasternack M, Hiltunen JO, Rivera C, Kaila K, Saarna M, Reeben M. 1998. Distribution of GABA receptor rho subunit transcripts in the rat brain. *Eur J Neurosci.* **10**, 350-7.

Wisden W, Laurie DJ, Monyer H, Seeburg PH. 1992. The distribution of 13 GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *J Neurosci.* **12**, 1040-1062.

Witter MP. Connectivity of the hippocampus. In: Cutsuridis V, Graham B, Cobb S, Vida I. 2010. Hippocampal Microcircuits: A computational modeler's resource book. Springer NY.

Witter MP, Amaral DG. 2004. Hippocampal Formation. In: Paxinos G. 2004. The Rat Nervous System, Third Edition. Elsevier, Academic Press. Pp. 635-704.

Woodward RM, Miledi R. 1993. Sensitivity of *Xenopus* oocytes to changes in extracellular pH: possible relevance to proposed expression of atypical mammalian GABAB receptors. *Brain Res Mol Brain Res.* **16**, 204-10.

Woodward RM, Polenzani L, 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.

Zigmond MJ, Bloom FE, Landis SC, Roberts JL, Squire LR. 1999. *Fundamental Neuroscience.* Acade. Press. US.

Zhang JH, Sato M, Tohyama M. 1991. Region-specific expression of the mRNAs encoding β subunits ($\beta 1$, $\beta 2$, and $\beta 3$) of GABA_A receptor in the rat brain. *J Comp Neurol.* **303**, 637-657.

Zhang J, Slaughter MM, 1995. Preferential suppression of the ON pathway by GABA C receptors in goldfish and chicken retinas. *J. Comp. Neurol.* **280**, 15-26.

Zheng W, Xie W, Zhang J, Strong JA, Wang L, Yu L, Xu M, Lu L. 2003. Function of gamma-aminobutyric acid receptor/channel rho 1 subunits in spinal cord. *J Biol Chem.* **278**, 48321-9.

Zheng W, Zhao X, Wang J, Lu L. 2010. Retinal vascular leakage occurring in GABA Rho-1 subunit deficient mice. *Exp Eye Res.* **90**, 634-40.