



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**PROPIEDADES DE LOS RECEPTORES GABA<sub>ρ</sub> EN ASTROCITOS  
DE CEREBELO EN CULTIVO**

**TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:  
M. en C. ADRIANA PÉTRIZ REYES**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES**  
Instituto de Neurobiología

**COMITÉ TUTOR:  
DR. ROGELIO ARELLANO OSTOA**  
Instituto de Neurobiología  
**DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE**  
Instituto de Fisiología Celular

**Campus Juriquilla, Querétaro, Qro. Febrero 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**Universidad Nacional Autónoma de México**

**Instituto de Neurobiología**

**Los miembros del Jurado de examen certificamos que la tesis elaborada por: Adriana Pétriz Reyes, cuyo título es: Propiedades de los receptores GABA<sub>ρ</sub> en astrocitos de cerebelo en cultivo, se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Doctorado en Ciencias y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.**

**Firma**

**Presidente**

**Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo**

---

**Secretario (Tutor)**

**Dr. Ataúlfo Martínez Torres**

---

**Vocal**

**Dr. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez**

---

**Vocal**

**Dr. Luis Alfonso Vaca Domínguez**

---

**Vocal**

**Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas**

---

## RESUMEN

El cerebelo juega un papel fundamental en el control de los movimientos finos, debido en gran parte a la transmisión GABAérgica. Las características de los receptores GABA<sub>A</sub> dependen de su composición molecular y su localización dentro de la sinapsis (sináptica o extrasináptica). Al igual que las neuronas, las células gliales expresan una gran variedad de subunidades del receptor GABA<sub>A</sub>.

En el presente trabajo demostramos la expresión de receptores GABA<sub>A</sub> que contienen las subunidades GABA<sub>ρ</sub> en células GFAP<sup>+</sup> (proteína ácido glial fibrilar) localizadas en el techo del cuarto ventrículo y en la capa granular (CG) del cerebelo durante el desarrollo postnatal temprano, sin embargo, su expresión en el adulto está restringida en las células de Purkinje y a una proporción de células ependimales.

Previamente, empleando técnicas electrofisiológicas demostramos que los astrocitos del cerebelo en cultivo expresan receptores funcionales GABA<sub>A</sub> que son inhibidos con bicuculina (100 μM) y TPMPA [IC<sub>50</sub>, 5.9 ± 0.6 μM], lo que sugería la presencia del componente GABA<sub>ρ</sub>. Y en este trabajo por medio de co-inmunoprecipitación mostramos evidencia de la interacción proteína-proteína entre las subunidades GABA<sub>ρ1</sub> y GABA<sub>α1</sub>, adicionalmente por doble inmunofluorescencia observamos la co-localización de ambas subunidades en la membrana plasmática de astrocitos en cultivo. Identificamos tres poblaciones de receptores GABA<sub>A</sub> en astrocitos: 1) clásicos GABA<sub>A</sub>, 2) GABA<sub>ρ</sub> insensibles a bicuculina y 3) híbridos GABA<sub>A</sub>-GABA<sub>ρ</sub>. Las diferentes subunidades de GABA<sub>A</sub> se distribuyen en cúmulos en la zona perinuclear y a lo largo de los procesos. Para determinar las vías del tráfico de GABA<sub>ρ2</sub> empleamos microscopía en tiempo real, y observamos que los cúmulos de GABA<sub>ρ2</sub>-eGFP se distribuyen en soma y procesos de los astrocitos. Los cúmulos permanecen relativamente inmóviles, presentando un promedio de desplazamiento de 9.4 ± 0.9 μm (en 30 min) y un recorrido neto de 1-2 μm (en 30 min) debido principalmente a movimientos de

difusión direccionados o de difusión simple. La modulación de la dinámica de GABA $\rho$  podría ser un mecanismo nuevo de regulación de la transmisión GABAérgica extrasináptica controlada por las células GFAP<sup>+</sup> del cerebelo durante el desarrollo postnatal.

La relativa inmovilidad de GABA $\rho$ 2 en astrocitos nos condujo a la pregunta de cómo están distribuidos los organelos en estas células, por tanto, se utilizaron proteínas fluorescentes fusionadas a marcadores de retículo endoplásmico, aparato de Golgi, endosomas y lisosomas. Todos estos se encontraron distribuidos en el soma y en los procesos de los astrocitos de cerebelo en cultivo. La presencia del retículo endoplásmico en procesos de los astrocitos sugería la posibilidad de que en estos ocurra síntesis de proteína local; por tanto, generamos fusiones génicas de proteínas fluorescentes con las proteínas ribosomales RpL29 y RpS5 y probamos su distribución en cultivos organotípicos de cerebelo. Los resultados indican que existen complejos ribosomales asociados a retículo endoplásmico en los procesos astrocíticos, lo que sugiere fuertemente la posibilidad de que la síntesis de proteínas pueda ocurrir fuera del soma de la célula. La síntesis local de proteínas podría ser el mecanismo por el cual las células gliales participan de manera dinámica en la sinapsis.

## ABSTRACT

The cerebellum plays a fundamental role in fine motor control, mainly due to GABAergic neurotransmission. Differential distribution of distinct types of GABA receptors at cerebellar inhibitory synapses has been reported and seems to contribute to specific function at each type of synapses (synaptic or extrasynaptic), Similar to neurons, glial cells express a plethora of GABA<sub>A</sub> receptor subunits.

In the present work, we assessed the expression of GABA<sub>A</sub> receptors which comprised the GABA<sub>ρ</sub> subunits in GFAP<sup>+</sup> cells located in the roof of the fourth ventricle and in the granular layer of cerebellum during early postnatal development. Immunofluorescence revealed the presence of GABA<sub>ρ</sub> in GFAP<sup>+</sup> cells during postnatal development, in contrast, expression in the adult was restricted to Purkinje neurons and a subset of ependymal glial cells.

Astrocytes from cerebellum express functional GABA<sub>A</sub> which are inhibited by bicuculline (100 μM) and TPMPA (IC<sub>50</sub>, 5.9 ± 0.6 μM), indicating the presence of a GABA<sub>ρ</sub> component. GABA<sub>ρ</sub> subunits are assembled as homo- or heteropentamers. Co-immunoprecipitation demonstrated protein–protein interactions between GABA<sub>ρ</sub>1 and GABA<sub>α</sub>1, and double immunofluorescence showed that these subunits co-localize in the plasma membrane. Three populations of GABA<sub>A</sub> receptors in astrocytes were identified: 1) classic GABA<sub>A</sub>, 2) bicuculline-insensitive GABA<sub>ρ</sub>, and 3) GABA<sub>A</sub>–GABA<sub>ρ</sub> hybrids. Clusters of GABA<sub>A</sub> receptors were distributed in the perinuclear space and along the processes of GFAP<sup>+</sup> cells. Time-lapse microscopy showed GABA<sub>ρ</sub>2-GFP accumulation in clusters located in the soma and along the processes. The clusters were relatively immobile, with mean displacement of 9.4 ± 0.9 μm (in 30 min) and a net distance traveled of 1–2 μm (in 30 min), due mainly to diffusion directional movement or simple diffusion. Modulation of GABA<sub>ρ</sub> dynamics may be a novel mechanism of extrasynaptic transmission regulating GABAergic control of GFAP<sup>+</sup> cells during early postnatal development.

The relative low mobility of GABA $\rho$ 2 in astrocytes led to the question of how organelles are distributed in these cells. By using fluorescent organelle specific proteins tagged with fluorescent proteins determined the distribution of endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, lysosomes and endosomes. All these organelles were found in the soma as well as in the processes of astrocytes in culture. The distribution of endoplasmic reticulum in the processes suggested the possibility of the presence of ribosomes in this space; thus we labeled the ribosomal proteins RpL29 and RpS5 with fluorescent tags and explored their distribution in GFAP<sup>+</sup> of cerebellum maintained in organotypic culture. We detected abundant label of both proteins in distal processes of GFAP<sup>+</sup>, moreover we found all along the processes co-localization of ribosomal proteins with the endoplasmic reticulum, suggesting the possibility that synthesis of proteins may occur in these sites. Thus, the local protein synthesis may be the mechanism by which glial cells dynamically modulate at the synapsis.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la **Universidad Autónoma de México**.

### **Jefes del laboratorio**

Dr. Ricardo Miledi

Dr. Ataúlfo Martínez Torres

### **Tutor**

Dr. Ataúlfo Martínez Torres.

### **Comité Tutor**

Dr. Rogelio Arellano Ostoia y Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade.

### **Jurado de Examen**

Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez; Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo; Dr. Ataúlfo Martínez Torres; Dr. Luis Vaca Domínguez y Dr. Francisco Gabriel Vázquez Cuevas.

### **Personal de Apoyo en el Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular (D15)**

Técnico Académico M. en C. Ángeles Edith Espino Saldaña

Auxiliar de laboratorio Marina Ramírez Romero

### **Unidad de Enseñanza**

M. en C. Leonor Casanova Rico

### **Biblioteca**

Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela

### **Bioterio**

MVZ. José Martín García Servín y Alejandra Castillo León.

### **Video Conferencia**

Lic. en Psicología Ma. de Lourdes Lara Ayala

**Unidad de Microscopía**

Elsa Nydia Hernández Rios y Ma. Lourdes Palma Tirado.

**Unidad de Proteogenómica**

Dra. Anaid Antaramian, M. en C. Adriana González Gallardo y Dr. Michael Jeziorski.

**El presente proyecto fue financiado por:**

Fondos para la investigación de CONACYT: 220224

Proyecto PAPIIT-DGAPA: IN206616

**Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**

Becario No. 334709

**Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM**

No. Cuenta: 510002075

**Mi familia**

María, Pétriz, Gusana, Socorro y Nequiz.

**Edición de figuras.**

Abraham Nequiz Ruiz.

**Compañeros del laboratorio**

¡Todos!

*A Plancky y Chocorrol*

## INDICE GENERAL

	Página
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
Cerebelo.	3
Ácido $\gamma$ -aminobutírico.	5
Receptores a GABA.	7
Receptores GABA $\rho$ .	9
Características farmacológicas del receptor GABA $\rho$ .	12
Receptores GABA $\alpha$ en células GFAP $^+$ .	15
Tráfico de receptores GABA $\alpha$ .	22
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>25</b>
<b>4. HIPÓTESIS</b>	<b>26</b>
<b>5. OBJETIVO GENERAL.</b>	<b>26</b>
<b>6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.</b>	<b>26</b>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	<b>27</b>
Procesamiento de tejido y cortes histológicos de cerebelo.	27
Inmunofluorescencia.	27
Cultivos primarios de astrocitos.	29
Extracción de RNA y RT-PCR.	29
Preparación de membranas.	30
Co-inmunoprecipitación.	30
Doble-inmunofluorescencia.	31
Expresión de proteínas fluorescentes en células en cultivo y análisis de las trayectorias de GABA $\rho$ 2-GFP.	32
Expresión de proteínas fluorescentes acopladas a	33

marcadores de organelos intracelulares en células en cultivo.	
Estrategia de clonación de RpL29 y RpS5 en los vectores de expresión eGFP y mCherry.	34
Electroporación y cultivos organotípicos de cerebelo de ratón.	35
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>36</b>
Receptores GABA <sub>A</sub> en células gliales de cerebelo de ratón.	36
Expresión de subunidades del receptor GABA <sub>A</sub> en astrocitos en cultivo.	41
Interacción proteína-proteína entre las subunidades GABA <sub>ρ</sub> 1 y GABA <sub>α</sub> .	45
Distribución y tráfico de GABA <sub>ρ</sub> 2-GFP.	46
Distribución de organelos intracelulares implicados en la vía secretora en astrocitos en cultivo.	49
Localización de organelos intracelulares involucrados en el tráfico vesicular.	50
Clonación de RpL29 y RpS5.	52
Expresión heteróloga de RpL29 y RpS5 fusionadas a eGFP y mCherry en células GFAP <sup>+</sup> de cerebelo de ratón.	56
Co-localización de las proteínas L29eGFP y Sec61β-mCherry en los procesos de las células GFAP <sup>+</sup> .	63
<b>9. DISCUSIÓN</b>	<b>66</b>
<b>10. CONCLUSIONES.</b>	<b>72</b>
<b>11. PERSPECTIVAS.</b>	<b>73</b>
<b>12. REFERENCIAS.</b>	<b>74</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Organización del cerebelo y distribución de las células gliales.	4
2. Diagrama de la síntesis y transporte de GABA en la sinapsis tripartita.	7
3. Diferencias en las respuestas de GABA de los receptores GABA <sub>A</sub> y GABA <sub>ρ</sub> en <i>X. leavis</i> .	11
4. Modelo estructural de los receptores GABA <sub>ρ</sub> .	12
5. Expresión de GABA <sub>ρ</sub> 1 y GABA <sub>ρ</sub> 2 en neuronas de Purkinje en ratón adulto.	15
6. Expresión de GABA <sub>ρ</sub> en células gliales de cerebelo.	17
7. Expresión de receptores GABA <sub>A</sub> y subunidades GABA <sub>ρ</sub> en células GFAP <sup>+</sup> en cultivo.	19
8. Efecto de bicuculina y TPMPA sobre las Corrientes mediadas por GABA en astrocitos en cultivo.	21
9. Dinámica del tráfico intracelular de los receptores GABA <sub>A</sub> .	23
10. Estrategia de clonación de RpL29 y RpS5 en los vectores de expresión eGFP (-C1 y -N1) y mCherry (-C1 y -N1).	35
11. Expresión del mRNA de GABA <sub>α</sub> 1, GABA <sub>ρ</sub> 1 y GABA <sub>ρ</sub> 2 en cerebelo de ratón p5 y p10.	37
12. Expresión de las subunidades GABA <sub>α</sub> 1, GABA <sub>ρ</sub> 1 y GABA <sub>ρ</sub> 2 en células GFAP <sup>+</sup> de cerebelo de ratón.	39
13. Análisis de co-localización de GABA <sub>ρ</sub> 1 y GABA <sub>ρ</sub> 2 en células GFAP <sup>+</sup> de cerebelo de ratón.	41
14. Expresión de subunidades del receptor GABA <sub>A</sub> en astrocitos de cerebelo de ratón en cultivo.	43
15. Distribución de GABA <sub>α</sub> 1, GABA <sub>γ</sub> 2, GABA <sub>ρ</sub> 1 y GABA <sub>ρ</sub> 2 en astrocitos de cerebelo de ratón en cultivo.	44
16. Interacción proteína-proteína entre las subunidades GABA <sub>ρ</sub> 1 y GABA <sub>α</sub> .	46
17. Distribución y tráfico de GABA <sub>ρ</sub> 2-GFP.	48

<b>18.</b> Distribución de organelos intracelulares de la vía secretora en astrocitos en cultivo.	<b>50</b>
<b>19.</b> Localización de Golgi, RE y ácidos nucleicos en astrocitos en cultivo.	<b>51</b>
<b>20.</b> Plásmidos diseñados para la expresión de proteínas ribosomales RpL29 y RpS5 fusionadas a las proteínas fluorescentes eGFP y mCherry.	<b>53</b>
<b>21.</b> Expresión heteróloga de las proteínas ribosomales RpL29 y RpS5 fusionadas a las proteínas fluorescentes eGFP y mCherry en células HEK 293.	<b>55</b>
<b>22.</b> Expresión de RpL29 y RpS5 en células de cerebelo en cultivo organotípico.	<b>57</b>
<b>23.</b> Expresión de RpL29mCherry en células GFAP <sup>+</sup> de cerebelo de ratón transgénico GFAP/eGFP.	<b>58</b>
<b>24.</b> Expresión de RpS5mCherry en células GFAP <sup>+</sup> de cerebelo de ratón transgénico GFAP/eGFP.	<b>59</b>
<b>25.</b> Co-expresión de RpL29eGFP y mCherry en células GFAP <sup>+</sup> de cerebelo de ratón.	<b>61</b>
<b>26.</b> Co-expresión de RpS5eGFP y mCherry en células GFAP <sup>+</sup> de cerebelo de ratón.	<b>62</b>
<b>27.</b> Co-localización de L29eGFP/Sec61 $\beta$ mCherry en células GFAP <sup>+</sup> de cerebelo de ratón.	<b>64</b>
<b>28.</b> Co-localización de L29eGFP/Sec61 $\beta$ mCherry en procesos de células GFAP <sup>+</sup> de cerebelo de ratón.	<b>65</b>

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Expresión de los transcritos que codifican para diversas subunidades del receptor GABA <sub>A</sub> en células gliales.	<b>18</b>
2. Lista de anticuerpos empleados en los diferentes experimentos de inmunodetección.	<b>28</b>
3. Oligonucleótidos específicos utilizados en las reacciones de RT-PCR.	<b>30</b>
4. Lista de plásmidos usados para marcar organelos intracelulares.	<b>33</b>
5. Oligonucleótidos para clonar las proteínas ribosomiales RpL29 y RpS5.	<b>34</b>

## ABREVIATURAS

<b>AP</b>	Fosfatasa alcalina
<b>-C</b>	Carboxilo
<b>CACA</b>	Ácido cis-aminocrotónico
<b>CBR1</b>	Receptor a canabinoides 1
<b>CG</b>	Capa granular
<b>CM</b>	Capa molecular
<b>CP</b>	Células de Purkinje
<b>DCM</b>	Distancias cuadráticas medias
<b>DMEM</b>	Dulbecco Modificado por Eagle
<b>EAAT2</b>	Transportadores de aminoácidos excitatorios 2
<b>EGCs</b>	Células endodimales gliales
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GABA-T</b>	GABA-transaminasa
<b>GAD</b>	Glutamato descarboxilasa
<b>GAT</b>	Transportadores de GABA
<b>GB</b>	Glía de Bergmann
<b>GFAP</b>	Proteína ácido glial fibrilar
<b>GLT-1</b>	Transportadores de glutamato
<b>IP</b>	Yoduro de propidio
<b>IV</b>	Cuarto ventrículo
<b>L-IPSCs</b>	Corrientes sinápticas inhibitorias evocadas con estímulos luminosos
<b>MP</b>	Marcador de peso
<b>-N</b>	Amino
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>pX</b>	Postnatal X
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico
<b>SCN</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SV 4V</b>	Subventrículo del cuarto ventrículo
<b>TACA</b>	Ácido 4-trans-aminocrotónico
<b>TPMPA</b>	Ácido (1,2,5,6-Tetrahidropiridin-4-il) metilfosfínico

## 1. INTRODUCCIÓN

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) es uno de los neurotransmisores inhibitorios más importantes en el Sistema Nervioso Central (SNC), ejerce su acción tras la activación de receptores, los cuales pueden ser de tipo ionotrópico (GABA<sub>A</sub>) o metabotrópico (GABA<sub>B</sub>). Los receptores GABA<sub>A</sub>, pertenecen a la súper familia de canales iónicos dependientes de ligando, forman complejos pentaméricos compuestos por combinaciones de diferentes subunidades ( $\alpha$  1-6,  $\beta$  1-4,  $\gamma$  1-3,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\rho$ 1-3,  $\theta$ ,  $\pi$ ) (Olsen y Sieghart, 2008). Dichas subunidades al ensamblarse forman un canal que permite el flujo de cloruro en respuesta a la unión de GABA (Bormann, 2000). Las diferentes subunidades de GABA<sub>A</sub> son expresadas en SNC y cada una determina diferencias en las características biofísicas del canal, así como la farmacología del receptor (Martínez-Delgado et al., 2010; Vithlani et al., 2011).

En el cerebelo, el papel de la señalización GABAérgica es fundamental, debido a su influencia sobre la diferenciación durante el desarrollo postnatal temprano, así como su participación en el control de movimientos precisos durante la vida adulta (Root et al., 2008; Hashimoto y Hibi., 2012; Ito., 2012). A diferencia de las neuronas, la despolarización debida a la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> en astrocitos persiste durante el desarrollo postnatal, aunque parece que las respuestas se van atenuando con la edad (Vélez-Fort et al., 2012). En los astrocitos de cerebelo, el arreglo de las subunidades GABA<sub>A</sub> es heterogéneo, y su modulación por benzodiazepinas es diferente que en las neuronas (Kettenmann et al., 1984). De hecho, las respuestas a GABA de la glía de Bergmann y de las células gliales endodimales (EGCs) son insensibles a las benzodiazepinas o al pentobarbital, debido a que el ensamble de sus receptores incluye las subunidades GABA $\delta$  y GABA $\rho$  (Müller et al., 1994; Reyes-Haro et al., 2013).

La participación de las subunidades GABA $\rho$  en la transmisión neuronal tónica (extrasináptica) y fásica (sináptica) ha sido demostrada en las células de Purkinje del cerebelo (Harvey et al., 2006); sin embargo, las subunidades GABA $\rho$  también se expresan en buena proporción de las EGCs del techo del cuarto ventrículo, células ciliadas GFAP $^{+}$ , especializadas en permitir el flujo del líquido cerebroespinal en el sistema ventricular (Álvarez-Morujó et al., 1992; Reyes-Haro et al., 2013). Las corrientes generadas por GABA en estas células son insensibles al pentobarbital y parcialmente bloqueadas por bicuculina, antagonista de los receptores GABA $A$ , y por el ácido (1,2,5,6-Tetrahidropiridin-4-il) metilfosfínico (TPMPA), primer antagonista sintético del receptor homomérico GABA $\rho$  (Ragozzino et al., 1996). Las subunidades GABA $\rho$  también se encuentran en un 30% de las células GFAP $^{+}$  en el estriado (Rosas Arellano et al., 2013). Lo anterior sugiere, que las células de origen glial, como son las EGCs y los astrocitos, presentan arreglos específicos de las subunidades del receptor GABA $A$ , los cuales incluyen las subunidades GABA $\rho$ , su papel funcional aún no ha sido definido.

En el presente trabajo evaluamos la presencia de las subunidades GABA $\rho$  en el cerebelo durante el desarrollo postnatal temprano, corroboramos su presencia en el área de las EGCs y encontramos su distribución en células GFAP $^{+}$  de la CG del cerebelo. Reportamos el patrón de expresión de las subunidades GABA $\rho$  en células GFAP $^{+}$  del cerebelo, evidenciamos su ensamble con subunidades GABA $\alpha$  y mostramos evidencia sobre el tráfico intracelular de GABA $\rho$  en astrocitos en cultivo. Adicionalmente, presentamos datos sobre la presencia de ribosomas en los procesos distales de los astrocitos, lo que haría posible la síntesis de proteínas en los procesos de las células GFAP $^{+}$  del cerebelo.

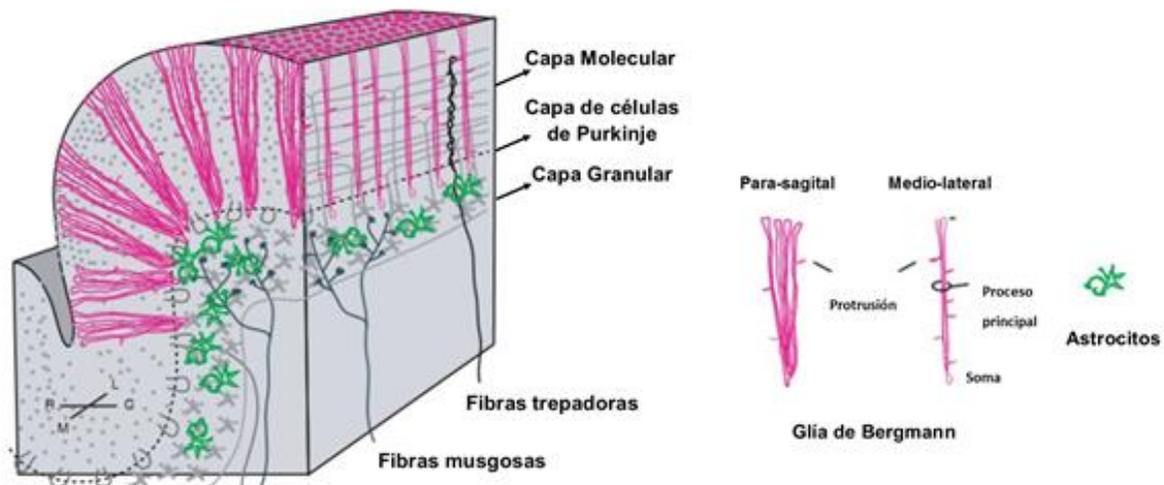
## 2. ANTECEDENTES

### ***Cerebelo.***

El cerebelo se origina de la cara dorsal del tronco del encéfalo y se encuentra sobre el cuarto ventrículo. El cerebelo está conectado al tronco del encéfalo por tres pares de haces de fibras, denominadas pedúnculos cerebelosos: inferior, medio y superior; estos unen el cerebelo a la médula oblonga, al puente y al mesencéfalo, respectivamente. Entre las funciones del cerebelo se encuentran las tareas motoras, el comportamiento emocional y el aprendizaje (Koziol et al., 2011., Strata et al., 2011). Controla el mantenimiento del equilibrio, influye en la postura, en el tono muscular y coordina el movimiento (Crossman y Neary., 2007). Estas funciones complejas se deben a la organización de los circuitos neuronales del cerebelo, la cual está muy bien conservada evolutivamente tanto a nivel estructural como de circuitería (Hashimoto y Hibi., 2012).

Las células precursoras del cerebelo se sitúan en dos regiones distintas; el neuroepitelio del cuarto ventrículo y el labio rómbico anterior. Dentro de las neuronas generadas del neuroepitelio del cuarto ventrículo se encuentran: las neuronas de Purkinje, de Golgi, de Lugaro, las de forma de candelabro, las de forma de cesta, las estelares y las pequeñas de los núcleos profundos; neuronas principalmente GABAérgicas; mientras que del labio rómbico anterior se generan las neuronas glutamatérgicas: las unipolares en forma de cepillo y granulares. Acompañando a las neuronas, en el cerebelo también encontramos células gliales como astrocitos, glía de Bergmann (un astrocito especializado y específico del cerebelo), microglía y oligodendrocitos.

Las neuronas y las células gliales se encuentran distribuidas a lo largo del cerebelo en tres capas (Figura 1): la capa molecular, la capa de las células de Purkinje y la CG. La capa molecular contiene las dendritas de las células de Purkinje, los axones de las células granulares (fibras paralelas), las células en cesta, las interneuronas estrelladas y los procesos de la glía de Bergmann. En la capa de las células de Purkinje se encuentran los somas de las células de Purkinje, los somas de la glía de Bergmann y las células en candelabro. Y en la CG encontramos gran cantidad de células granulares pequeñas, los somas de las células de Golgi, las células de Lugaro, las células unipolares en cepillo y abundantes astrocitos (Hashimoto y Hibi., 2012, Tanaka et al., 2008).



**Figura 1. Organización del cerebelo y distribución de las células gliales.** Imagen de una folia seccionada en sus vistas sagital y transversal. La glía de Bergmann posee más de 5 procesos finos, los cuales atraviesan la capa molecular para formar la superficie pial. Los procesos principales de la glía de Bergmann se encuentran orientados hacia el mismo plano que las dendritas de las células de Purkinje. En dirección transversal, los procesos de muchas GB forman empalizados gliales que se alinean en la misma dirección que las fibras paralelas. Adicionalmente, pequeñas protrusiones sobresalen de los procesos principales como símbolo de interacciones neurona-glia. La mayoría de los astrocitos se encuentran localizados en la capa granular y tienen una apariencia estrellada con procesos pequeños, los cuales se encuentran formando láminas de membrana entre las células granulares. Los procesos de los astrocitos rodean células granulares y/o rosetas de fibras musgosas. **GB:** Glía de Bergmann; **R-C:** Rostro-Caudal; **M-L:** Medio-Lateral. (Modificado de Hoogland y Kuhn, 2010).

En el cerebelo la transmisión sináptica es fundamentalmente GABAérgica, debido a la gran cantidad de interneuronas localizadas en esta zona (Delgado y Schmachtenberg., 2008).

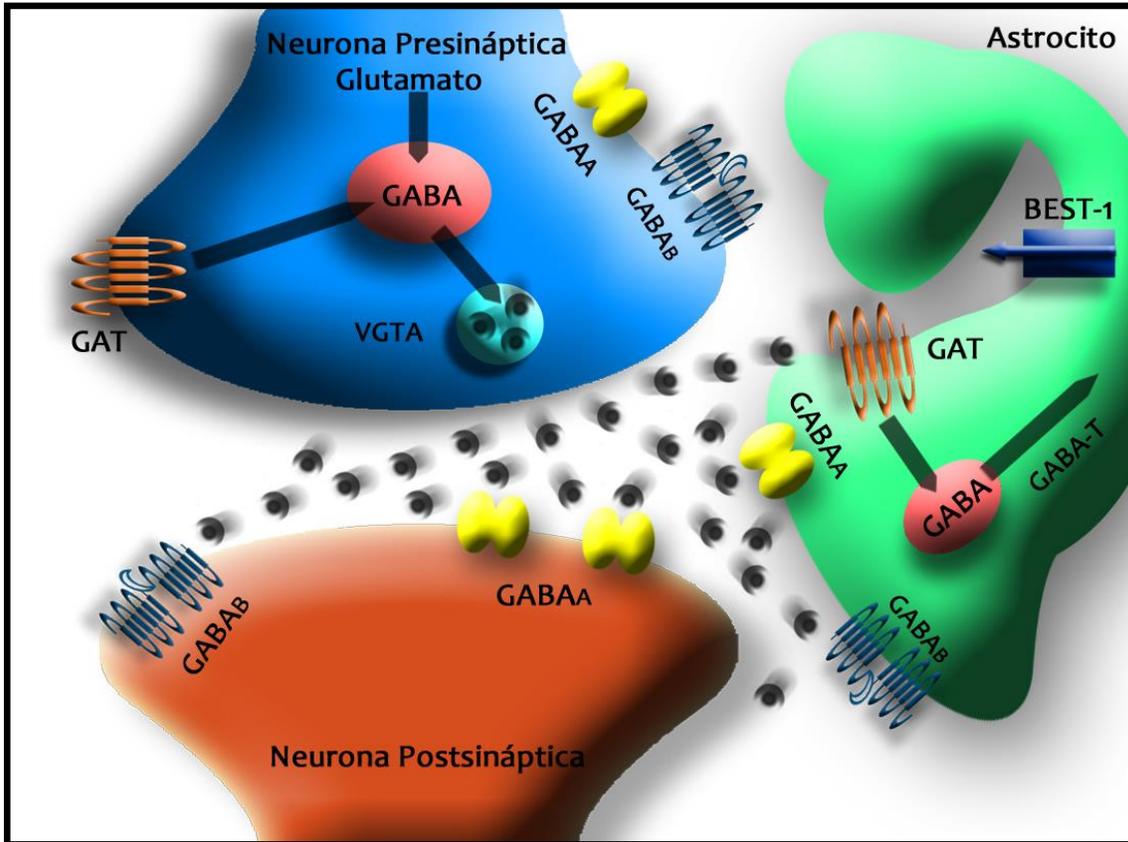
### ***Ácido $\gamma$ -aminobutírico.***

El ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y la glicina son los neurotransmisores inhibidores más importantes en el SNC (Bennett y Balcar., 1999). La transmisión GABAérgica es regulada mediante varios mecanismos moleculares especializados, los cuales regulan el transporte, la recaptura, la síntesis y la degradación del neurotransmisor (Roth y Draguhn., 2012).

Los transportadores de GABA movilizan este neurotransmisor a través de la membrana plasmática (Figura 2). La dirección y eficacia de estos co-transportadores de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  depende del gradiente electroquímico, en la mayoría de los casos se dirige hacia el interior de la célula (Cammack et al., 1994., Corey et al., 1994). Sin embargo, después de una despolarización que altere la homeostasis iónica, los transportadores de GABA pueden invertir su dirección. Este mecanismo permite la liberación no vesicular de GABA, la cual es de especial importancia en situaciones patológicas (Attwell et al., 1993., During et al., 1995; Wu et al., 2007). Existen cuatro isoformas de los transportadores de GABA con diferentes afinidades:  $7\mu\text{M}$  para GAT-1,  $8\mu\text{M}$  para GAT-2,  $12\mu\text{M}$  para GAT-3 y  $93\mu\text{M}$  para BGT (Borden et al., 1992., Guastella et al., 1990., Kanner y Bendahan, 1990., Liu et al., 1993., Yamauchi et al., 1992). Los transportadores de GABA se expresan de manera diferencial en el SNC. Como regla general, GAT-1 predomina en neuronas y GAT-3 se expresa fuertemente en células gliales (Conti et al., 1998; Minelli et al., 1996; Ribak et al., 1996).

Para enriquecer de GABA las terminales presinápticas se incrementa la síntesis de glutamato, debido a que este es el principal precursor del GABA. Las neuronas GABAérgicas expresan dos isoformas maduras de la enzima glutamato descarboxilasa (GAD): GAD65 y GAD67 (Erlander y Tobin., 1991; Esclapez et al., 1994), estas convierten el aminoácido glutamato en GABA. Ambas isoformas se encuentran presentes en la mayoría de las neuronas GABAérgicas del SNC, sin embargo, la GAD65 se encuentra directamente asociada a las vesículas presinápticas y sintetiza el GABA para la liberación vesicular hacia la hendidura sináptica, mientras que GAD67 se encuentra ampliamente distribuida en toda la célula sintetizando preferentemente GABA citoplasmático (Soghomonian y Martin., 1998).

Una vez liberado el GABA a la hendidura sináptica, este ejerce su acción sobre la neurona postsináptica y es recapturado por los transportadores a GABA. Finalmente es degradado a semialdehído succínico por la enzima GABA transaminasa (GABA-T), la cual se localiza en las mitocondrias de las células gliales y de las neuronas (Jung et al., 1977; Kugler, 1993; Schousboe et al., 1977).



**Figura 2. Diagrama de la transmisión GABAérgica en la sinapsis tripartita.** El GABA sintetizado a partir de glutamato por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), es transportado hacia el interior de vesículas a través del transportador del neurotransmisor vesicular (VGTA). El GABA puede ser liberado vesiculado o no-vesiculado. Los receptores GABA se encuentran localizados en la pre- y la postsinapsis. La recaptura del GABA que se lleva a cabo en las neuronas y en las células gliales se da a través de los transportadores de GABA (GAT). Subsecuentemente, el GABA es metabolizado por una reacción de transaminación catalizada por la enzima GABA transaminasa (GABA-T). El metabolismo del GABA ocurre en las mitocondrias de las neuronas y de las células gliales.

### **Receptores a GABA.**

El GABA ejerce su acción al activar receptores de tipo ionotrópico o metabotrópico. Los receptores GABA<sub>A</sub> son ionotrópicos mientras que los receptores GABA<sub>B</sub> son miembros de la súper familia de receptores con siete pasas transmembranales acoplados a proteínas G heterotriméricas (Kaupmann et al., 1997).

Los mecanismos efectores asociados con la actividad neuronal de los receptores GABA<sub>B</sub> son: el sistema de adenilato ciclasa y los canales de Ca<sup>2+</sup> y K<sup>+</sup> (Andrade et al., 1986; Bindokas e Ishida, 1991; Dolphin et al., 1990; Gage, 1992; Hill et al., 1984; Karbon et al., 1984; Hirst et al., 2000; Inoue et al., 1985; Xu y Wojcik, 1986). La actividad de los receptores GABA<sub>B</sub> está mediada por la activación de proteínas G pertenecientes a la familia de las proteínas sensibles a la toxina pertussis G<sub>iα</sub>/G<sub>oα</sub>, en particular G<sub>i2α</sub> (Odagaki et al., 2000; Odagaki y Koyama., 2001), que actúan sobre un sistema de segundos mensajeros intracelulares. Los receptores GABA<sub>B</sub> son activados de manera selectiva por baclofeno y son insensibles a los moduladores (como las benzodiazepinas) y antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub> (Bowery., 1989).

Los receptores GABA<sub>A</sub>, pertenecen a la súper familia de canales iónicos dependientes de ligando. Estos forman complejos pentaméricos compuestos por combinaciones de diferentes subunidades (α 1-6, β 1-4, γ1-3, δ, ε, ρ1-3, θ, π) (Olsen y Sieghart, 2008). Estas subunidades comparten una similitud en su secuencia de aminoácidos del 70-80% entre las isoformas de la misma clase, mientras que entre las diferentes subunidades la similitud es de un 30-40% (Macdonald y Olsen., 1994). Cada subunidad tiene un extremo amino-terminal extracelular de aproximadamente 200 aminoácidos, cuatro regiones transmembranales y un carboxilo-terminal extracelular (Brejc et al., 2001; Le Novere y Changeux, 1999; Tasneem et al., 2005; Tsang et al., 2007). Al ensamblarse, dichas subunidades forman un canal que permea cloruro en respuesta a la unión de GABA (Bormann., 2000).

En la mayoría de los casos, el incremento en la conductancia del cloruro por la activación de receptores GABA<sub>A</sub>, induce la inhibición de la neurona postsináptica, debido a que en esta se disminuye la probabilidad de generar potenciales de acción. Este mecanismo ocurre si el potencial de equilibrio del

cloruro ( $E_{Cl}$ ) es más negativo que el potencial de membrana en reposo. En situaciones específicas como en el desarrollo neuronal y en la epilepsia crónica, el GABA causa excitación neuronal debido a que la concentración de cloruro intracelular es mayor en estas condiciones (Ben-Ari et al., 1989; Ben-Ari et al., 2007; Ben-Ari y Holmes, 2006; Cherubini et al., 1991; Huberfeld et al., 2007; Tyzio et al., 2011).

Los receptores  $GABA_A$  son modulados por los barbitúricos, las benzodiazepinas, los neuroesteroides y el etanol (Bormann., 1988; Doble et al., 1992; McDonald y Olsen., 1994); y son antagonizados por compuestos como la bicuculina y la picrotoxina (Olsen y Tobin., 1990). Las propiedades cinéticas del canal dependen de las subunidades que lo componen. Las diferentes subunidades de  $GABA_A$  son expresadas en distintas regiones del cerebro y cada una determina diferencias sutiles en las características biofísicas del canal, así como en su farmacología (Enz y Cutting., 1999).

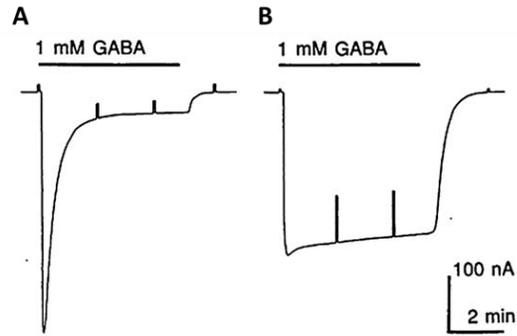
En el cerebelo se han identificado 16 de las subunidades del receptor  $GABA_A$  ( $\alpha$  1-6,  $\beta$  1-3,  $\gamma$  1-3,  $\delta$  y  $\rho$  1-3), (Jechlinger et al., 1998; Laurie et al., 1992; Mejía et al., 2008; Persohn et al., 1992; Pirker et al., 2000; Tretter et al., 2001), siendo las siguientes combinaciones las que se encuentran en mayor proporción en el cerebelo adulto  $\alpha 1\beta(1-3)\gamma 2$ ,  $\alpha 1\alpha 6\beta(1-3)\gamma 2$ ,  $\alpha 6\beta(1-3)\gamma 2$  y  $\alpha 6\beta(1-3)\delta$  (Pörtl et al., 2003).

### ***Receptores $GABA\rho$***

Dentro de los receptores  $GABA_A$ , encontramos a los receptores conformados por las subunidades  $GABA\rho$ , los cuales también son selectivos al ión cloro y se expresan en varias regiones del cerebro de vertebrados. La existencia de un receptor insensible a la bicuculina fue originalmente descrita en

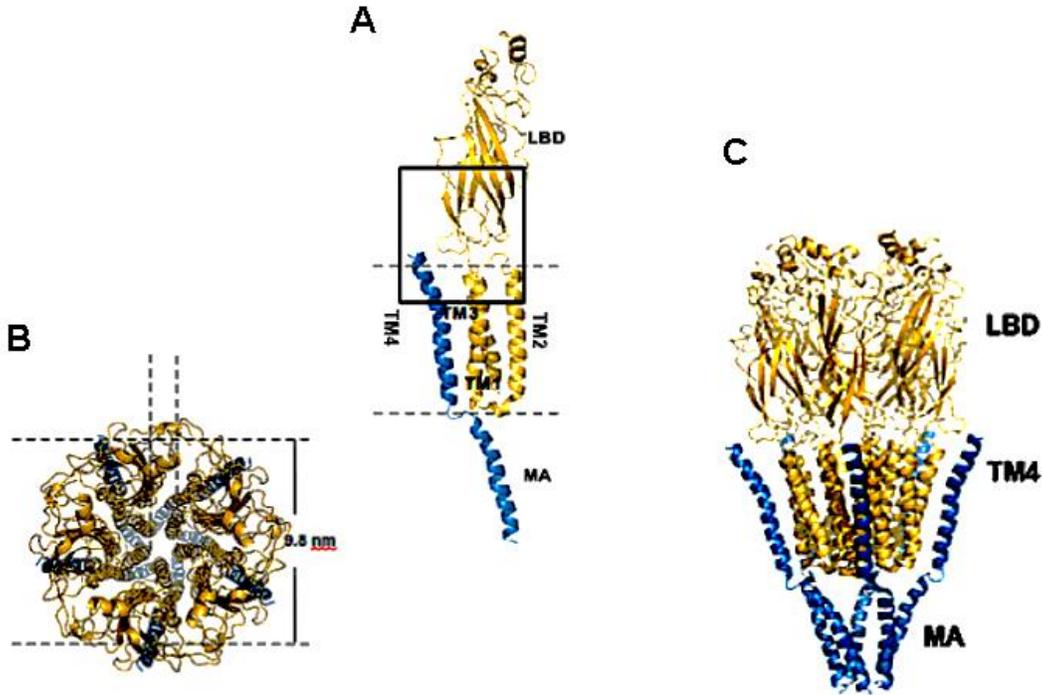
interneuronas de la médula espinal de gato. Sugiriendo así, la existencia de diferentes conformaciones de los receptores GABA<sub>A</sub>, basándose en las diferencias de activación entre ellas. Mientras una conformación es activada por el ácido cis-aminocrotónico, otra lo es por el ácido trans-aminocrotónico (Johnston et al., 1975), este componente se llamó inicialmente receptor GABAC y años después se le denominó GABA<sub>ρ</sub>.

La caracterización funcional de los receptores GABA<sub>ρ</sub> se realizó utilizando ovocitos de *Xenopus laevis*, a los cuales se les inyectó mRNA aislado del cerebro o de la retina de mamífero. Los ovocitos inyectados con el mRNA de la corteza cerebral presentaron respuestas características del receptor clásico GABA<sub>A</sub>, es decir corrientes rápidas transitorias provocadas por la desensibilización que presentan los receptores al ser activados por su agonista (Figura 3A). En contraste, los ovocitos inyectados con el mRNA de la retina presentaron respuestas con una activación rápida e inactivación lenta (Figura 3B), insensibles a bicuculina y baclofeno (antagonistas selectivos de los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub> respectivamente) y no presentaron modulación por barbitúricos y benzodiazepinas (Polenzani et al., 1991; Woodward et al., 1993). Estos estudios permitieron concluir que en la retina se expresan receptores funcionales a GABA diferentes a los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>B</sub>.



**Figura 3. Diferencias en las respuestas a GABA de los receptores GABA<sub>A</sub> y GABA<sub>ρ</sub> en *X. laevis*.** **A.** Corrientes transitorias generadas por GABA en ovocito de *X. laevis* inyectados con mRNA de corteza cerebral de bovino. **B.** Corrientes sostenidas generadas en respuesta a GABA en ovocito inyectado con mRNA de retina de bovino (Tomado de Polenzani et al., 1991).

La primera subunidad GABA<sub>ρ</sub> clonada se obtuvo de una biblioteca de cDNA de retina (Cutting et al., 1991). Se conocen tres subunidades GABA<sub>ρ</sub>: ρ1, ρ2 y ρ3, las cuales se pueden ensamblar como homo (Figura 4C) o heteropentámeros (Ogurusu et al., 1997; Shingai et al., 1996; Hackam et al., 1997). Cada una de estas posee cuatro dominios transmembranales (M) (Figura 4A), un pequeño dominio C-terminal extracelular y un dominio N-terminal extracelular largo que contiene dos residuos de cisteína, los cuales forman un puente bisulfuro. El dominio extracelular constituye el sitio de unión a GABA formado por la interfaz entre dos subunidades vecinas. El dominio M2 está localizado en la parte más interna del receptor, y la agrupación de estos dominios por parte de las cinco subunidades, forma el canal permeable a Cl<sup>-</sup> en el centro del receptor (Figura 4B). Existen diferencias en las secuencias aminoacídicas entre las subunidades GABA<sub>ρ</sub>, las cuales influyen en la farmacología, cinética del canal y conductancia del receptor (Estrada-Mondragón., 2010; Qian y Ripps., 1999; Qian y Ripps., 2008).



**Figura 4. Modelo estructural de los receptores GABA $\rho$ .** **A.** Diagramas de cintas de las subunidades que conforman a GABA $\rho$ 1 vistos en los planos del dominio transmembranal. **B.** Vista transversal y **C.** Vista longitudinal del receptor homomérico GABA $\rho$ 1. **LBD:** dominios largos de unión; **TM:** dominios transmembranales (1, 2, 3 y 4); **MA:** dominios asociados a membrana. (Modificado de Estrada-Mondragon et al., 2010).

### ***Características farmacológicas del Receptor GABA $\rho$***

Los receptores conformados por las subunidades GABA $\rho$  poseen una sensibilidad a GABA 10 veces mayor que la de los receptores GABA $\text{A}$  clásicos (Qian y Dowling., 1993; Woodward et al., 1993). Las subunidades GABA $\rho$  prácticamente no se desensibilizan al ser activados por el agonista (Enz., 2001; Polenzani et al., 1991). Los estudios de canal unitario indican que el receptor permanece abierto por un tiempo mayor y presenta conductancias al cloro menores que los receptores GABA $\text{A}$  (Feigenspan et al., 1993; Feigenspan y Bormann., 1998). Además, los receptores GABA $\rho$  presentan un perfil farmacológico particular; son insensibles a la bicuculina, (antagonista del receptor GABA $\text{A}$ ) y no son activados por baclofeno (agonista del receptor GABA $\text{B}$ ). Los

moduladores del receptor GABA<sub>A</sub> como los barbitúricos y las benzodiazepinas no tienen efecto sobre los receptores GABA<sub>ρ</sub>, mientras algunos neuroesteroides como: alotetrahydrodeoxicorticosterona, alfaxalona, alopregnanolona, pregnenolona, 5β-dihidroprogesterona y tetrahydrodeoxicorticosterona, potencian o inhiben las corrientes de GABA mediadas por estos (Johnston., 1996; Morris et al., 1999; Polenzani et al., 1991). Además del GABA, otros agonistas del receptor GABA<sub>ρ</sub>, son el muscimol, el ácido 4-trans-aminocrotónico (TACA), el ácido cis-aminocrotónico (CACA) y los enantiómeros cis y trans del ácido carboxílico 2-aminometilciclopropano (CAMP y TAMP) (Bormann y Feigenspan., 1995). Por otra parte, la isoguvacina, 4, 5, 6, 7-tetrahydrosoxazol (5,4-c) piridin-3-ol, ácido piperidin-4-sulfónico y el ácido Z-3-amidinotiopropenónico son antagonistas débiles del receptor GABA<sub>ρ</sub>. Mientras que el ácido 1, 2, 5, 6-tetrahidropiridin-4-metilsulfínico (TPMPA), la ciclotiazida y ácido acético 4-imidazol lo antagonizan fuertemente (Jones y Palmer., 2011; Ragozzino et al., 1996). Finalmente, las respuestas a GABA también son inhibidas por el ión zinc en los receptores GABA<sub>ρ1</sub> homoméricos (Calvo et al., 1994).

Los receptores GABA<sub>ρ</sub> se han estudiado principalmente en la retina, ya que se expresan predominantemente en neuronas bipolares. Empleando ratones knock out para GABA<sub>ρ1</sub> (Luckasiewicz et al., 2004; McCall et al., 2002), se encontró que la inhibición de las terminales axónicas en células bipolares es mediada en gran parte por GABA<sub>ρ</sub>, esta inhibición es la encargada de regular la excitabilidad de las células ganglionares. Lo anterior se propuso, después de eliminar la expresión del receptor y observar una reducción de las corrientes activadas por GABA, así como de las corrientes sinápticas inhibitorias evocadas con estímulos luminosos (L-IPSCs). Esto sugiere que GABA<sub>ρ</sub> determina el curso temporal y extiende la inhibición en las terminales de las estas neuronas, las cuales a su vez modulan la magnitud de la transmisión excitatoria que va hacia las neuronas ganglionares (Luckasiewicz et al., 2004). Adicionalmente, otros estudios en la retina de diferentes especies como el ratón, la salamandra y la tortuga,

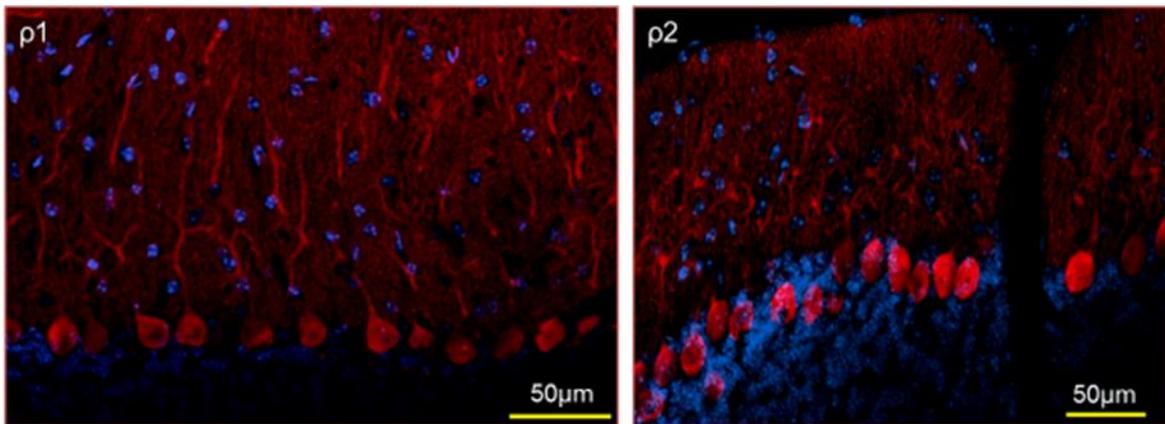
concuerdan con el hecho de que los receptores GABA $\rho$  participan en la modulación de la transmisión de señales entre las neuronas bipolares y ganglionares (Luckasiewicz, et al., 1994; et al., 1998; et al., 2004).

La expresión de los GABA $\rho$  ha sido identificada en otras regiones del SNC, mediante técnicas como “Northern blot”, “Western blot”, hibridación in situ, inmunohistoquímica y RT-PCR, (Enz y Cutting, 1998). En conjunto estos estudios demostraron la expresión de GABA $\rho$  en la corteza cerebral (Wegelius et al., 1998), los colículos superiores (Boue-Grabot et al., 1998), la médula espinal (Rozzo y Armelli., 2002), el hipocampo (Didelon et al., 2002; Rosas-Arellano et al., 2011), la pituitaria, el ganglio de la raíz dorsal, el bulbo raquídeo, el puente, el núcleo caudado, el tallo cerebral, el cuerpo calloso, (López-Chávez et al., 2005; Rosas-Arellano et al., 2007), la amígdala y la corteza visual (Rosas-Arellano et al., 2011), y el cerebelo (Harvey et al., 2006; Mejía et al., 2008).

En el cerebelo de roedores se ha reportado la expresión de GABA $\rho$  en las neuronas en canasta, de Golgi y de Purkinje (Harvey et al., 2006; López-Chávez et al., 2005; Mejía et al., 2008; Rosas-Arellano et al., 2007; Rozzo y Armelli., 2002). Existe una expresión diferencial de GABA $\rho$  en el cerebelo durante el desarrollo; mientras la expresión de GABA $\rho$ 1 y GABA $\rho$ 2 permanecen relativamente constantes, la expresión de GABA $\rho$ 3, aumenta significativamente en etapas adultas (P60). Esta expresión diferencial es más evidente en las neuronas en canasta y en las células de Purkinje (Mejía et al., 2008).

Las células de Purkinje que expresan GABA $\rho$  (Figura 5) (Harvey et al., 2006., Rosas-Arellano, 2012) se encuentran en contacto estrecho con la glía de Bergmann. Estas células expresan receptores GABA $\alpha$  y el transportador GAT1 (Barakat y Bordey., 2002., Riquelme et al., 2002), lo que sugiere que la

transmisión GABAérgica es clave en la fisiología de estos tipos celulares y para el correcto funcionamiento del cerebelo.



**Figura 5. Expresión de B  $\rho 1$  y B  $\rho 2$  en neuronas de Purkinje del cerebelo de ratón adulto.** Distribución de GABA $\rho 1$  y GABA $\rho 2$  en somas y árboles dendríticos de las neuronas de Purkinje que proyectan a la pía. (Rosas Arellano et al., 2012).

El papel de la activación de los receptores GABA $_A$  en células gliales, no se conoce del todo. Se sugiere que la despolarización causada por la activación de estos, activa canales de Ca $^{2+}$  dependientes de voltaje y propicia un aumento en los niveles de Ca $^{2+}$  intracelular (Bernstein et al., 1996; Fraser et al., 1994; Meier et al., 2008; Nilsson et al., 1993). Debido a que estas señales de Ca $^{2+}$  representan la forma de excitabilidad de los astrocitos, y el medio por el cual integran la actividad neuronal, se propone que las despolarizaciones mediadas por GABA son una vía importante a través de la cual las neuronas GABAérgicas influyen la actividad astrocítica (Vélez-Fort et al., 2012).

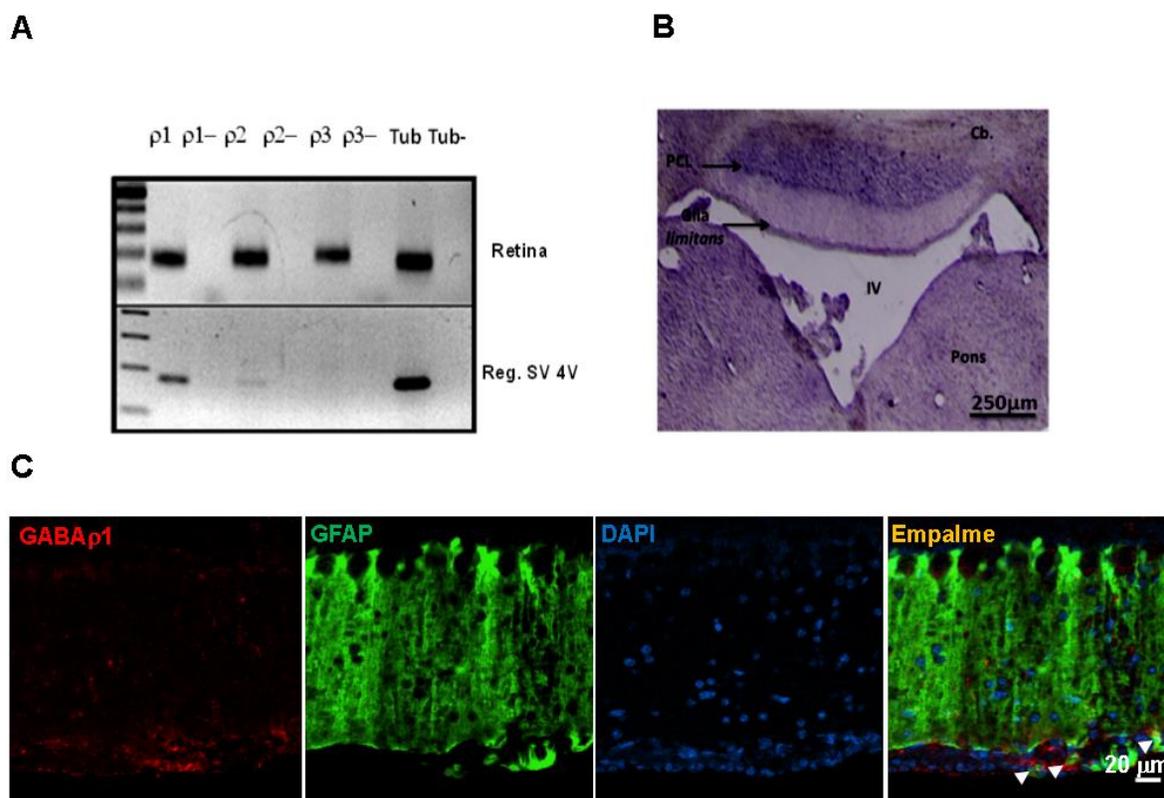
### ***Receptores GABA $_A$ en células GFAP $^+$ .***

Las primeras evidencias de que la glía, al igual que las neuronas, expresa receptores GABA $_A$  fueron descritas en cultivos primarios de astrocitos de la corteza cerebral (Bormann y Kettenmann., 1988; Kettenmann et al., 1984; Kettenmann y Schachner., 1985). Dichos estudios indican que las propiedades de

los receptores GABA<sub>A</sub> expresados en la glía no son muy distintas de aquellas observadas en las neuronas. Sin embargo, funcionalmente existe una diferencia, ya que las células gliales contienen mucho más Cl<sup>-</sup> que las neuronas (35 mM vs. ~3-5 mM), presentando un potencial de equilibrio para el Cl<sup>-</sup> cercano a -40mV, mientras que en neuronas es de -70mV. Como consecuencia, la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> en células gliales incrementa el flujo de iones Cl<sup>-</sup> e inhibe los canales de K<sup>+</sup>, por tanto, genera la despolarización de la célula (Verkhratsky y Butt., 2008).

Hoy en día se sabe que los receptores GABA<sub>A</sub> son expresados en la glía de Bergmann y en otros tipos de células gliales de diferentes regiones del cerebro (Verkhratsky y Butt., 2008). Mediante el uso de técnicas como el registro electrofisiológico y la inmunocitoquímica se han realizado estudios *in situ* de las propiedades y la localización de los receptores GABA<sub>A</sub> en células gliales de la retina (Clark y Mobbs, 1992; Malchow et al., 1989), el hipocampo (Steinhäuser et al., 1994), el cuerpo calloso (Berger et al., 1992) y el cerebelo (Müller et al., 1994).

Estudios aplicando técnicas de RT-PCR, hibridación *in situ* e inmunofluorescencia evidencian la expresión de GABA<sub>ρ</sub>1 y GABA<sub>ρ</sub>2 en células GFAP<sup>+</sup> de la zona subventricular del cerebelo (Figura 6) (González-González., 2011, Reyes-Haro et al., 2013). Es evidente que las células gliales expresan una amplia gama de subunidades del receptor GABA<sub>A</sub>, lo que hace interesante su estudio a nivel funcional en este tipo celular.



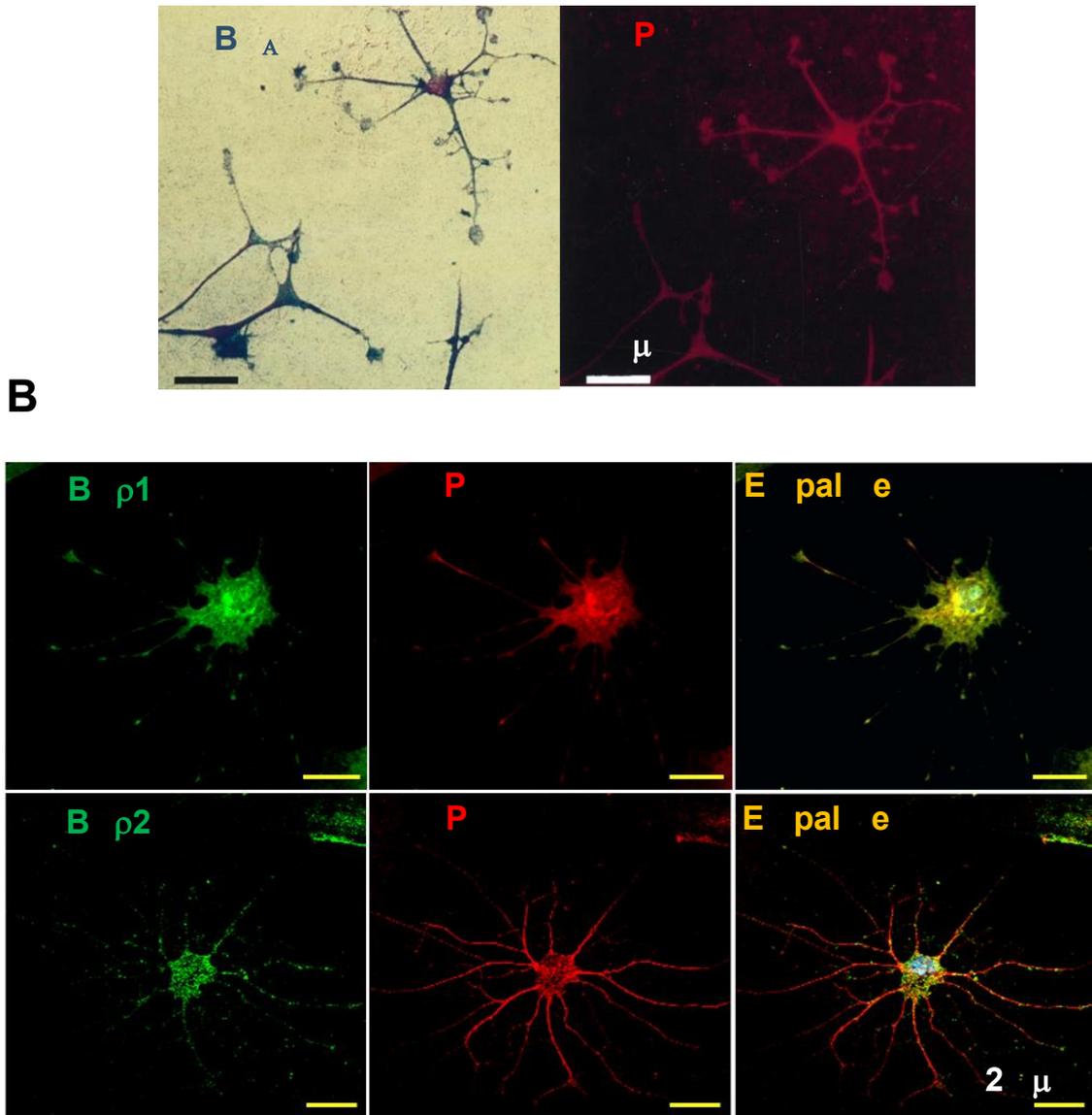
**Figura 6. Expresión de GABA $\rho$  en células gliales del cerebelo.** **A.** Estudios de RT-PCR indican la expresión de GABA $\rho$ 1 y GABA $\rho$ 2 en la zona subventricular del cuarto ventrículo, se empleó retina como control positivo. **B.** Mediante hibridación *in situ* se determinó la expresión de GABA $\rho$ 1 en la región que delimita el cerebelo del 4V, así como en las células de Purkinje. **C.** Localización de GABA $\rho$ 1 en células GFAP<sup>+</sup> (cabezas de flecha) que pertenecen a la zona que delimita el cerebelo del 4V (barra=20μm). Abreviaciones: **SV 4V**: Subventrículo del cuarto ventrículo, **IV**: cuarto ventrículo, **PC**: Células de Purkinje (González-González., 2011 y Reyes-Haro et al., 2013).

Los cultivos primarios de células gliales han sido ampliamente utilizados con el fin de determinar las propiedades de los receptores a GABA<sub>A</sub>, debido a que estos expresan a nivel de mRNA la mayoría de las subunidades:  $\alpha$ 1- $\alpha$ 5,  $\beta$ 1- $\beta$ 3,  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2S,  $\gamma$ 3 y  $\delta$  (Tabla. 1) (Bovolín., 1992).

<b>Expresión de las subunidades GABA<sub>A</sub> a nivel mRNA (mRNA amol/mg del total de RNA)</b>	
<b><i>Subunidad</i></b>	<b><i>Astroцитos</i></b>
$\alpha 1$	<b>3.5±0.52</b>
$\alpha 2$	<b>1.3±0.38</b>
$\alpha 3$	0.12±0.065
$\alpha 4$	0.2±0.044
$\alpha 5$	0.34±0.23
$\alpha 6$	ND
$\beta 1$	<b>2.9±0.86</b>
$\beta 2$	0.10±0.044
$\beta 3$	<b>1.9±0.19</b>
$\gamma 1$	<b>0.55±0.21</b>
$\gamma 2L$	ND
$\gamma 2S$	0.11±0.025
$\gamma 3$	0.17±0.026
$\delta$	0.088±0.025

**Tabla 1. Expresión de RNAs que codifican para diversas subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> en astroцитos en cultivo.** Expresión cuantitativa en atomoles ( $10^{-18}$  moles) por miligramo (amol/mg) de mRNA de las diferentes subunidades del receptor GABA<sub>A</sub>. En negritas subunidades expresadas en mayor cantidad; ND: no determinada. (Bovolin., 1992).

A nivel proteína se ha demostrado la expresión de receptores GABA<sub>A</sub>, así como de las subunidades GABA $\rho$ 1 y GABA $\rho$ 2 en células GFAP<sup>+</sup> en cultivo, (Figura 7) (Hösli., 1997; Pétriz., 2011).

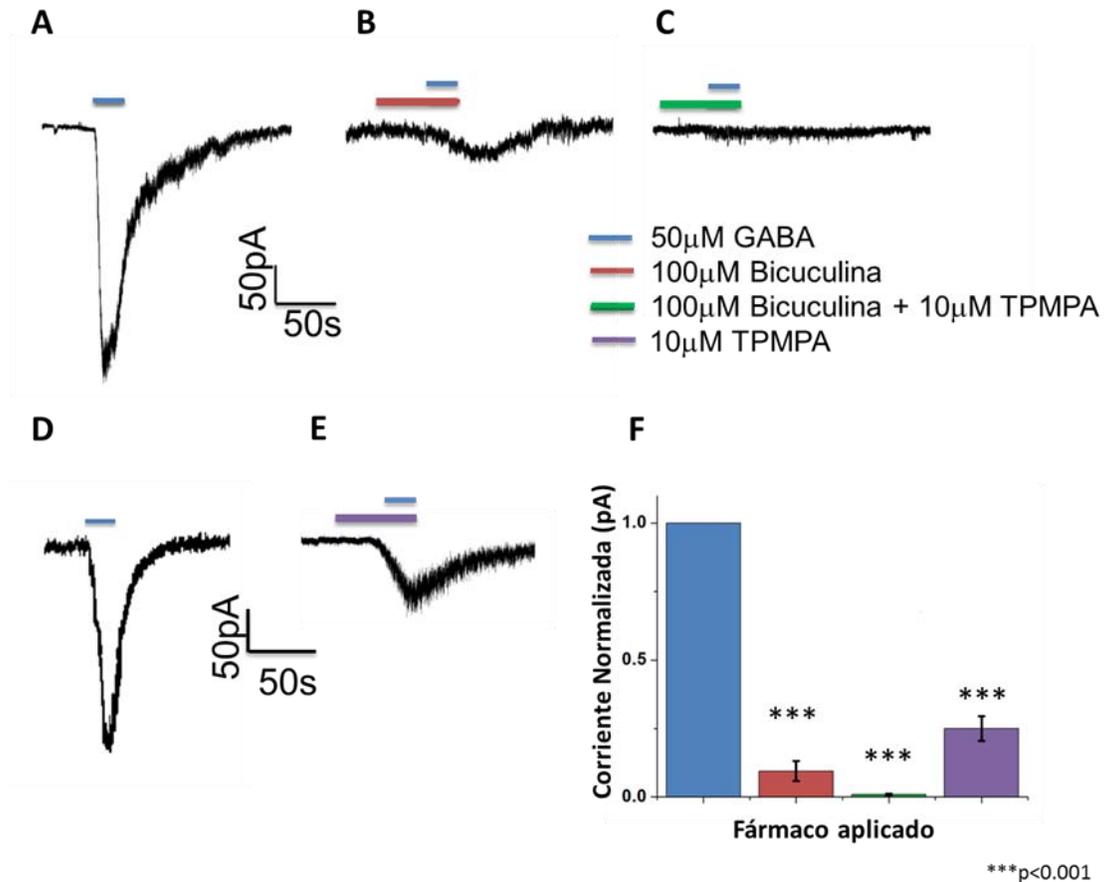


**Figura 7. Expresión de receptores  $GABA_A$  y  $GABA_\rho$  en células  $GFAP^+$  en cultivo. A.** Expresión de  $GABA_A$  (azul) en células  $GFAP^+$  (rosa). **B.** Inmunorreactividad de  $GABA_\rho1$  y  $GABA_\rho2$  (verde) en células  $GFAP^+$  (rojo) en cultivos primarios de cerebelo de ratón. Co-localización de las señales (empalme). Barras= 50 y 20  $\mu m$ . (Hösli, 1997 y Pétriz., 2011).

En estudios previos se demostró que los receptores  $GABA_A$  en los astrocitos de cerebelo en cultivo contienen las subunidades  $GABA_\rho$  y son funcionales (Figura 8). Adicionando a la solución extracelular bicuculina [100  $\mu M$ ] se produjo una inhibición del  $90.5 \pm 3.7\%$  (Figura 7B y 7F) de las respuestas a

GABA [50  $\mu$ M] (Figura 8A). Con ello, se comprobó que las respuestas generadas por GABA son mediadas por la activación de los receptores GABA<sub>A</sub>. Sin embargo, como podemos apreciar en la figura 7B, existe una corriente que persiste después de la aplicación de bicuculina (100  $\mu$ M), la cual pudiera deberse a la activación de GABA <sub>$\rho$</sub> . Para caracterizar este componente, se adicionó además del GABA [50  $\mu$ M] y la bicuculina (100  $\mu$ M); TPMPA [10  $\mu$ M], antagonista selectivo de los receptores GABA <sub>$\rho$</sub> , lo que produjo una inhibición de las respuestas a GABA del  $99.1 \pm 0.3\%$  (Figura 8C y 8F), sugiriendo así, la participación activa de las subunidades GABA <sub>$\rho$</sub>  en la generación de respuestas a GABA. En otro grupo de experimentos se evaluó el efecto del TPMPA [10  $\mu$ M] sobre las respuestas a GABA, el cual generó una disminución de las respuestas a GABA del  $81.1 \pm 5.9\%$  (Figura 8E y 8F), quedando al igual que con bicuculina un componente de corriente que no se inhibe. En conjunto, estos datos pusieron en evidencia una sensibilidad heterogénea para los antagonistas de los receptores GABA<sub>A</sub> y los GABA <sub>$\rho$</sub>  (Pétriz., 2011).

De acuerdo a la evidencia que tenemos sobre la expresión de subunidades de los receptores GABA<sub>A</sub> y sus características farmacológicas en los astrocitos en cultivo, se sugiere la posible formación de diferentes conformaciones de los receptores GABA<sub>A</sub>, pudiéndose presentar heterómeros que contengan las subunidades GABA <sub>$\rho$</sub> . Además, estos estudios proporcionan las bases de que existe una amplia expresión y composición de los receptores GABA<sub>A</sub> en la glía durante el desarrollo del cerebelo.

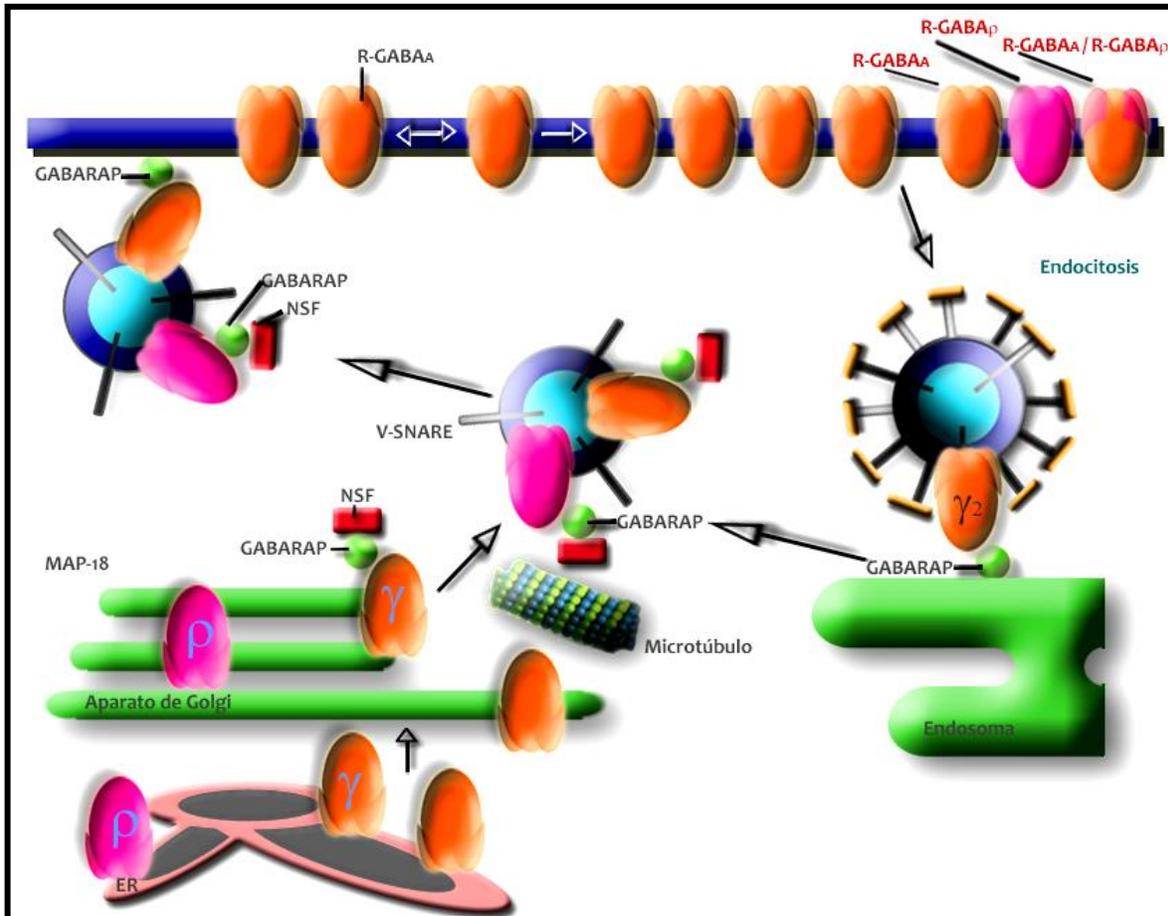


**Figura 8. Efecto de bicuculina y TPMPA sobre las corrientes mediadas por GABA en astrocitos en cultivo. A y D.** Respuestas inducidas por GABA 50 μM. **B.** Aplicación de bicuculina [100 μM] disminuye considerablemente ( $90.5 \pm 3.7\%$ ) las respuestas mediadas por GABA [50 μM] (línea azul). **C.** Bicuculina [100 μM] y TPMPA [10 μM] elimina en un ( $99.1 \pm 0.3\%$ ) la corriente que persiste al aplicar bicuculina [100 μM]. **E.** TPMPA [10 μM] bloquea parcialmente ( $81.1 \pm 5.9\%$ ) las respuestas mediadas por GABA [50 μM]. **F.** Gráfica de la amplitud de corrientes normalizadas generadas tras la aplicación de los diferentes fármacos. En azul: aplicación de GABA [50 μM]; en rojo: aplicación de bicuculina [100 μM]; en verde: aplicación de bicuculina [100 μM] y TPMPA [10 μM] y en gris: aplicación de tpmpa [10 μM]. Para cada fármaco se realizó una  $n=6$ . Asteriscos indican diferencias significativas entre los fármacos con el control, determinadas mediante ANOVA de una vía ( $p=3.638E-8$ ) y prueba de Dunnett ( $***p<0.05$ ) (Pétriz., 2011).

### ***Tráfico de receptores GABA<sub>A</sub>.***

Los receptores GABA<sub>A</sub> no permanecen como entidades estáticas en la superficie de las neuronas, sino que se encuentran transitando continuamente entre los compartimentos intracelulares y la membrana plasmática. Los principales procesos que sufren los receptores GABA<sub>A</sub> dentro de las células, son la síntesis y oligomerización de las subunidades del receptor, el ensamble de los receptores, el tráfico hacia la membrana plasmática y la inserción en la misma (Gurba., 2010).

La síntesis y oligomerización de las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> ocurre en el RE e involucra interacciones moleculares con proteínas chaperonas, este proceso es lento e ineficiente, se ha estimado que sólo el 30% de las subunidades sintetizadas pueden producir receptores funcionales en la superficie membranal (Green y Millar, 1995), mientras que el resto son retenidas en el RE y posteriormente degradadas. Una vez sintetizadas las diferentes subunidades, los receptores GABA<sub>A</sub> son ensamblados en el aparato de Golgi, donde sufren varias modificaciones, tales como, palmitoilación y glicosilación, para finalmente ser transportadas hacia la membrana plasmática. El ensamblaje del receptor ocurre por vías definidas, limitando con ello la cantidad de receptores GABA<sub>A</sub> en la superficie (Connolly et al., 1996). Finalmente, los receptores GABA<sub>A</sub> sufren constitutivamente endocitosis dependiente de la actividad GABAérgica. Una vez endocitados son reinsertados en la membrana plasmática o degradados en lisosomas (Figura 9). Se sabe que cada paso de síntesis, ensamble y tráfico de los receptores GABA<sub>A</sub> se encuentra regulado por señales localizadas dentro de las subunidades, así como por proteínas asociadas al proceso (Jacob et al., 2008; Sarto-Jackson y Sieghart., 2008).



**Figura 9. Dinámica del tráfico intracelular de los receptores GABA<sub>A</sub>.** Síntesis y oligomerización en el retículo endoplásmico (ER); ensamblaje del receptor en el Aparato de Golgi; Transporte hacia la membrana plasmática a través de la asociación del receptor a microtúbulos mediada por GABARAP. Internalización del receptor por medio de endocitosis; reinsertión del receptor a la membrana plasmática o degradación del mismo en endosomas. (Modificado de Kneussel, 2002).

El tráfico selectivo de los receptores GABA<sub>A</sub> ha sido estudiado principalmente en neuronas; sin embargo, muy poco es lo que se sabe de cómo estos receptores y en particular las subunidades GABA<sub>ρ</sub> son direccionadas en células de origen glial. Adicionalmente, la localización subcelular de los receptores GABA<sub>A</sub> en estas células aún se desconoce y es importante determinarlo para entender cuál es su papel dentro del control de la transmisión mediada por el GABA. Por tanto, en este trabajo se abordó el estudio de la expresión de las subunidades GABA<sub>ρ</sub> en astrocitos de cerebelo, su distribución y tráfico intracelular. Adicionalmente se propone la posibilidad de la síntesis de proteínas en los procesos distales de los

astrocitos debido al hallazgo de la localización de proteínas ribosomales en estos sitios.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La función de los receptores a neurotransmisores en los astrocitos aún no se comprende del todo. La evidencia sugiere que estos podrían conferirles la propiedad de comunicarse con neuronas y con otras poblaciones gliales.

Durante el desarrollo postnatal temprano del cerebelo ocurre una serie de eventos que requieren de la señalización a través del neurotransmisor GABA, el cual actúa sobre receptores específicos anclados a la membrana plasmática. La transmisión GABAérgica regula la proliferación y migración de precursores neuronales y del linaje astrocítico. Las células gliales expresan receptores GABA<sub>A</sub> incluyendo las subunidades GABA<sub>ρ</sub>, sin embargo, su patrón de expresión, localización y dinámica de tráfico intracelular no son conocidas aún.

Por tanto, entender los mecanismos del tráfico selectivo de receptores y sus alteraciones son de suma importancia para comprender mejor la participación de los astrocitos como elementos activos en las sinapsis GABAérgicas y los elementos partícipes en dicha comunicación.

Para alcanzar nuestros objetivos aprovechamos que el cerebelo contiene una gran cantidad de astrocitos, la importancia de la transmisión GABAérgica en esta zona y el potencial que ofrecen los astrocitos en cultivo, en los que se han logrado estudiar las características electrofisiológicas y farmacológicas de las subunidades GABA<sub>ρ</sub> *in vitro*.

#### **4. HIPÓTESIS**

Los receptores GABA<sub>A</sub> presentes en los astrocitos del cerebelo en etapas tempranas del desarrollo incluyen subunidades GABA<sub>ρ</sub>, éstas interactúan con otras subunidades formando receptores heteroméricos cuyo tráfico hacia la membrana plasmática se efectúa a través de movimientos direccionados hacia la membrana plasmática.

#### **5. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la expresión de las subunidades GABA<sub>ρ</sub> en células GFAP<sup>+</sup> del cerebelo de ratón durante el desarrollo postnatal temprano, evaluar si las subunidades GABA<sub>ρ</sub> forman heterómeros con otras subunidades de GABA<sub>A</sub> y estudiar la dinámica del tráfico de GABA<sub>ρ</sub> hacia la membrana plasmática.

#### **6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar la expresión de GABA<sub>ρ</sub> en astrocitos de cerebelo de ratón en estadios postnatales tempranos.
2. Evidenciar si GABA<sub>ρ</sub> interactúa con otras subunidades de GABA<sub>A</sub> y su distribución en astrocitos en cultivo.
3. Evaluar la dinámica de tráfico de las subunidades GABA<sub>ρ</sub> hacia la membrana plasmática.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Procesamiento del tejido y cortes histológicos de cerebelo.**

Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las políticas éticas establecidas por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se utilizaron cerebelos del ratón transgénico GFAP-eGFP (Nolte et al., 2001) de 5, 10 y 30 días postnatal (p5, p10 y p30; respectivamente) Primero se fijó el tejido por medio de perfusión intracardiaca con 4% paraformaldehído (No. CAS: 30525-89-4) en 0.1 M de solución amortiguadora de fosfatos (PBS: 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 2 H<sub>2</sub>O, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH7.4) los cerebros fueron removidos, crioprotectados con gradientes de sacarosa (10, 20 y 30%), congelados y finalmente cortados en secciones coronales de 40 µm en un criostato (Leica® CM3050S).

### **Inmunofluorescencia**

La inmunofluorescencia se realizó de acuerdo al protocolo previamente descrito por Rosas-Arellano et al., 2007, con algunas modificaciones. Las secciones coronales de cerebelo procedentes de ratones transgénicos GFAP-eGFP (p5, p10 y p30) fueron permeabilizadas en una solución de 0.4% Tritón en PBS, posteriormente se incubó en la solución de bloqueo (2.0% suero normal de burro, 1.0% BSA, 1.0% Tritón y 0.5% Tween20 en PBS); y posteriormente con el anticuerpo primario (ver Tabla 2 para lista de anticuerpos) por 48 hr a 4°C diluido en 0.1% Tween20 en PBS; después se lavaron varias veces en PBS-T20 y se incubó el anticuerpo secundario (Tabla 2). Se lavó el tejido en PBS y se realizó una contra-tinción de núcleos con 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI). Finalmente, se montaron las muestras en porta objetos utilizando el medio Vectashield H-1000 (Vector Laboratories).

Las imágenes se capturaron en el microscopio confocal Zeiss LSM510 Meta, se tomaron con un objetivo EC Plan-Neofluar 40x/1.30 Oil DIC M27, cada 2-5  $\mu\text{m}$ . Para excitar los fluoróforos Alexa488, Alexa594 y DAPI se emplearon las siguientes longitudes de onda: 488 nm, 561 nm y 730 nm, respectivamente. Las imágenes tomadas se reconstruyeron y analizaron con el software ImageJ.

**Tabla 2:** Lista de Anticuerpos empleados en los diferentes experimentos.

<b>Anticuerpos Primarios</b>			
<b>Anticuerpo</b>	<b>Compañía</b>	<b>No. Cat</b>	<b>Uso</b>
<b>Rabbit IgG anti-GABA<math>\alpha</math>1</b>	Millipore	06-868	WB IF
<b>Rabbit IgG anti-GABA<math>\alpha</math>1-6</b>	Santa Cruz Biotechnology	sc-14005	WB IF
<b>Rabbit IgG anti-GABA<math>\rho</math>1</b>	Santa Cruz Biotechnology	sc-25707	WB IF IG
<b>Goat IgG anti-GABA<math>\rho</math>1</b>	Santa Cruz Biotechnology	sc-21338	WB IF
<b>Goat IgG anti-GABA<math>\rho</math>2</b>	Santa Cruz Biotechnology	sc-30254	WB IF
<b>Goat IgG anti-GFAP</b>	Santa Cruz Biotechnology	sc-6171	WB IF
<b>Guinea pig anti GABA<math>\gamma</math>2</b>	Synaptic system	224004	IF
<b>Anticuerpos secundarios</b>			
<b>Rabbit anti-goat IgG-AP</b>	Santa Cruz Biotechnology	sc-2771	WB
<b>Goat anti-rabbit IgG-AP</b>	Santa Cruz Biotechnology	sc-2034	WB
<b>Alexa 594 conjugated donkey anti-goat</b>	Molecular Probes	A-11058	IF
<b>Alexa 594 conjugated donkey anti-rabbit</b>	Molecular Probes	R37119	IF
<b>Alexa 488 conjugated donkey anti-rabbit</b>	Molecular Probes	R37118	IF

## **Cultivos primarios de astrocitos**

Los cultivos de astrocitos se realizaron con cerebelos de ratones CD1 de 5 días de edad postnatal. Una vez disecado el cerebelo, se disociaron las células mecánicamente y se sembraron aproximadamente 200 000 células por caja Petri de 35 mm. Las células disociadas crecieron en el medio de cultivo de Dulbecco Modificado por Eagle (DMEM), suplementado con 10% de suero bovino fetal, 100UI/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomicina. El medio de cultivo fue remplazado al siguiente día y posteriormente cada tercer día. En estas condiciones más del 90% de las células cultivadas resultó ser inmunopositivas para GFAP (Reyes-Haro et al., 2005).

## **Extracción de RNA y RT-PCR**

El RNA total de cerebelo y de astrocitos en cultivo se aisló siguiendo las instrucciones de manufactura del reactivo TRIzol® (Invitrogen). El RNA se suspendió en agua previamente tratada con DEPC para llevarlo a una concentración de 500ng/µl y posteriormente se realizó la transcripción reversa a cDNA utilizando el Kit One-step RT-PCR system with Platinum® (Invitrogen), que contiene la enzima SuperScript™ III y la Taq DNA polimerasa. Para cada reacción se utilizó la siguiente mezcla: 300ng del RNA total; 0.2µl de enzima; 5µl de Buffer de reacción, 2.2µl de agua DEPC y 1µl de cada uno de los oligos (Iniciados (F) y reverso (R)). La mezcla se calentó a 55°C por 30 minutos para sintetizar el cDNA y posteriormente se calentó a 94°C por 2 minutos para detener la reacción de retro-transcripción. La reacción de PCR se realizó de acuerdo a las especificaciones de fabricación (Invitrogen), usando los oligonucleótidos específicos para cada transcrito: GABA $\alpha$ 1 ( $\alpha$ 1), GABA $\gamma$ 2 ( $\gamma$ 2), GABA $\rho$ 1 ( $\rho$ 1), GABA $\rho$ 2 ( $\rho$ 2) y GFAP (Tabla 3). Todas las reacciones se realizaron a 94°C por 30 seg, 55°C por 30 seg y 68°C por 30 seg, en 35 ciclos. Una vez terminada la reacción, se analizaron 2µl

de cada una mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% (Rosas-Arellano et al., 2011).

**Tabla 3.** Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de RT-PCR

<b>Gen</b>	<b>Oligo F 5' - 3'</b>	<b>Oligo R 5' - 3'</b>	<b>Producto pb</b>
<b>α1</b>	atggacagccctccaagatgaac	catatcgtggtctgaaactggtccg	<b>177pb</b>
<b>γ2</b>	tgcccaaacctggtatgacagacg	taactggagaactccagggggcagg	<b>289pb</b>
<b>ρ1</b>	cgaggagcacacgacgatgcc	ctgcacatccacgcccacagg	<b>197pb</b>
<b>ρ2</b>	cctgatggctctcgtggagag	ccaaggctggcctcatggtg	<b>197pb</b>
<b>GFAP</b>	agccagcagaggcagggcagg	tctctgcacgctcgtcgccc	<b>239pb</b>

### **Preparación de membranas.**

Se siguió el protocolo establecido en Miledi et al, 2002. Los astrocitos en cultivo, se re-suspendieron y congelaron a -80°C en PBS1X (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> • 2 H<sub>2</sub>O, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH7.4). Para la extracción de proteínas se colectaron las células por centrifugaron a 4°C por 5 minutos a 9 500 X g y se eliminó el sobrenadante. Utilizando un homogeneizador de teflón, se lisó 0.5 g de muestra con 2 ml de buffer de glicina (200 mM glicina, 150mM NaCl, 50 mM EGTA, 50 mM EDTA y 300 mM sacarosa; pH9), 0.45 µl de apoproteína y 20 µl del inhibidor de proteasas PMSF. El homogenizado se colectó y centrifugó por 15 minutos a 9 500 X g y 4°C. Posteriormente el sobrenadante se centrifugó por 2 hr a 100 000 X g y 4°C. Se lavó la pastilla y se re-suspendió en glicina 5 mM, finalmente se guardó a -80°C

### **Co-inmunoprecipitación.**

Los extractos de membrana de astrocitos y cerebelo se incubaron por 24 hr a 4°C con el anticuerpo primario generado en cabra anti-GABA<sub>p</sub>1 (goat IgG anti-GABA<sub>p</sub>1, Santa Cruz Biotechnology); como control negativo se omitió la

incubación del anticuerpo en las muestras. Posteriormente se adicionaron 40  $\mu$ l de Proteína G acoplada a cuentas de agarosa al 4% (Sigma, Aldrich) y se incubó a 4°C por 4 hr. Para separar la resina formada, se centrifugó a 9 500 X g por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante. La pastilla se lavó tres veces con glicina 5 mM, centrifugando a 9 500 X g por 5 minutos. Una vez limpia la pastilla se agregó 100 $\mu$ l de buffer de carga 1X a las muestras y se calentaron a 95°C por 5 minutos. Después de desnaturalizar las muestras, se centrifugaron a 9 500 X g por 3 minutos y se fraccionó el sobrenadante en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 12%. El gel se corrió a voltaje constante (80 V) y las proteínas se electrotransferieron a membranas de nitrocelulosa. Una vez transferidas, las membranas fueron incubadas con solución bloqueadora (leche libre de grasas 5% (Biorad®), en solución salina amortiguadora de tris - Tween20 (TBST: 20mM Tris-base; 150mM NaCl; 0.1% Tween20; pH: 7.6), toda la noche a 4°C y se realizó la inmunodetección incubando por 48 hr a 4°C con anticuerpos primarios generados en conejo contra GABA $\rho$ 2 o GABA $\alpha$ 1- $\alpha$ 6; como anticuerpo secundario se utilizó el anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina (AP) generado en cabra anti-conejo (Tabla 2) (Harvey et al., 2006).

### **Doble-Inmunofluorescencia**

Para determinar la distribución de las diferentes subunidades del receptor GABA $_A$  en células GFAP+, se realizaron dobles-inmunofluorescencias, como se describe a continuación: las células fueron lavadas con 0.1M PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4% en 0.1M PBS, y se lavaron nuevamente en 0.1M PBS. Para evitar reconocimientos inespecíficos, se empleó solución de bloqueo (2% suero normal de burro, 0.1% albumina de suero bovino, 0.1% Triton y 0.05 % Tween 20 en PBS); posterior a esto, las células se incubaron por 48 hr a 4°C con los anticuerpos primarios (Tabla 2), diluidos en solución de incubación (0.05 % Tween 20 en PBS). A continuación, las células se lavaron con PBS y se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos secundarios. Después de lavados con 0.5

% Tween 20 en PBS, se incubó el segundo anticuerpo primario anti-GFAP por 48 hr, una vez transcurrido el tiempo, se lavaron las células con PBS-T20 y se incubó toda la noche el segundo anticuerpo secundario. Finalmente se realizó contratinción con DAPI. (Nota: En algunos casos se reemplazó el anti-GFAP por el anticuerpo anti- $\rho$ 1 en cabra).

Las células se montaron en Vectashield H-1000 y se observaron en un microscopio confocal Zeiss LSM510 Meta; objetivo EC Plan-Neofluar 40x/1.30 Oil DIC M27; captura en el eje de las z de 0.4  $\mu$ m; longitud de onda de 561nm para excitar Alexa 594, 488nm para Alexa488 y 750nm para DAPI; las imágenes fueron reconstruidas y analizadas con el software *ImageJ* (Rosas-Arellano et al., 2007).

### **Expresión de proteínas fluorescentes en células en cultivo y análisis de las trayectorias de GABA $\rho$ 2-GFP.**

Con el fin de dilucidar el tráfico de GABA $\rho$ 2, se expresó una proteína de fusión entre la proteína verde fluorescente y la subunidad GABA $\rho$ 2, subclonadas en un vector adenoviral (Martínez-Delgado et al 2012) y para delimitar la morfología de las células se utilizó el vector adenoviral que porta el gen que codifica para la proteína mCherry soluble. La trayectoria de los cúmulos de fluorescencia de GABA $\rho$ 2-GFP se analizó bajo un microscopio invertido de epifluorescencia (Olympus, CKX41, cámara Olympus DP70 U-CMAD3; objetivo: LCAch 40x/0.55Php). Se tomaron 30 imágenes de cada célula con una frecuencia de 0.017 Hz a temperatura ambiente. La distribución y dinámica de las partículas fluorescentes se analizó con ImageJ (Analyze Particles and MTrackJ plugins) y la movilidad de los cúmulos y sus Distancias Cuadráticas Medias (DCM) se calcularon y graficaron con el software Origin 8 Pro (Osborne et al., 2009).

## Expresión de proteínas fluorescentes acopladas a marcadores de organelos en células en cultivo.

Una vez identificada la distribución de GABA $\rho$ 2-GFP, evaluamos la distribución de varios organelos en astrocitos en cultivo, para determinar si sus patrones de distribución son similares, para ello, se transfectaron plásmidos que codifican para proteínas específicas para estos compartimentos, las cuales se encuentran fusionadas a proteínas fluorescentes (Tabla 4). Las transfecciones se efectuaron en células en cultivo (2 días in vitro), se empleó Lipofectamine PLUS<sup>TM</sup> Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), de acuerdo a las especificaciones de manufactura; 48 hr después se observó la distribución de las proteínas en un microscopio de epifluorescencia vertical (Zeiss LSM 510, cámara: AxioCamMRC; Objetivo: Olympus LumplanF1/IR 60x/0.90 W  $\infty$ /0).

Para conocer la distribución de RNA y DNA en los astrocitos en cultivo, se incubaron las células en Yoduro de Propidio (IP) (Molecular Probes) por 30 min, se montaron las muestras y se observaron al microscopio.

**Tabla 4:** Lista de plásmidos empleados para marcar organelos.

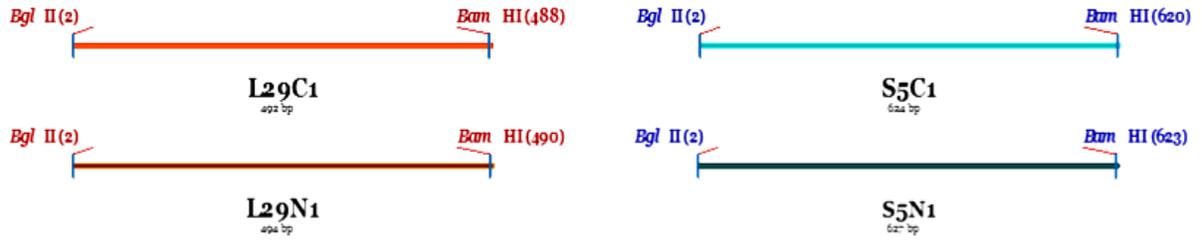
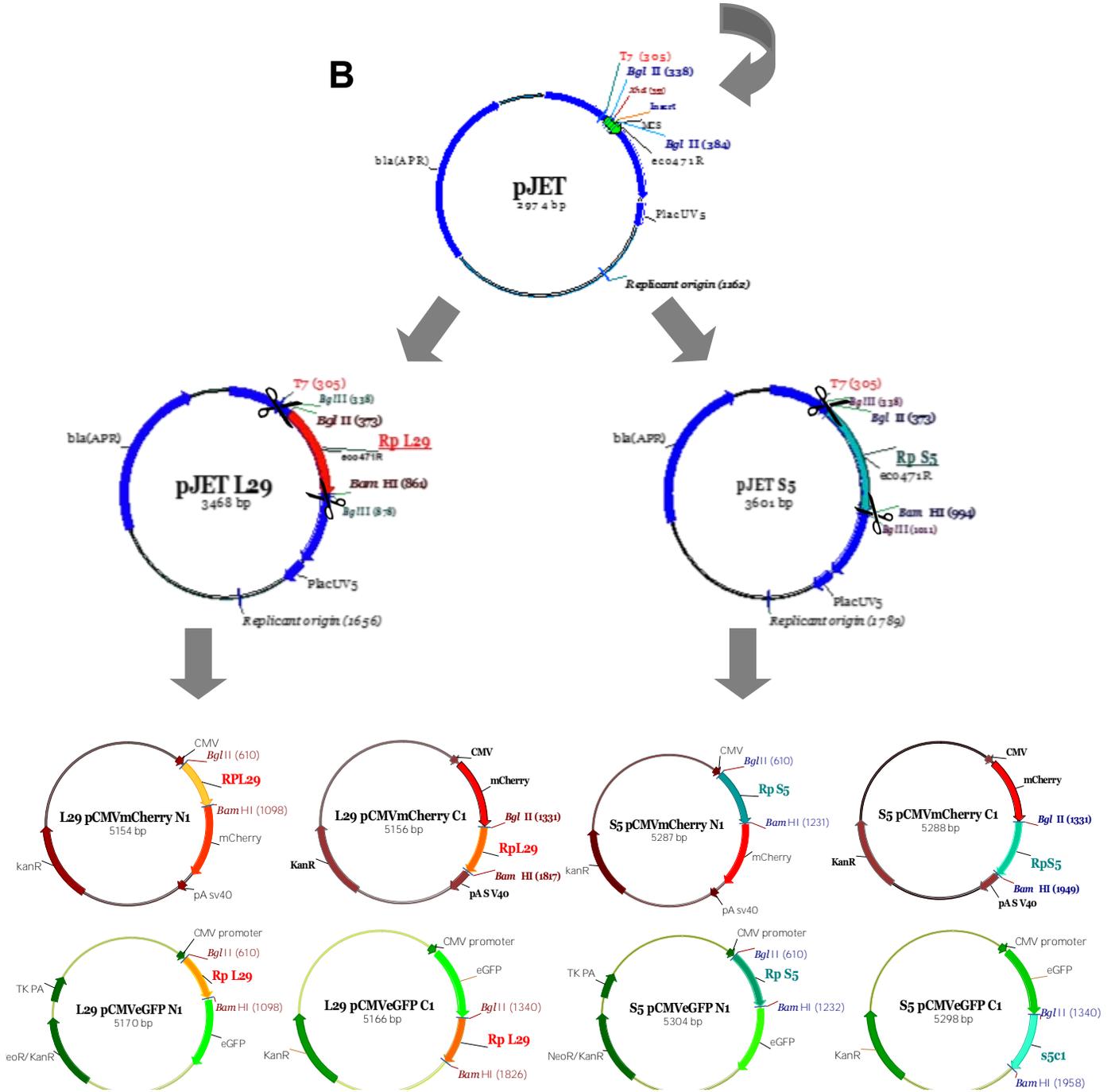
No. Plásmido Addgene	Proteína específica:	Proteína fluorescente:	Marca:
49155	Sec61 $\beta$	pmCherry	Retículo endoplásmico
27679	Rab5a	pmCherryC1	Endosomas tempranos
12661	Rab7	DsRed	Endosomas tardíos
12679	Rab11	DsRed	Endosomas de reciclaje
1817	Lamp1	RFP	Lisosomas
14873	eNos(1-33)	CFP	Golgi

## Estrategia de clonación de RpL29 y RpS5 en vectores de expresión eGFP y mCherry.

Con el objetivo de determinar la distribución de ribosomas en los astrocitos se generaron fusiones de proteínas fluorescentes con un componente de la subunidad mayor del ribosomal (RpL29) y otro de la subunidad menor (RpS5). En primera instancia se clonaron los cDNAs que codifican para estas proteínas, para ello se obtuvo RNA total de cerebro de ratón utilizando Trizol. Se sintetizó el cDNA empleando el kit SS@III One-Step RT-PCR (Invitrogen™) con los oligonucleótidos (basados en las secuencias: gi|568962807 y gi|254675269, especificados en la Tabla 5) que permitieron la amplificación específica de los cDNAs a los cuales se les incluyó los sitios de restricción (BglII y BamHI). El producto de PCR se clonó en el plásmido pJET usando el kit CloneJET PCR Cloning (ThermoFisher Scientific) y se corroboró la identidad del cDNA por secuenciación. Se liberaron los insertos con las enzimas de restricción mencionadas previamente y se ligaron en los vectores de expresión pEGFP (-N1 y -C1) y pmCherry (-N1 y -C1) (Clontech), para expresar las proteínas fusionadas en el amino (N) o en el carboxilo (C) terminal de las proteínas fluorescente (Figura 10).

**Tabla 5:** Oligonucleótidos para clonar las proteínas RpL29 y RpS5.

Gen	Oligo F 5' - 3'	Oligo R 5' - 3'	Producto pb
<b>BgLIIRpL29BamHI-C1</b>	Agatctatggccaagtccaagaa ccac	Ggatcctggggccttcacagg gg	<b>492</b>
<b>BgLIIRpL29BamHI-N1</b>	Agatctatggccaagtccaagaa ccac	Ggatccctggggccttcaca g	<b>494</b>
<b>BgLIIRpS5BamHI-C1</b>	Agatctatgactgagtgggaagca gccaca	Ggatccgcggttagactggc caca	<b>624</b>
<b>BgLIIRpS5BamHI-N1</b>	Agatctatgactgagtgggaagca gccaca	Ggatcctctgcggttagacttg gcca	<b>627</b>

**A****B**

**Figura 10: Estrategia de clonación de RpL29 y RpS5 en los vectores de expresión eGFP-C1/N1 y mCherry-C1/N1.** **A.** de los fragmentos que codifican para las proteínas ribosomales RpL29 y RpS5 clonadas a partir de RNA de cerebro de ratón, con los sitios de restricción específicos BglII y BamHI (C1 y N1 indican el vector de expresión al que van dirigidas los insertos). **B.** Inserción de los fragmentos en el plásmido pJET. **C.** Liberación de los insertos del plásmido pJET con las enzimas de restricción específicas. **D.** Inclusión de las secuencias en los vectores de expresión pCMVmCherry-C1/N1 y pCMVeGFP-C1/N1. Cultivos organotípicos de cerebelo de ratón y electroporación.

### **Electroporación y cultivos organotípicos de cerebelo de ratón.**

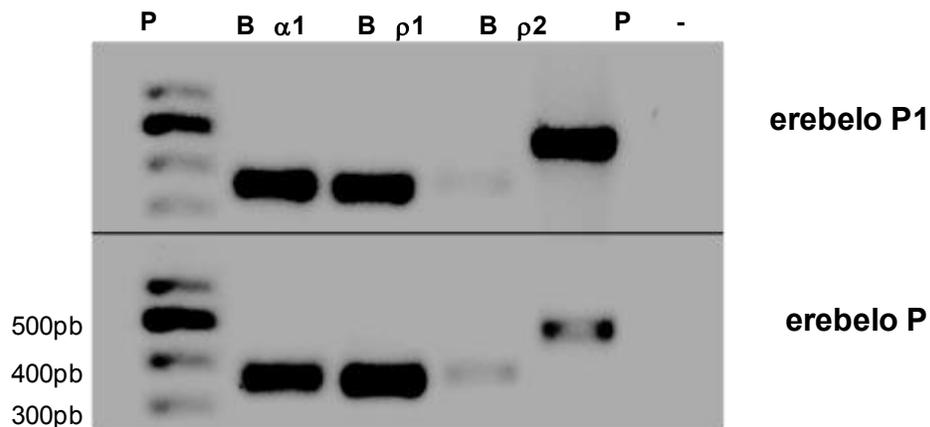
Se emplearon ratones de 6-8 días postnatal (CD1 y GFAP-eGFP). Se extrajo el cerebro y se sumergió en líquido cefalorraquídeo artificial frío (1 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 mM D-Glucosa; 4 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 26 mM NaHCO<sub>3</sub>; 246 mM Sacarosa; 5 ml Rojo de Fenol; pH 7.3) y en un vibratomo (Leica VT1000A) se cortó en rebanadas coronales de 350  $\mu$ m. Bajo condiciones asépticas, se colocaron las rebanas por separado en la cámara de electroporación, la cual contenía el plásmido correspondiente [20  $\mu$ g; 100  $\mu$ l de PBS], con el electroporador (Electro Square Porator ECM 830, BTX Harvard apparatus), se aplicaron 5 pulsos de 100 V, con una duración de 50 ms cada uno y un intervalo de 500 ms entre uno y otro. Posterior a la electroporación y dentro de una campana de flujo laminar, se colocaron de tres a cinco rebanas sobre un inserto estéril de 0.4  $\mu$ m (Millipore PICM0RG50) dentro de una placa Petri de 35 mm, se incubaron a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> con 1.2 ml de medio de cultivo (75% MEM (Gibco); 25% Suero de caballo inactivado con calor (Gibco/Lifetech); 25 mM HEPES; 1 mM L-Glutamina (Merck); 5mg/ml Glucosa; 100u/ml Penicilina/estreptomicina); 48 hr después se observó la distribución de la fluorescencia y se fijaron las muestras por 2 hr en paraformaldehído al 4%. (Opitz-Araya y Barria., 2011) Se contra-tiñeron los núcleos con DAPI y se analizó la distribución de las proteínas ribosomales en células GFAP<sup>+</sup> por microscopía confocal (Zeiss LSM 780; Objetivo: EC Plan-Neofluar 40x/1.30 Oil DIC M27; captura en el eje de las z de 1-5  $\mu$ m; longitud de onda de 561nm para excitar mCherry, 488nm para eGFP y 750nm para DAPI).

## 8. RESULTADOS

### Receptores GABA<sub>A</sub> en las células gliales del cerebelo.

En estudios previos se reportó la expresión de las subunidades GABA<sub>ρ</sub> en células gliales ependimales (EGCs), localizadas en el techo del cuarto ventrículo (Reyes Haro et al 2013), lo que nos impulsó a analizar con mayor detalle la expresión de las subunidades GABA<sub>ρ</sub> en etapas tempranas del desarrollo postnatal en células gliales del cerebelo de ratón.

Para determina la expresión de las subunidades GABA<sub>ρ</sub> en estas etapas, realizamos ensayos de RT-PCR, los cuales muestran la expresión a nivel de mRNA de GABA<sub>ρ</sub>1 y GABA<sub>ρ</sub>2 en el cerebelo de ratón p5, p10 y p30. Adicionalmente se probó la expresión de GABA<sub>α</sub>1 (Figura 11 y 15B).

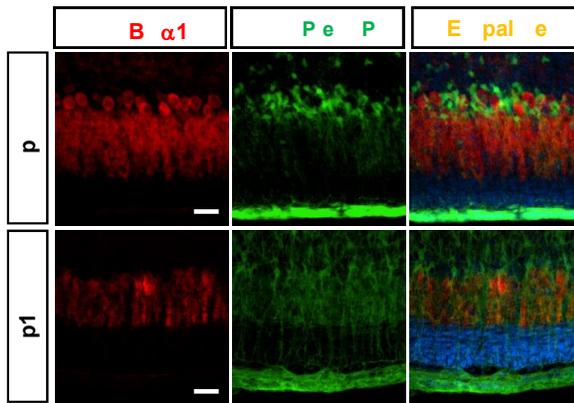
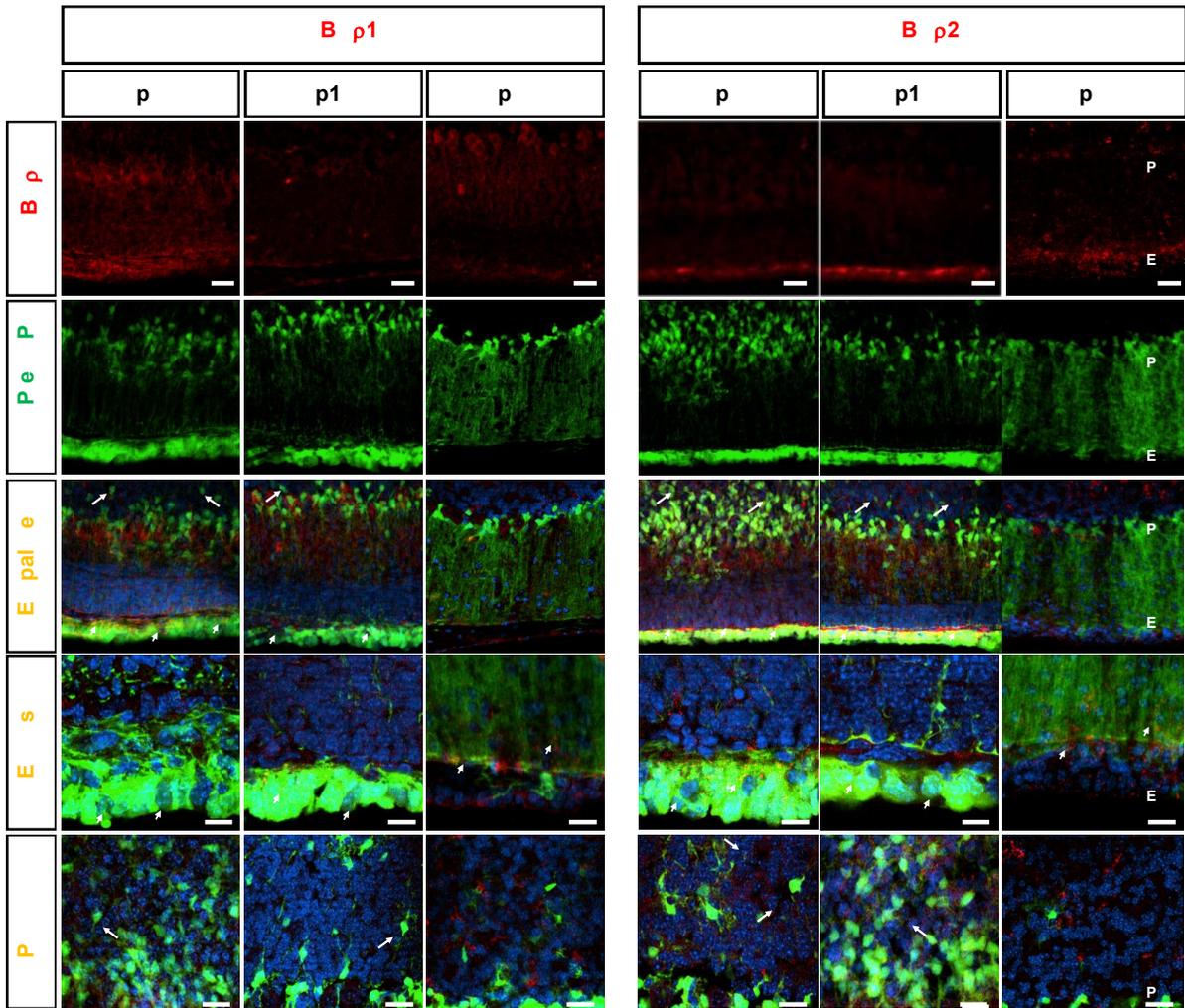


**Figura 11. Expresión del mRNA de GABA<sub>α</sub>1, GABA<sub>ρ</sub>1 y GABA<sub>ρ</sub>2 en cerebelo de ratón p5 y p10. A.** Gel de agarosa mostrando la amplificación de GABA<sub>α</sub>1, GABA<sub>ρ</sub>1, GABA<sub>ρ</sub>2 y GFAP en cerebelo p5 y p10. Como control negativo (-): muestra cDNA. Tamaño de las bandas: GABA<sub>α</sub>1:177pb; GABA<sub>ρ</sub>1: 197pb; GABA<sub>ρ</sub>2: 197pb; GFAP: 239 pb. **MP:** Marcador de peso molecular; **pb:** pares de bases.

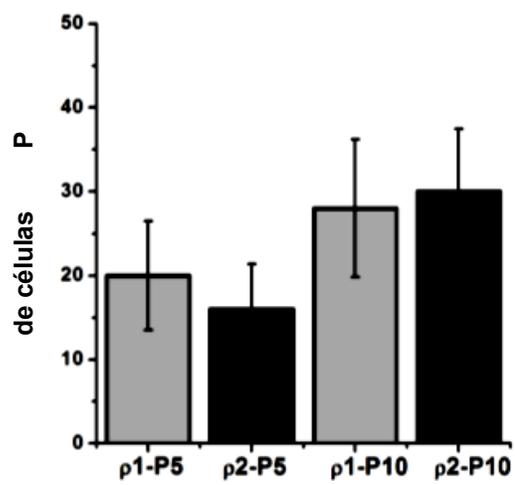
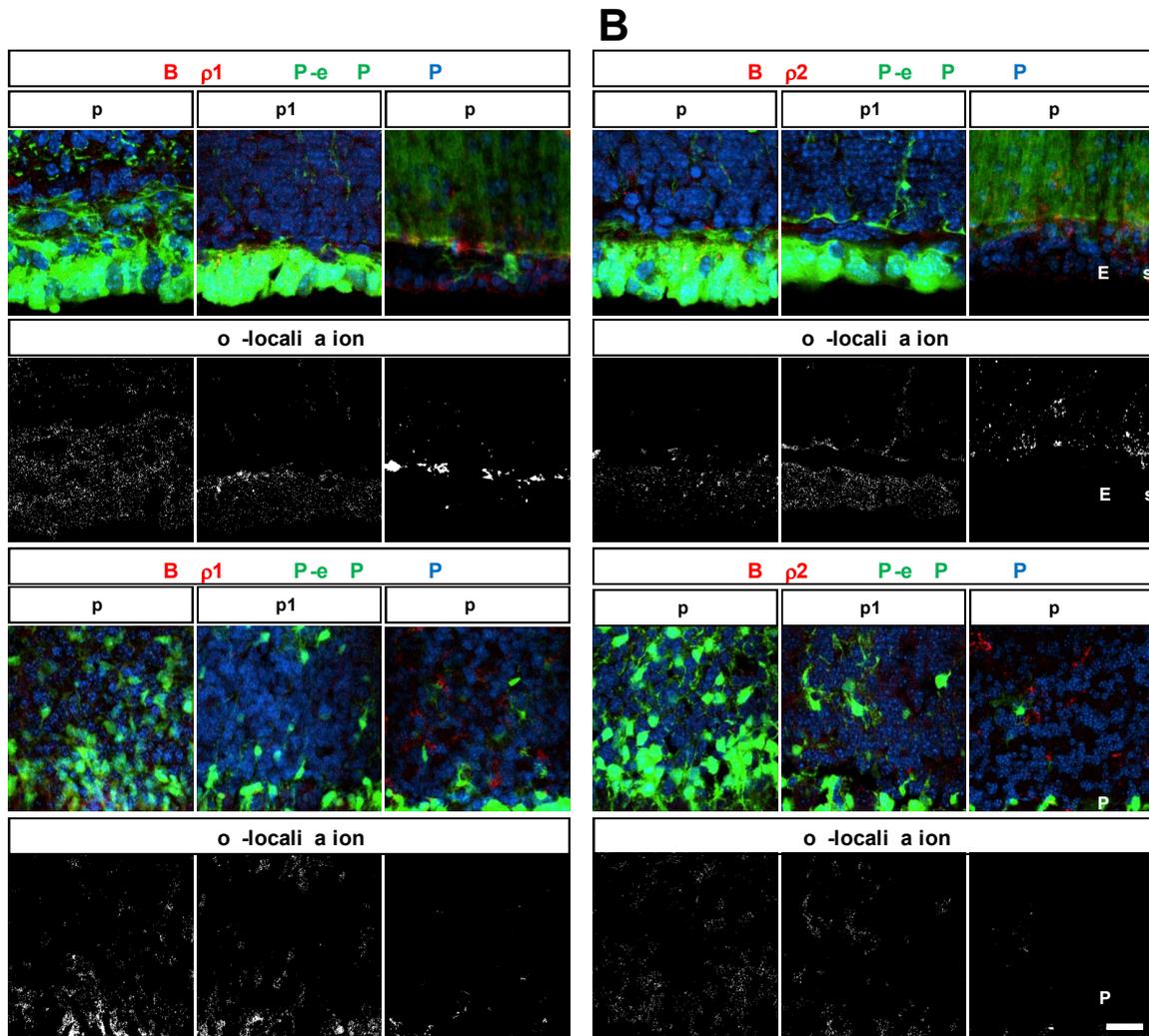
Experimentos de inmunofluorescencia realizados en rebanadas coronales de cerebelo de ratón transgénico GFAP-eGFP (p5 y p10) revelaron la expresión de GABA $\rho$ 1 y GABA $\rho$ 2 en células GFAP<sup>+</sup> localizadas en la zona subventricular del techo del cuarto ventrículo (Figura 12A y 12B, fila 3 y 4) y en la CG (Figura 12A y 12B, fila 3 y 5, cabezas de flecha). La distribución de GABA $\rho$  en las EGCs es un poco diferente entre estas dos etapas; mientras GABA $\rho$ 1 es menos abundante en p10 con respecto a p5, GABA $\rho$ 2 aumenta conforme al desarrollo (Figura 13A y 13B). En las células GFAP<sup>+</sup> de la CG, la expresión de GABA $\rho$ 1 y GABA $\rho$ 2 presentan una tendencia a aumentar de p5 a p10, pero este aumento no es significativo (Figura 13C). En el adulto, la co-localización de GABA $\rho$ 1 y GABA $\rho$ 2 en células GFAP<sup>+</sup> es insignificante y limitada a las terminaciones de la glía de Bergmann (Figura 12A y 12B) y a una porción limitada de EGCs.

La expresión de GABA $\alpha$ 1 es crucial para el desarrollo del cerebelo (Takayama, 2005), por ello evaluamos la presencia de esta subunidad en células gliales en ratones p5 y p10. Nuestros datos sugieren que algunos de los procesos de la glía de Bergmann que se encuentran en contacto directo con las células de Purkinje contienen la subunidad GABA $\alpha$ 1 en p5 (Figura 12C, fila 1), la expresión de dicha subunidad aumenta significativamente en p10, sin embargo, la co-localización con células GFAP<sup>+</sup> es prácticamente nula (Figura 12C, fila 2).

**B**



**Figura 12. Expresión de subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> en células GFAP<sup>+</sup> del cerebelo de ratón. A y B.** Inmunomarcaje de GABA<sub>ρ</sub>1 y GABA<sub>ρ</sub>2 (primera columna) en ratones transgénicos GFAP-eGFP (segunda columna) p5, p10 y p30. El empalme de las señales muestra que las células GFAP<sup>+</sup> (en verde) de la zona subventricular (cabezas de flecha) y de la CG (flechas) expresan GABA<sub>ρ</sub>1 y GABA<sub>ρ</sub>2 (en rojo), en ratones p5 y p10; en p30 se observa co-localización en algunas terminaciones de los procesos de la glía de Bergmann (cabezas de flecha, cuarta columna). Las últimas dos columnas muestran ampliaciones de las EGC's y de las células GFAP<sup>+</sup> de la CG que expresan GABA<sub>ρ</sub>. **C.** Expresión de GABA<sub>α</sub>1 (en rojo) en la glía de Bergmann (en verde) de ratones p5, no así en p10. Barras = 50 μm y 20 μm en las ampliaciones. **CG:** Capa Granular; **CP:** Capa de células de Purkinje; **CM:** Capa Molecular; **EGCs:** Células gliales ependimales. **N = 3.**

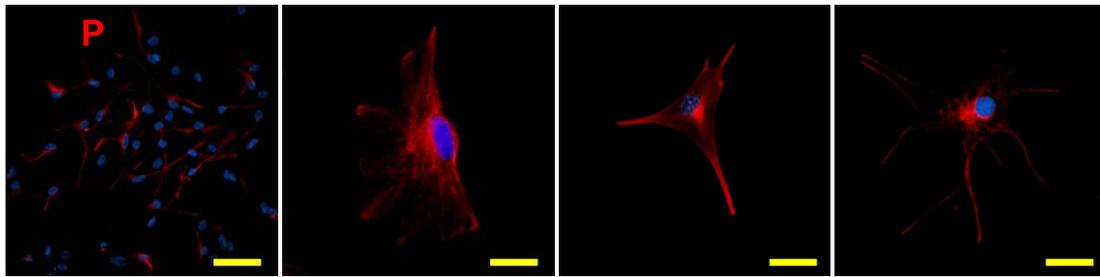


**Figura 13. Análisis de Co-localización de GABA $\rho$ 1 y GABA $\rho$ 2 en células GFAP $^{+}$  en cultivo. A y B.** Co-localización de GABA $\rho$ 1 y GABA $\rho$ 2 con células GFAP $^{+}$  (en blanco) en las EGCs y en la CG del cerebelo en ratones p5 y p10; en p30 la co-localización se restringe a las terminales de los procesos de la glía de Bergmann. **C.** Porcentaje de células GFAP $^{+}$  de la CG que expresan GABA $\rho$ 1 y GABA $\rho$ 2 en ratones p5 y p10. No se encontraron diferencias significativas. **N=3.**

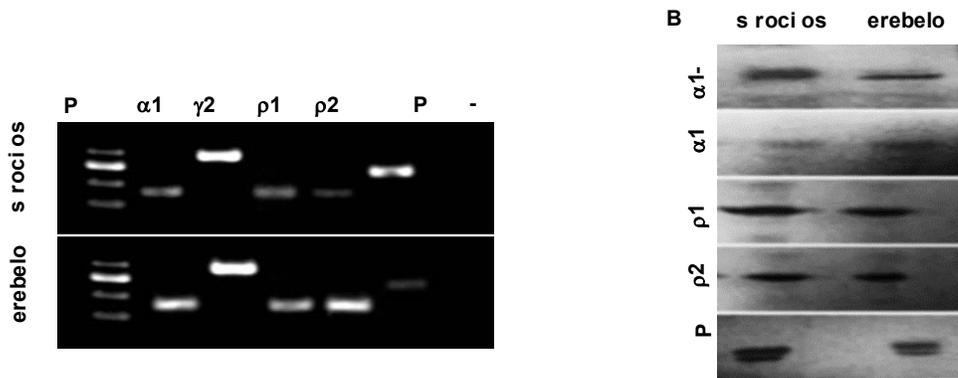
### ***Expresión de subunidades del receptor GABA $_A$ en astrocitos en cultivo.***

Con el fin de estudiar la distribución y propiedades de tráfico de GABA $\rho$  en células gliales, empleamos como modelo de estudio cultivos primarios de astrocitos de cerebelo de ratón. Las células fueron obtenidas de ratones p5 y se mantuvieron *in vitro* por 5 días. Después de este tiempo, mostramos que el  $91 \pm 7.5\%$  de las células en cultivo son GFAP $^{+}$  (Figura 14A), y fueron clasificadas en tres grupos de acuerdo a su fenotipo: 1) aplanadas ( $50 \pm 4.9\%$ ); 2) aplanadas con forma poligonal ( $45 \pm 3.7\%$ ) y 3) células estrelladas ( $5 \pm 1.4\%$ ) ampliamente ramificadas (Figura 14A).

Se determinó la expresión de subunidades del receptor GABA $_A$  en astrocitos en cultivo. A través de RT-PCR determinamos que los astrocitos en cultivo expresan los mRNA que codifica para GABA $\alpha$ 1, GABA $\gamma$ 2, GABA $\rho$ 1, GABA $\rho$ 2 y GFAP (Figura 14B). Mediante Western blot demostramos la expresión de las subunidades GABA $\alpha$ 1-6, GABA $\alpha$ 1, GABA $\rho$ 1 y GABA $\rho$ 2, así como de GFAP (Figura 14C); en ambos experimentos se utilizó como control muestras de cerebelo adulto.

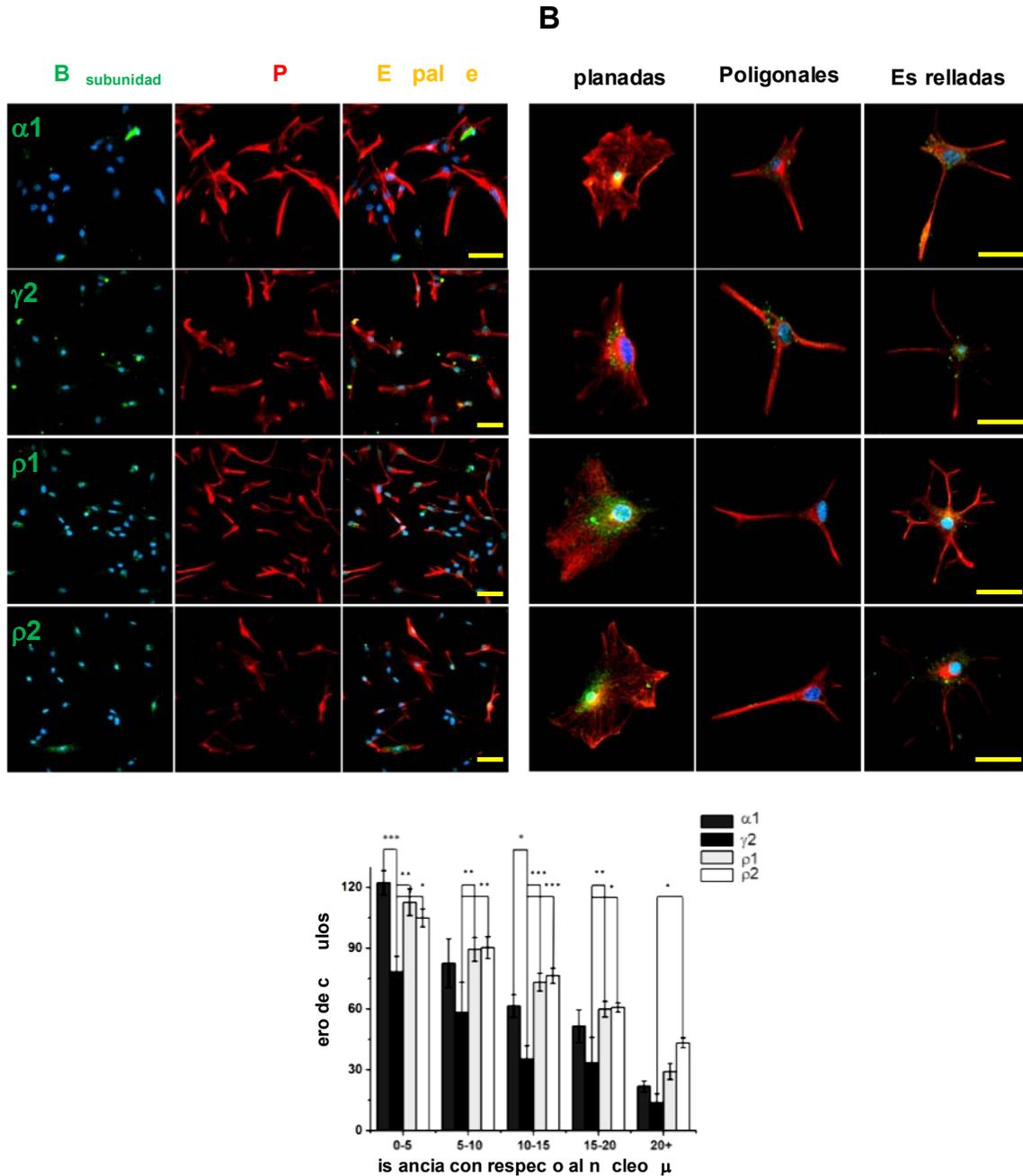


**B**



**Figura 14. Expresión de receptores GABA<sub>A</sub> en astrocitos de cerebelo en cultivo. A.** Morfología de células GFAP<sup>+</sup> en cultivo. De izquierda a derecha: Vista panorámica de células inmunoreactivas a GFAP, seguida de paneles que muestran ejemplos de células aplanadas, poligonales y estrelladas. Barras 50 y 20  $\mu$ m. **B.** Expresión de mRNA de GABA $\alpha$ 1, GABA $\gamma$ 2, GABA $\rho$ 1, GABA $\rho$ 2 y GFAP en astrocitos en cultivo y en cerebelo adulto. **C.** Western blot muestra la expresión de GABA $\alpha$ 1-6, GABA $\alpha$ 1, GABA $\rho$ 1, GABA $\rho$ 2 y GFAP. **N=3.**

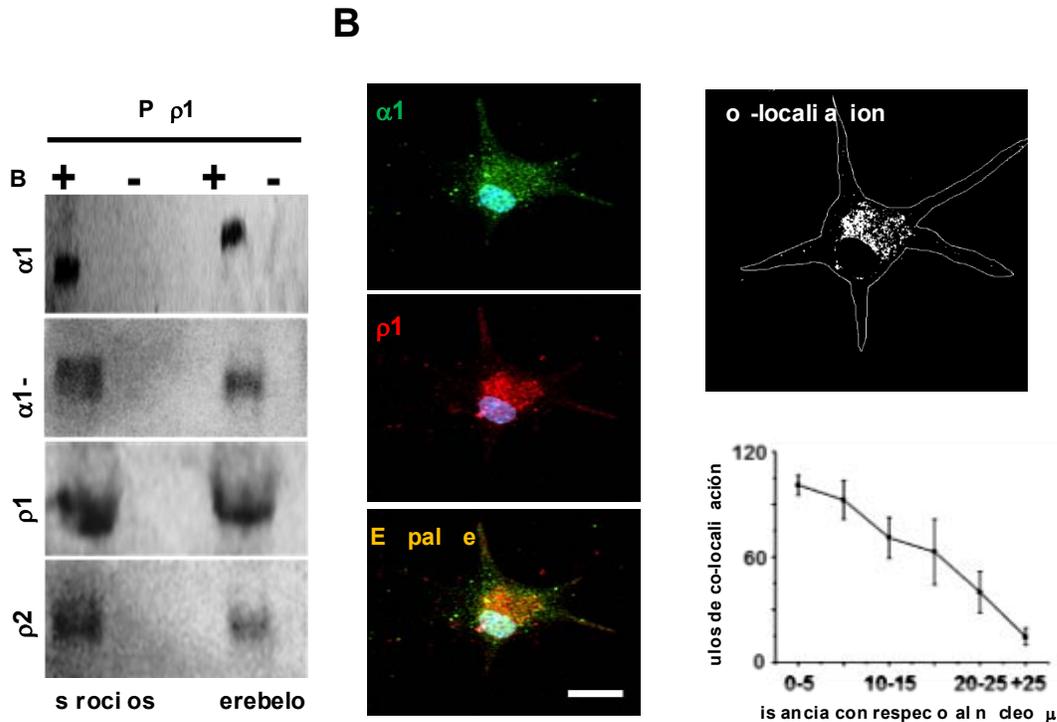
El marcaje de las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> reveló que GABA $\alpha$ 1, GABA $\gamma$ 2, GABA $\rho$ 1 y GABA $\rho$ 2 se encuentran presentes en un  $78 \pm 2.5\%$ ,  $93 \pm 1.2\%$ ,  $60.0 \pm 6.8\%$  and  $70.0 \pm 4.9\%$  de células GFAP<sup>+</sup>, respectivamente (Figura 15A), con una mayor acumulación en la región perinuclear, además de una distribución puntual a lo largo de los procesos (Figura 15B). La acumulación y distribución de las subunidades GABA $\alpha$ 1, GABA $\rho$ 1 y GABA $\rho$ 2 son muy parecidas dentro de los tres diferentes fenotipos, mientras que la subunidad GABA $\gamma$ 2 se distribuye con mayor probabilidad que otras subunidades en la membrana plasmática (Figura 15C).



**Figura 15. Distribución de las subunidades GABA $\alpha$ 1, GABA $\gamma$ 2, GABA $\rho$ 1 y GABA $\rho$ 2 en astrocitos de cerebelo en cultivo. A.** Inmunodetección de GABA $\alpha$ 1 ( $78 \pm 2.5\%$ ), GABA $\gamma$ 2 ( $93 \pm 1.2\%$ ), GABA $\rho$ 1 ( $60 \pm 6.8\%$ ), and GABA $\rho$ 2 ( $70 \pm 4.9\%$ ) (en verde) en células GFAP $^{+}$  (en rojo) en cultivo. Núcleos teñidos con DAPI (en azul). Barras =  $50 \mu\text{m}$ . N = 500 células. **B.** Localización de los cúmulos de fluorescencia de GABA $\alpha$ 1, GABA $\gamma$ 2, GABA $\rho$ 1 y GABA $\rho$ 2 en las diferentes morfologías de las células GFAP $^{+}$  en cultivo. Barras =  $20 \mu\text{m}$ . **C.** Distribución de cúmulos de fluorescencia de las subunidades; GABA $\gamma$ 2 se distribuye de manera significativamente diferente con respecto a las otras subunidades. (\*\*\*)  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$  and \*  $p < 0.05$ ); (N = 18).

## **Interacciones proteína-proteína entre las subunidades GABA $\rho$ 1 y GABA $\alpha$ .**

Debido a que la distribución de las subunidades GABA $\alpha$ 1 y GABA $\rho$  es muy parecida en los astrocitos en cultivo, se evaluó mediante ensayos de co-inmunoprecipitación la posibilidad de que ambas proteínas interaccionaran. Utilizando anticuerpos selectivos para GABA $\rho$ 1, mostramos la interacción de GABA $\rho$ 1 con GABA $\alpha$ 1, GABA $\alpha$ 1-6 y GABA $\rho$ 2, en extractos de proteínas de membrana de astrocitos en cultivo. Como control positivo usamos extractos de proteínas de membrana de cerebelo y la inmunodetección de GABA $\rho$ 1 (Figura 16A). Adicionalmente, demostramos la co-localización de GABA $\alpha$ 1 (en verde) y GABA $\rho$ 1 (en rojo) (Figura 16B) en astrocitos en cultivo; la mayor co-localización se encuentra en la región perinuclear y en mucha menor proporción en los procesos de las células (Figura 16C). Estos datos apoyan la idea de que los astrocitos de cerebelo en cultivo expresan receptores funcionales GABA $A$ , y algunos de ellos están conformados por las subunidades GABA $\rho$ , las cuales interaccionan con las subunidades clásicas del receptor GABA $A$  como son GABA $\alpha$ 1 y GABA $\alpha$ 1-6.



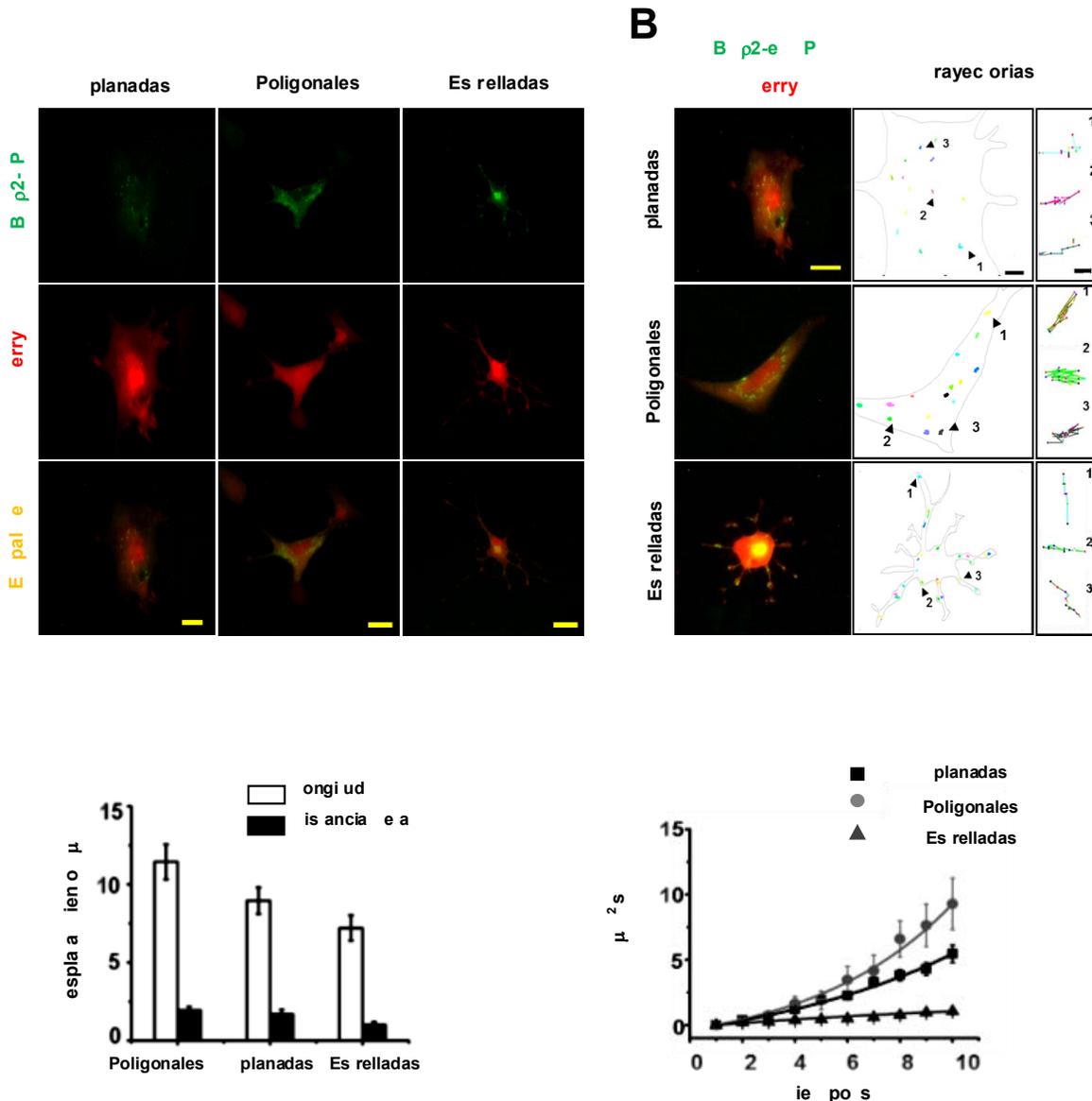
**Figura 16. Interacción proteína-proteína entre las subunidades GABA $\rho$ 1 y GABA $\alpha$ .** **A.** Co-inmunoprecipitación usando anticuerpos dirigidos a GABA $\rho$ 1 muestran interacciones entre las subunidades GABA $\alpha$ <sub>1-6</sub>-GABA $\rho$ 1; GABA $\alpha$ <sub>1</sub>-GABA $\rho$ 1, y GABA $\rho$ 1-GABA $\rho$ 2 en extractos de membrana de astrocitos en cultivo y cerebelo adulto. Como control negativo se incubaron proteínas de membrana sin el anticuerpo para GABA $\rho$ 1. **B.** Inmunolocalización de GABA $\alpha$ 1 (verde) y GABA $\rho$ 1 (rojo); el empalme indica la co-localización de ambas subunidades (amarillo). **C.** Cúmulos fluorescentes de co-localización entre GABA $\alpha$ 1 y GABA $\rho$ 1 se distribuyen principalmente en el soma, alrededor del núcleo y en menor proporción en los procesos distales de las células en cultivo (450 cúmulos de 5 células). **D.** Cuantificación de los cúmulos de co-localización.

### Distribución y tráfico de GABA $\rho$ 2-GFP.

Dado que hemos mostrado que GABA $\rho$ 1 y GABA $\rho$ 2 se distribuyen de manera similar en los diferentes fenotipos de las células GFAP<sup>+</sup> en cultivo, y que ambas proteínas interactúan, decidimos emplear la quimera GABA $\rho$ 2-GFP con el fin de estudiar la distribución y propiedades del tráfico de las subunidades GABA $\rho$ ; como contraste se empleó la proteína mCherry soluble para identificar la morfología de las células en cultivo (Figura 17A). La localización del receptor

quimérico fue principalmente en el soma ( $42 \pm 4.9$  cúmulos) y en menor proporción en los procesos o zonas más distales al núcleo ( $8 \pm 2$  cúmulos). Analizando las trayectorias de los cúmulos (Figura 17B), encontramos que la mayoría de ellos presentan desplazamientos acumulados de  $9.4 \pm 0.9 \mu\text{m}$  durante 30 min de registro, sin embargo, permanecen prácticamente estacionarios, ya que el análisis de sus desplazamientos netos muestra que, durante este tiempo, los cúmulos se desplazan  $1.5 \pm 0.23 \mu\text{m}$  (Figura 17C, no encontramos diferencias significativas entre los fenotipos).

Con el fin de estimar el coeficiente de difusión de las partículas de GABA $\rho$ 2-GFP, se calcularon los valores de las distancias cuadráticas medias (DCM) a través del tiempo y se graficaron los primeros 10 puntos, para determinar el tipo de difusión que sufren estas partículas (Michalet, 2010). En las células poligonales y planas, los cúmulos de fluorescencia presentan movimientos de difusión lentos ( $0.15 \pm 0.03 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ) con direccionamiento, ilustrado con un ajuste exponencial de las DCM (Figura 17D). Por otra parte, las curvas de las DCM en las células estrelladas exhiben una fuerte correlación lineal y un coeficiente de difusión mucho más lento ( $0.023 \pm 0.008 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ), lo que sugiere que en este fenotipo las partículas GABA $\rho$ 2-GFP se mueven de manera no-direccionada y completamente aleatoria (Figura 17D). No se encontraron diferencias significativas entre las dinámicas de los cúmulos localizados alrededor del núcleo con los cúmulos presentes en los procesos de las células en cultivo. El hecho de que los cúmulos se desplacen distancias tan cortas, puede explicarse si la síntesis de proteínas se lleva a cabo en los procesos y no cerca del núcleo.

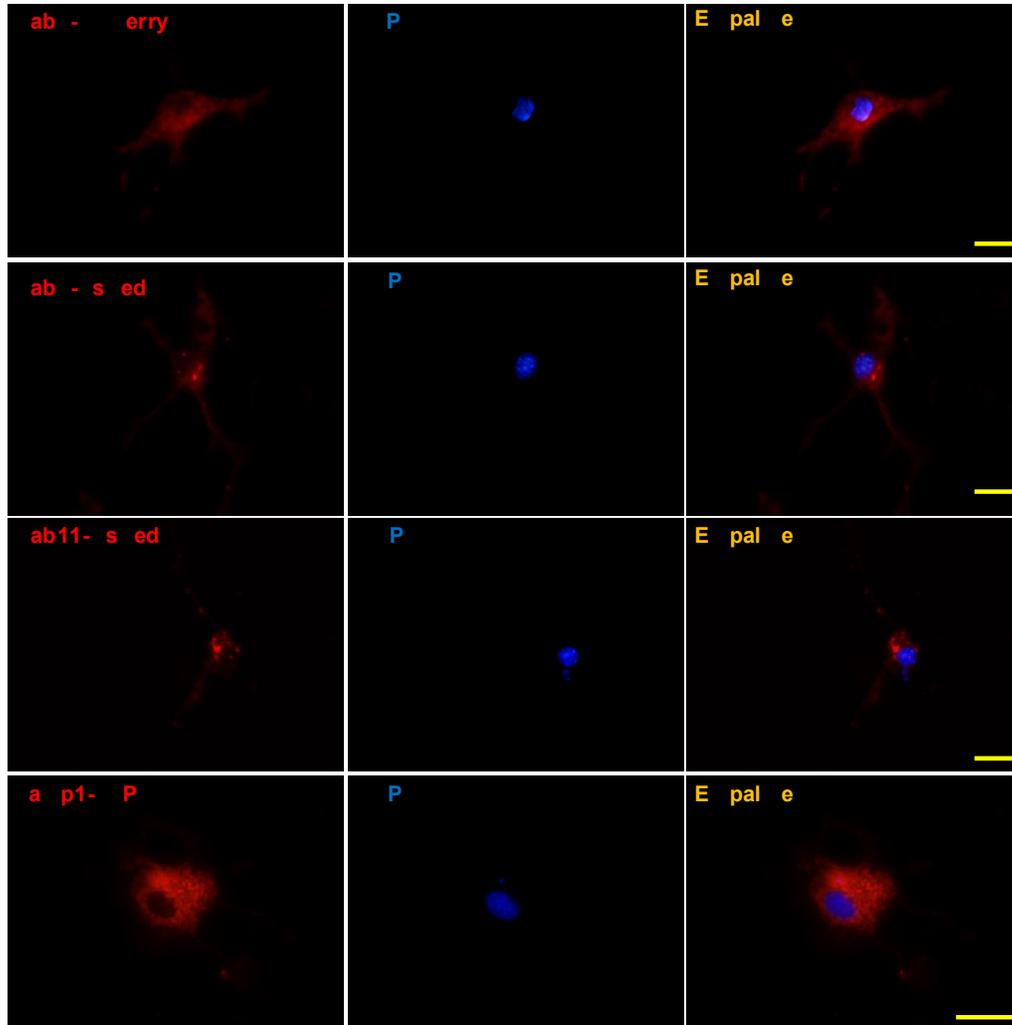


**Figura 17. Distribución y tráfico de GABA $\rho$ 2-GFP.** **A.** Fluorescencia emitida por GABA $\rho$ 2-GFP (verde) y la proteína soluble mCherry (rojo) en células en cultivo con morfología aplanada, poligonal y estrellada. Barras = 25  $\mu$ m. **B.** Columnas de izquierda a derecha: Empalme de la fluorescencia emitida por GABA $\rho$ 2-GFP y mCherry. GABA $\rho$ 2-GFP se distribuye en cúmulos localizados en el soma y a lo largo de los procesos; cabezas de flecha y números indican ejemplos de cúmulos aislados a los cuales se siguió su trayectoria, la trayectoria se ilustra en el último panel. Barras = 25, 5 y 1  $\mu$ m, respectivamente. **C.** Longitud de desplazamiento y distancia neta recorrida de los cúmulos GABA $\rho$ 2-GFP en las diferentes morfologías, no significativamente diferentes. **D.** Curvas de distancia cuadrática media (DCM) de GABA $\rho$ 2-GFP; la correlación exponencial indica movimientos direccionados en soma y procesos de células aplanadas y poligonales, mientras que la correlación lineal indica movimiento de difusión simple en las células estrelladas (510 cúmulos de 40 células).

## **Distribución de organelos implicados en la vía secretora en astrocitos en cultivo.**

Evaluamos la distribución de endosomas (tempranos, tardíos y de reciclaje) y lisosomas, con el fin de determinar si los patrones de distribución son similares a los que presenta la quimera GABA $\rho$ 2-GFP de los experimentos previos. Para ello, expresamos de manera heteróloga las proteínas Rab5-mCherry (endosomas tempranos), Rab7-DsRed (endosomas tardíos), Rab11-DsRed (endosomas de reciclaje) y Lamp1-RFP (lisosomas) y mediante microscopía de epifluorescencia analizamos su localización.

La proteína Rab5-mCherry se establece en cúmulos, los cuales, se distribuyen de manera abundante en soma y procesos; de igual forma Rab7-DsRed y Rab11-DsRed se localizan en la zona perinuclear y en procesos, sin embargo, los cúmulos con mayor densidad de fluorescencia se encuentran principalmente alrededor del núcleo y en el caso de Rab11-DsRed también se encuentran a lo largo de los procesos. Sugiriendo así, que en los astrocitos estrellados la vía endocítica se encuentra establecida de manera similar a lo reportado en la literatura (Potokar et al., 2012). La distribución de Lamp1-RFP es homogénea en la célula, se organiza en cúmulos densos que rodean al núcleo y revisten los procesos (Figura 18). A pesar que todas se distribuyen en el soma y en los procesos, los cúmulos de fluorescencia de mayor densidad aparentemente no se distribuyen de manera similar a los cúmulos GABA $\rho$ 2-GFP, por lo que no descartamos la posibilidad de co-localización.

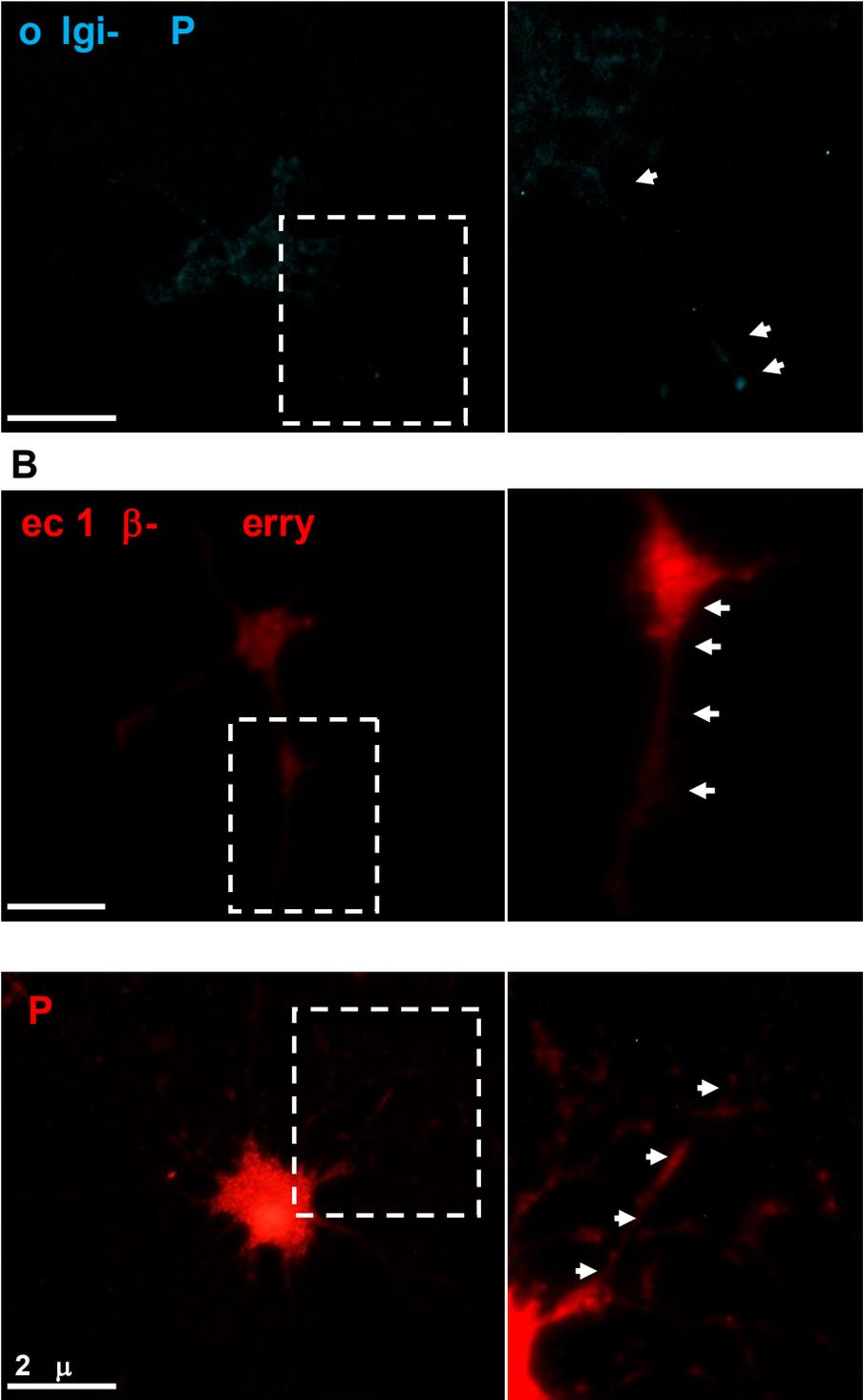


**Figura 18. Distribución de organelos intracelulares de la vía secretora en astrocitos en cultivo.** Distribución de Rab5-mCherry, Rab7-DsRed, Rab11-DsRed y Lamp1-RFP (en rojo) en soma y procesos de las células en cultivo. Núcleos teñidos con DAPI (en azul). Barras = 20  $\mu$ m. **N=3** transfecciones.

### **Localización de retículo endoplásmico y aparato de Golgi en los procesos de los astrocitos en cultivo.**

Los astrocitos en cultivo fueron transfectados con los plásmidos Sec61 $\beta$ -mCherry (Sec61 es el componente central del aparato de translocación de proteínas del retículo endoplásmico (RE)) y eNOS-CFP (Golgi-CFP); encontramos la expresión de las proteínas Golgi-CFP y Sec61 $\beta$ -mCherry alrededor del núcleo y también en los procesos distales de los astrocitos estrellados (Figura 19A y 19B),

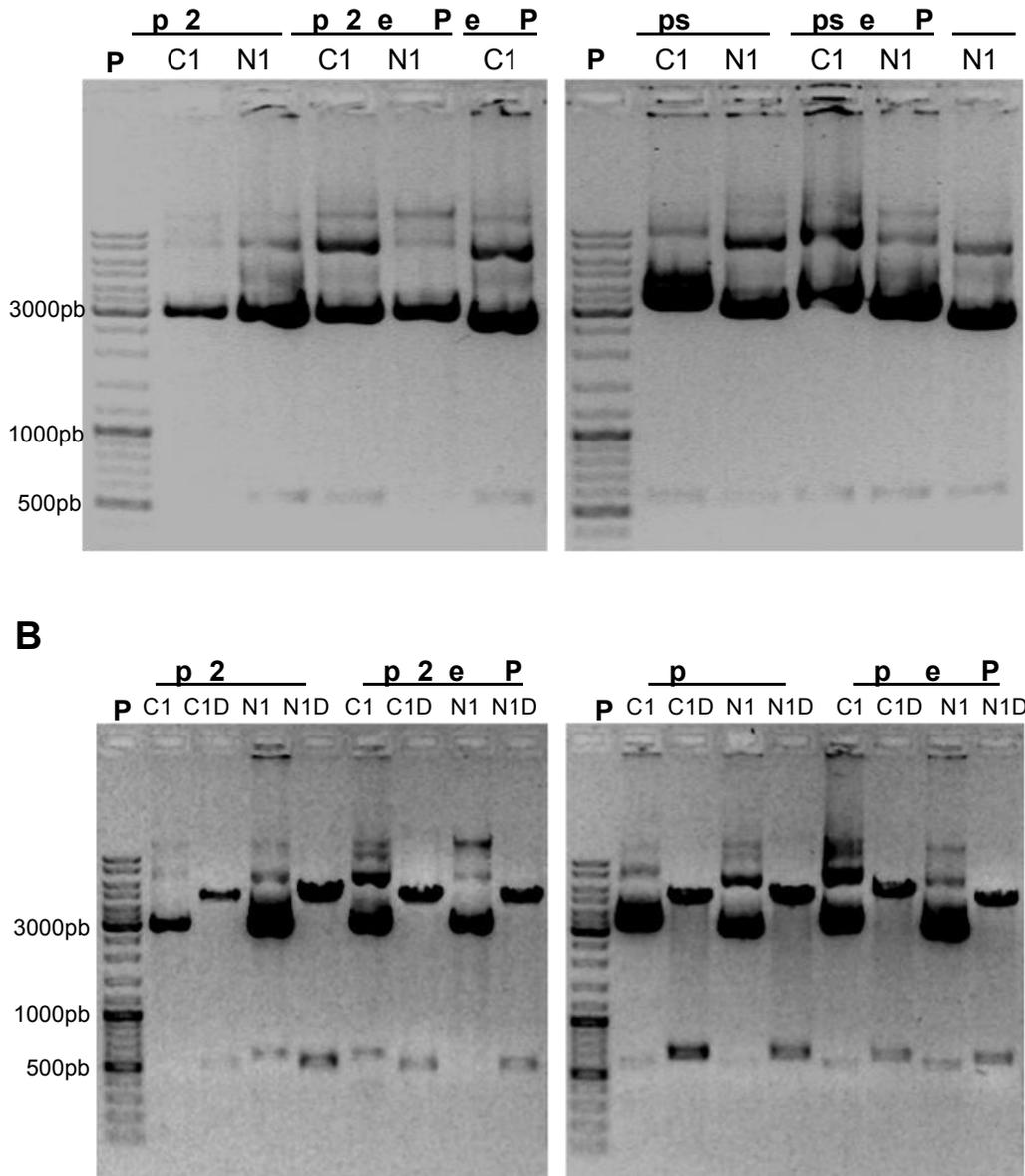
adicionalmente marcamos ácidos nucleicos con IP y observamos la presencia de estos tanto en el núcleo como en los procesos de los astrocitos en cultivo (Figura 19C). Estos datos sugieren que la síntesis de proteínas pudiese ocurrir en los procesos.



**Figura 19. Localización de aparato de Golgi, RE y ácidos nucleicos en células en cultivo.** **A.** Fluorescencia emitida por Golgi-CFP alrededor del núcleo y en procesos de células estrelladas en cultivo. **B.** Localización de Sec61 $\beta$ -mCherry en soma y procesos, **C.** Distribución de la fluorescencia emitida por IP unido a ácidos nucleicos en célula estrellada de cultivo primario. Las ampliaciones de la derecha, muestran procesos de las células (recuadros con línea punteada), flechas señalan la distribución de Golgi, ER y ácidos nucleicos en los procesos de las células. Barras = 20  $\mu$ m. **N=3.**

### **Clonación de RpL29 y RpS5 en vectores de expresión.**

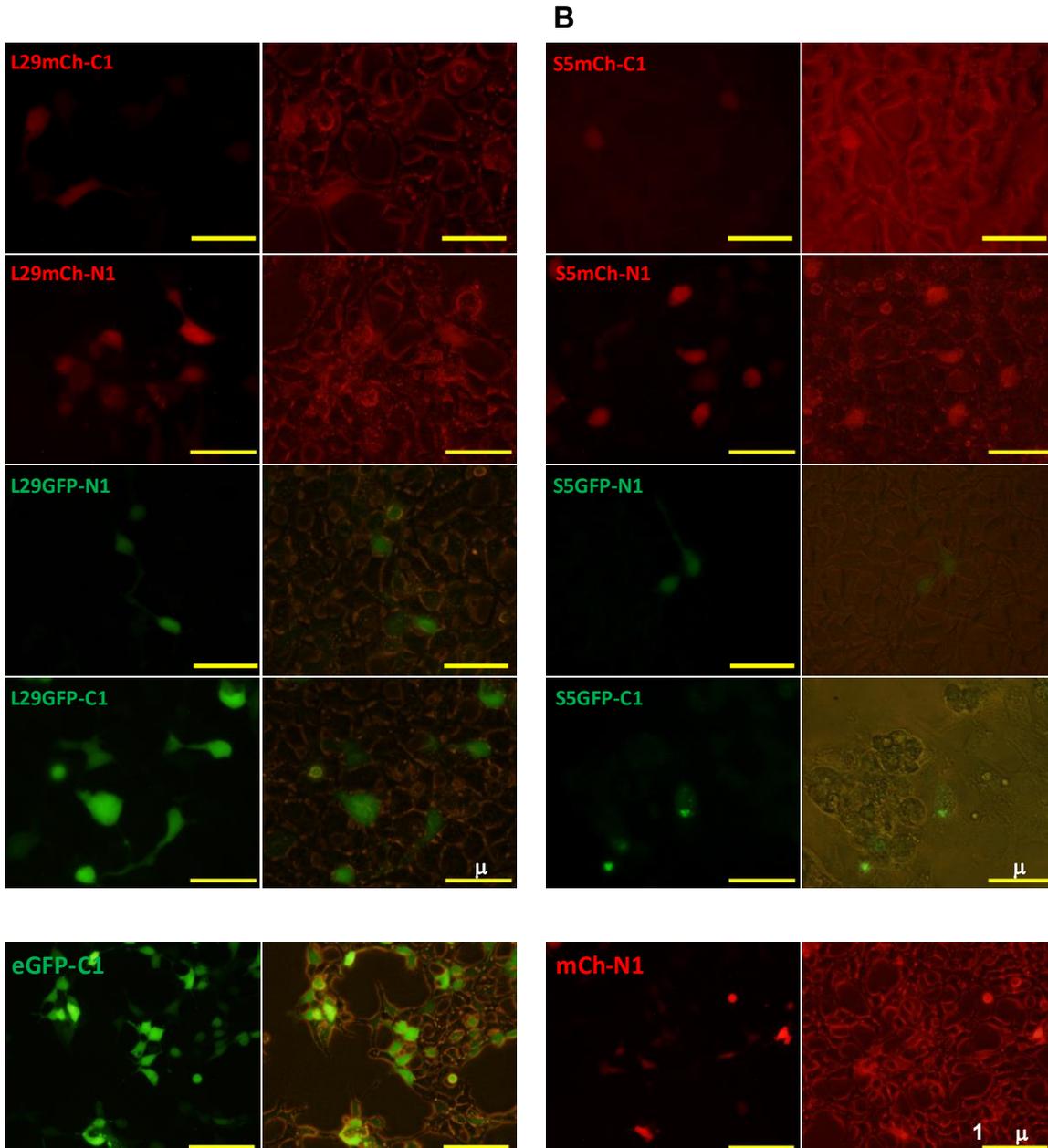
Para evaluar la presencia de complejos ribosomales en los procesos de células GFAP<sup>+</sup>, se clonaron los cDNAs codificantes de las proteínas ribosomales RpL29 y RpS5 a partir de RNA de cerebro de ratón en los vectores de expresión eGFP-C1/N1 y mCherry-C1/N1. La figura 20A y 20B muestran geles de agarosa con los plásmidos construidos y su caracterización con las enzimas de restricción señaladas.



**Figura 20. Plásmidos diseñados para la expresión de proteínas ribosomales RpL29 y RpS5 fusionadas a las proteínas fluorescentes mCherry y eGFP. A.** Gel de agarosa muestra los plásmidos que contiene las secuencias nucleotídicas de las proteínas ribosomales RpL29 y RpS5 fusionadas en el amino (N1) y carboxilo (C1) terminal de las proteínas fluorescentes mCherry y eGFP. **B.** Caracterización enzimática de los plásmidos de expresión en A, empleando las enzimas de restricción BgLI y BamHI. Tamaños de los insertos para RpL29: 494 y 497 pb y para RpS5: 624 y 627 pb. Gel de agarosa al 0.7%. **MP:** Marcador de peso molecular. **N1:** vector de expresión que contiene las secuencias de las proteínas ribosomales fusionadas al amino terminal de las proteínas fluorescentes; **C1:** vector de expresión que contiene las secuencias de las proteínas ribosomales fusionadas al carboxilo terminal de las proteínas fluorescentes; **C1D y N1D:** plásmidos digeridos con las enzimas de restricción.

Una vez que se generaron estos plásmidos, se evaluó la expresión de las subunidades ribosomales fusionadas a proteínas fluorescentes en células de riñón embrionarias humanas (HEK 293), y como controles se usaron los plásmidos eGFP-C1 y mCherry-N1 (Figura 21C). La expresión de las proteínas se observó a las 48 hr, encontramos que la eficiencia de transfección de las proteínas ribosomales es muy baja ( $10 \pm 3 \%$ ), con respecto a los controles ( $51 \pm 9 \%$ ), además se distribuyen en menor densidad en todo el cuerpo celular (Figura 21A y 21B).

En concreto, se expresaron las proteínas RpL29 y RpS5 fusionadas tanto en el amino- como en el carboxilo- terminal de las proteínas fluorescentes, sin embargo, existen algunas diferencias entre la expresión de dichas proteínas; el número de células HEK 293 que expresa la RpS5 es menor ( $5 \pm 2 \%$ ) que las que expresan la RpL29 ( $15 \pm 4 \%$ ), además la morfología de las células en el plato presenta cambios notorios; se redondean y/o despegan del plato cuando son transfectadas con la RpS5 y no así o en menor proporción cuando se transfectan con la RpL29.

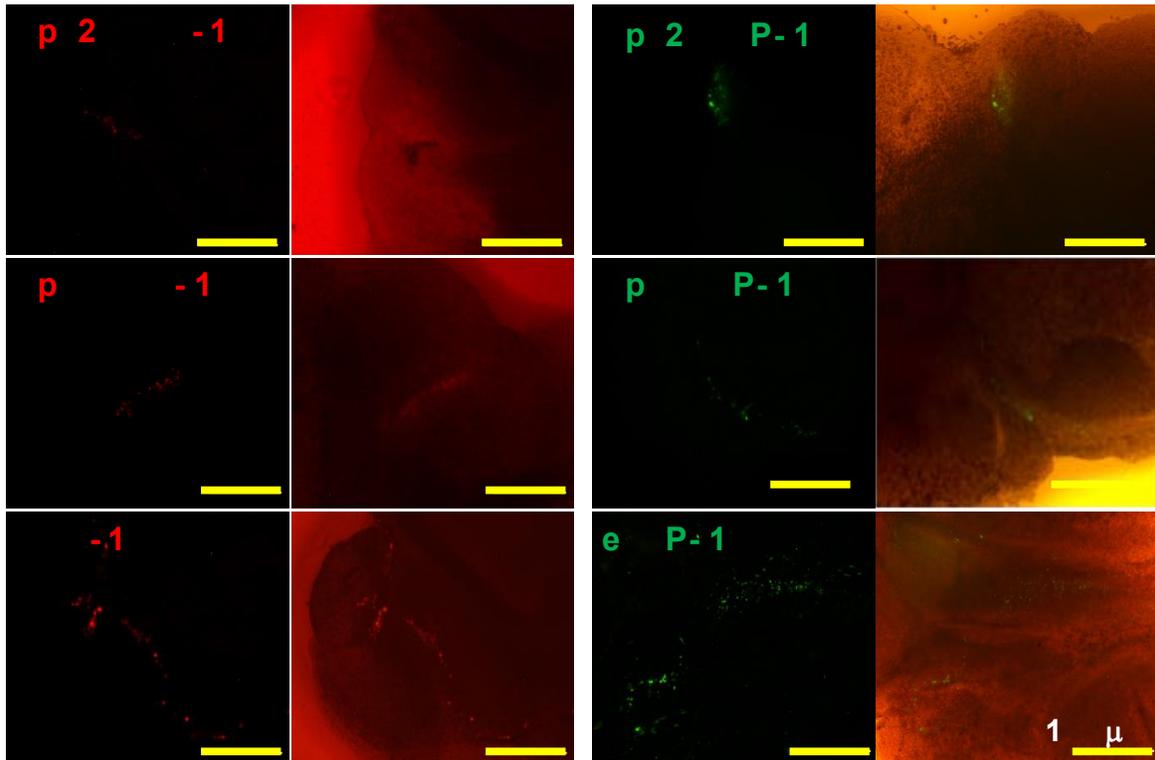


**Figura 21. Expresión heteróloga de las proteínas ribosomales RpL29 y RpS5 fusionadas a eGFP y mCherry en células HEK 293. A.** Expresión de la proteína RpL29 fusionada a la proteína mCherry (en rojo) y eGFP (en verde) en el amino (N1) y carboxilo (C1) terminal, campo oscuro y campo claro. **B.** Fluorescencia emitida por la proteína RpS5 fusionada a la proteína mCherry (en rojo) y eGFP (en verde) en el amino (N1) y carboxilo (C1) terminal, campo oscuro y campo claro. Barras = 50  $\mu\text{m}$ . **C.** Controles positivos de la transfección, distribución de las proteínas solubles eGFP y mCherry. Barras = 100  $\mu\text{m}$ .

## **Expresión de las proteínas ribosomales RpL29 y RpS5 fusionadas a mCherry y eGFP en células GFAP+ del cerebelo de ratón.**

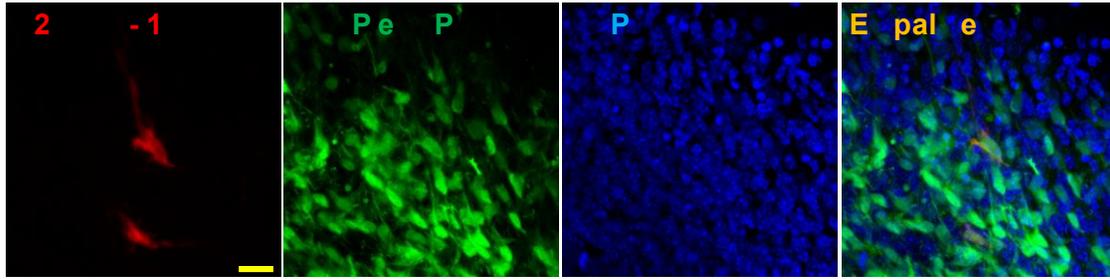
Para evaluar la distribución de las proteínas ribosomales en células del cerebelo de ratón, se realizaron cortes coronales de 350  $\mu\text{m}$  de cerebelos de ratones y se electroporaron los plásmidos RpL29-mCherry-N1, RpS5-mCherry-N1, mCherry (Figura 22A), RpL29eGFP-C1, RpS5eGFP-C1 y eGFP-C1 (Figura 22B), las rebanadas electroporadas se colocaron sobre una membrana porosa y fueron mantenidas en cultivo durante 48 hr, posterior a este tiempo, se observaron las muestra al microscopio de epifluorescencia. En todos los experimentos la proporción de células que expresan la proteína fluorescente fue mayor en las muestras controles eGFP-C1 o mCherry-N1 que en las que expresan las proteínas ribosomales, sin embargo, tanto las proteínas solubles como las ribosomales se expresaron principalmente en células localizadas hacia los bordes de las folias y en regiones interfoliares de sustancia blanca (Figura 22A y 22B).

## B

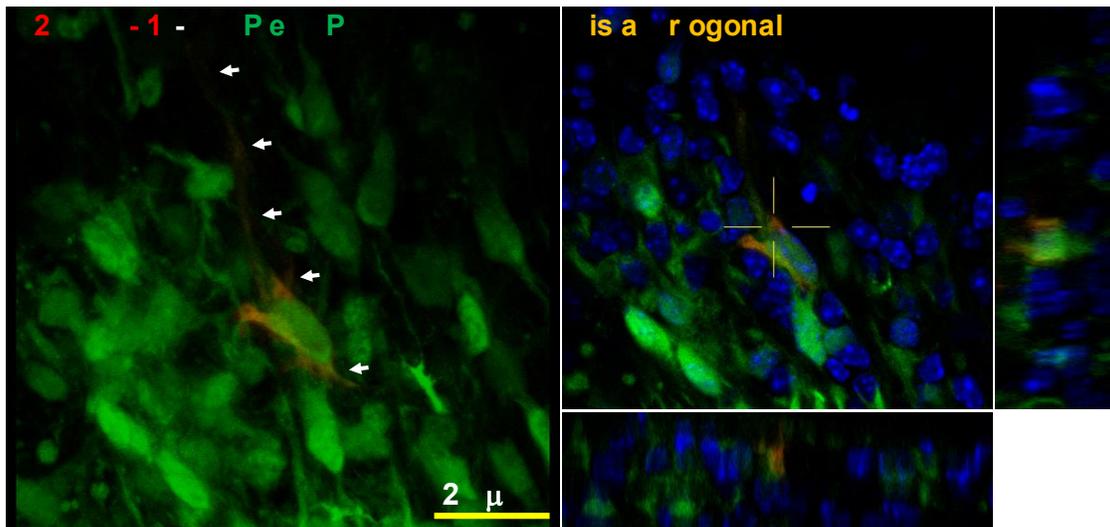


**Figura 22. Expresión de las proteínas Rpl29 y Rps5 en células de cerebelo de ratón en cultivos organotípicos.** A. Distribución de las proteínas Rpl29mCherry-N1, Rps5mCherry-N1 y mCherry-N1 en regiones interfoliares del cerebelo. B. Fluorescencia emitida por las proteínas Rpl29eGFP-C1, Rps5eGFP-C1 y eGFP-C1 en folias y sustancia blanca del cerebelo de ratón.

Para conocer la distribución de las proteínas ribosomales en células GFAP<sup>+</sup> de cerebelo de ratón, se electroporaron los plásmidos Rpl29mCherry-N1 y Rps5mCherry-N1 en rebanadas de cerebelo del ratón transgénico GFAP/eGFP. Mediante microscopía confocal, se determinó la co-localización de Rpl29mCherry-N1 en células GFAP<sup>+</sup> (Figura 23A). Realizando una ampliación digital y eliminando el marcaje de los núcleos, observamos de manera más clara la presencia de la proteína Rpl29mCherry-N1 en el soma y a lo largo de los procesos de células GFAP<sup>+</sup> (Figura 23B), en la vista ortogonal se puede apreciar que la distribución de Rpl29mCherry es diferente que la de la proteína eGFP (Figura 23C).

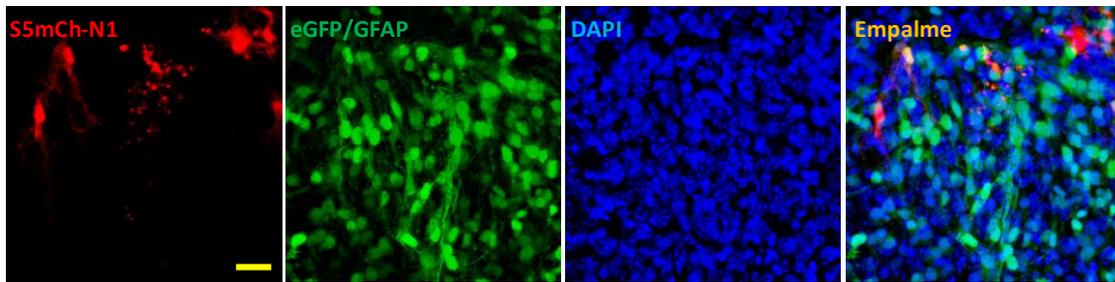


**B**

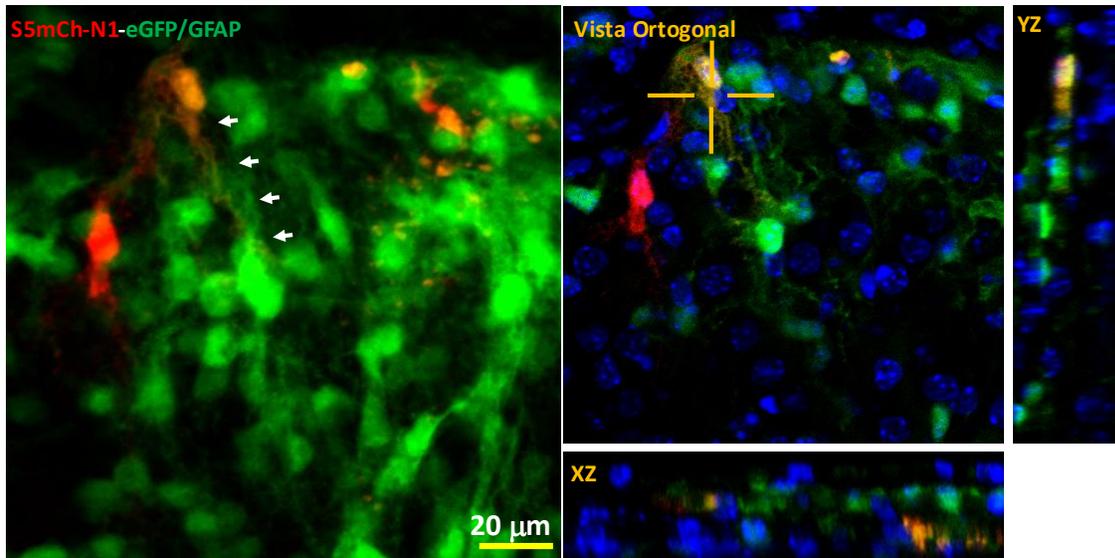


**Figura 23. Expresión de la proteína Rpl29mCherry-N1 en células GFAP<sup>+</sup> de cerebelo de ratón transgénico GFAP/eGFP. A.** Distribución de Rpl29 fusionada al amino terminal de la proteína mCherry (en rojo) en células GFAP<sup>+</sup> (en verde) del cerebelo del ratón transgénico GFAP/eGFP (p6-p8). Núcleos teñidos con DAPI (en azul). **B.** Amplificación de célula GFAP<sup>+</sup> que expresa de manera heteróloga la proteína Rpl29mCherry-N1 en soma y a lo largo de procesos (flechas). **C.** Vista Ortogonal de la célula en B evidencia la distribución de la proteína Rpl29mCherry-N1 dentro de una célula GFAP<sup>+</sup> del cerebelo de ratón. N = 5.

De manera similar a la proteína Rpl29mCherry, la proteína RpS5mCherry se distribuye en el soma y en los procesos de células GFAP<sup>+</sup> (Figura 24B). La vista ortogonal evidencia la distribución intracelular de la proteína RpS5mCherry en astrocitos de cerebelo (Figura 24C).



**B**



**Figura 24. Expresión de la proteína RpS5mCherry-N1 en células GFAP<sup>+</sup> de cerebelo de ratón transgénico GFAP/eGFP. A.** Expresión de RpS5 fusionada al amino terminal de la proteína mCherry (en rojo) en células GFAP<sup>+</sup> (en verde) del cerebelo del ratón transgénico GFAP/eGFP (p6-p8). Núcleos teñidos con DAPI (en azul). **B.** Amplificación de célula GFAP<sup>+</sup> que expresa de manera heteróloga la proteína RpS5mCherry-N1 en soma y a lo largo de procesos (flechas). **C.** Vista Ortogonal de la célula en B muestra la distribución de la proteína RpS5mCherry-N1 dentro de una célula GFAP<sup>+</sup> del cerebelo de ratón. N = 5.

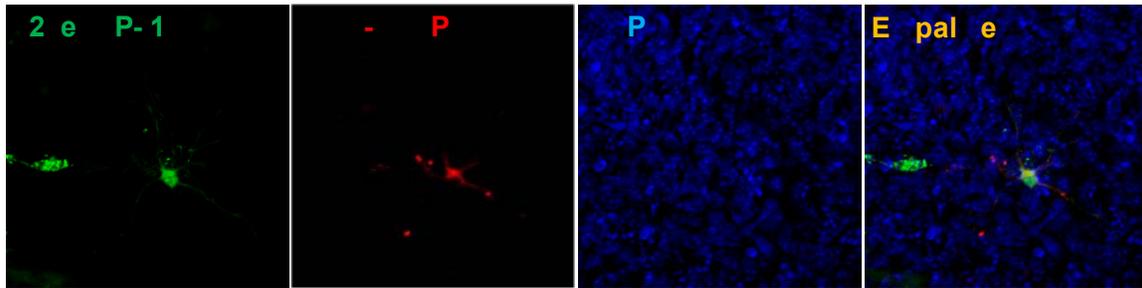
Es importante señalar que se realizaron tres experimentos independientes, cada uno de ellos constó en electroporar dos rebanadas de cerebelo de ratón con cada uno de los plásmidos, por tanto, al final de los experimentos se tuvieron seis rebanadas procesadas y analizadas, de las cuales se encontraron cinco células de cada experimento en las cuales co-localizaban con células GFAP<sup>+</sup>, y una gran cantidad de células con morfologías similares que no expresaban la proteína eGFP. Por ello, se pensó en co-electroporar los plásmidos que expresan las proteínas ribosomales (RpL29eGFP-C1 o RpS5eGFP-C1) y el plásmido GFAP-

mCherry, este último expresa la proteína mCherry bajo el promotor GFAP. La distribución de las proteínas ribosomales fue similar a los experimentos previamente descritos, sin embargo, el número de células GFAP<sup>+</sup> que expresaron las proteínas ribosomales fue significativamente mayor.

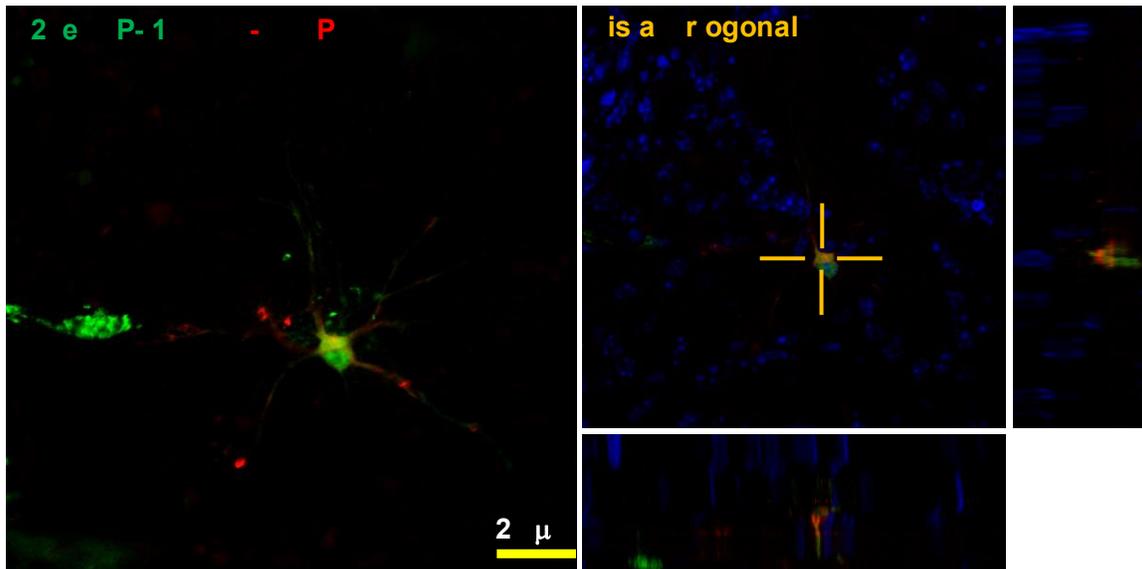
La proteína RpL29eGFP se localizó en el soma y en los procesos de las células GFAP<sup>+</sup> (Figura 25A). En la ampliación (Figura 25B) y en la vista ortogonal (Figura 25C) se puede observar con mayor claridad la distribución a lo largo de los procesos de las células GFAP<sup>+</sup> y la diferencia en la distribución de la proteína RpL29eGFP y de mCherry.

De manera similar, se analizaron células GFAP<sup>+</sup> que expresaron la proteína RpS5eGFP (Figura 26A), y se demostró su presencia en los procesos distales y en el soma de dichas células. La vista ortogonal evidencia la distribución intracelular de la proteína RpS5eGFP en las células GFAP<sup>+</sup> (Figura 26C).

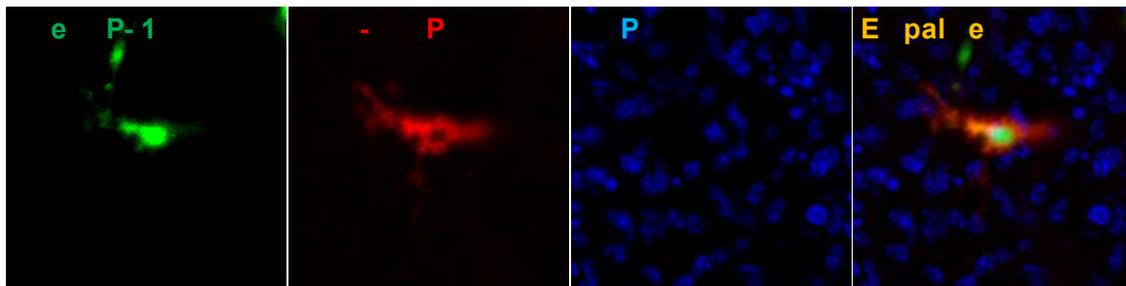
Las proteínas RpL29 y RpS5 se distribuyen en el soma y a lo largo de los procesos de las células GFAP<sup>+</sup> del cerebelo de ratón, lo que sugiere que la síntesis de proteínas pudiera estar ocurriendo en esta zona.



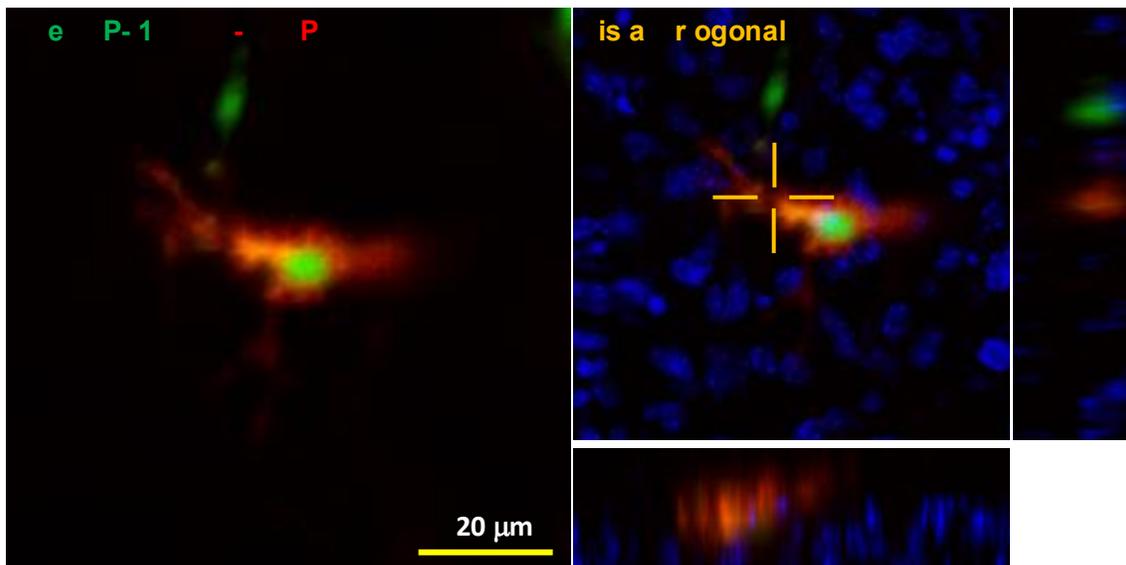
**B**



**Figura 25. Co-expresión de la proteína RpL29eGFP-C1 y mCherry en células GFAP<sup>+</sup> de cerebelo de ratón. A.** Expresión de la proteína RpL29 fusionada al carboxilo terminal de la proteína fluorescente eGFP (en verde), y la proteína mCherry soluble bajo el promotor de GFAP (en rojo); núcleos teñidos con DAPI. **B.** Distribución de la proteína RpL29eGFP-C1 en soma y procesos de célula GFAP<sup>+</sup>. **C.** Vista ortogonal, muestra distribución intracelular de la proteína RpL29eGFP-C1, N=7.



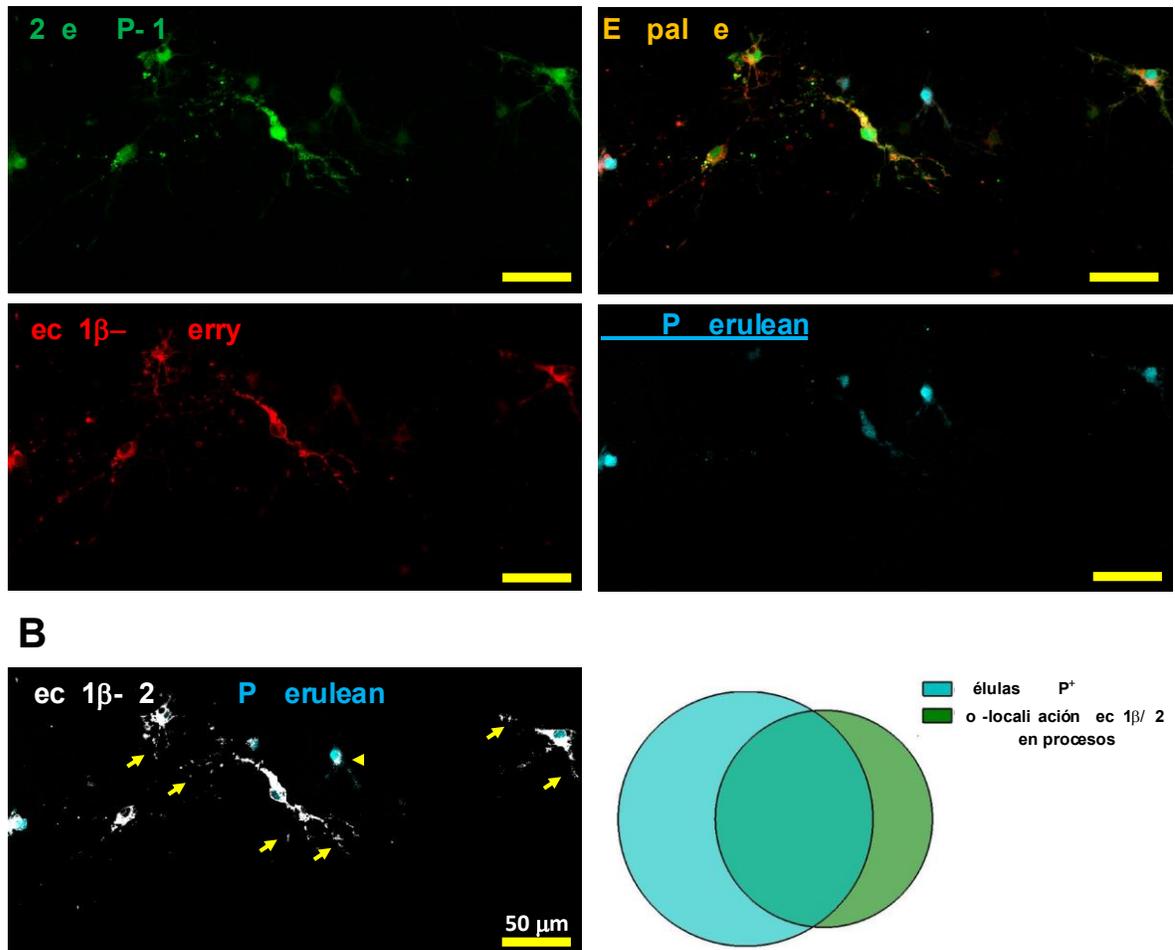
**B**



**Figura 26. Co-expresión de la proteína RpS5eGFP-C1 y mCherry en células GFAP<sup>+</sup> de cerebelo de ratón. A.** Expresión de la proteína RpS5 fusionada al carboxilo terminal de la proteína fluorescente eGFP (en verde), y la proteína mCherry soluble bajo el promotor de GFAP (en rojo); núcleos teñidos con DAPI. **B.** Distribución de la proteína RpS5eGFP-C1 en soma y procesos de células GFAP<sup>+</sup>. **C.** Vista ortogonal, muestra distribución intracelular de la proteína RpS5eGFP-C1, N=7.

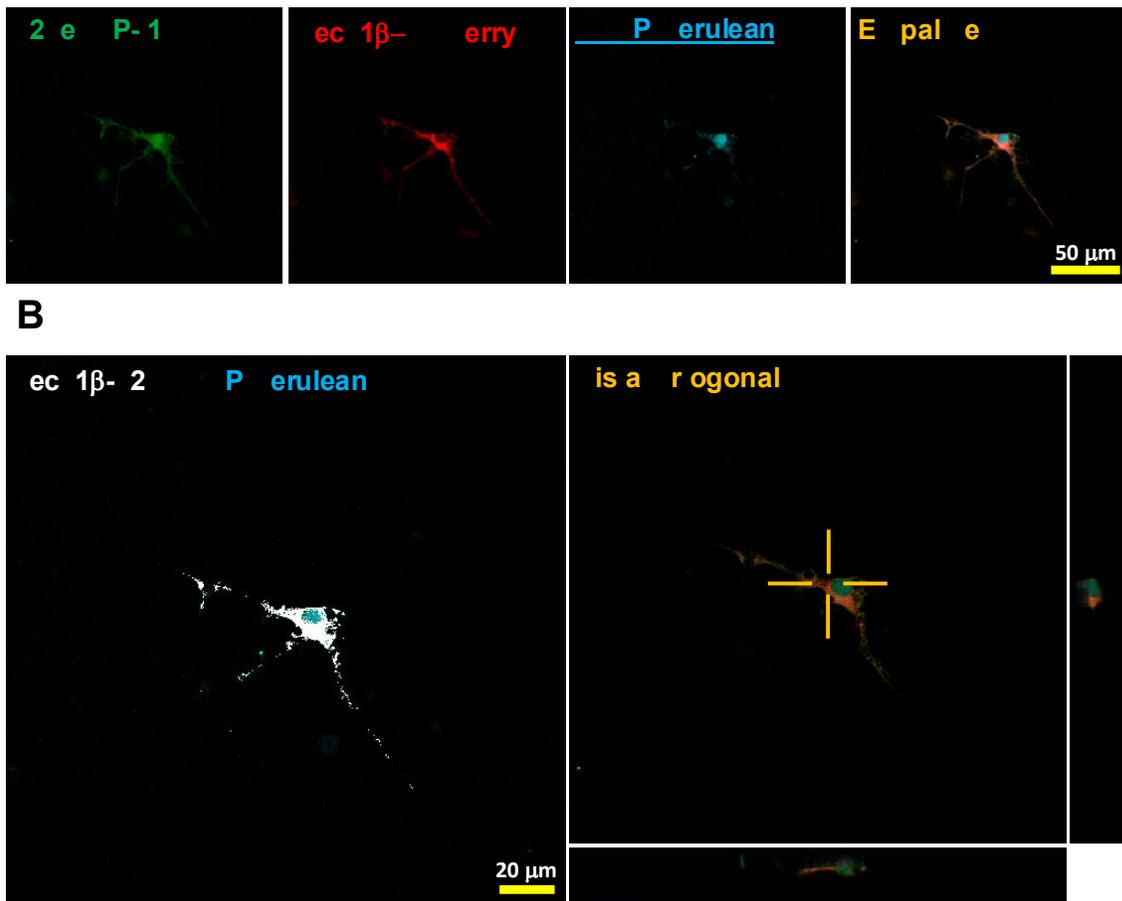
## **Co-localización de las proteínas L29eGFP y Sec61 $\beta$ -mCherry en los procesos de las células GFAP<sup>+</sup>.**

Finalmente, con el fin de evaluar si las proteínas ribosomales y el retículo endoplásmico forman complejos de traducción en los procesos de los astrocitos, se evaluó co-localización de las proteínas L29eGFP y Sec61 $\beta$ -mCherry en células GFAP<sup>+</sup>, para ello se realizaron co-electroporaciones con los plásmidos RPL29eGFP-C1, Sec61 $\beta$ -mCherry y el plásmido GFAP-Cerulean (García-Marqués y López-Mascaraque, 2012) (Figura 27), este último expresa de manera soluble la proteína cerulean bajo el promotor GFAP. Del total de células electroporadas, el  $41 \pm 9$  % expresaron la proteína cerulean (N=3 experimentos independientes). A pesar de que todas las células GFAP<sup>+</sup> expresaron las proteínas L29eGFP y Sec61 $\beta$ -mCherry en soma y procesos (Figura 27A), sólo en el  $50 \pm 8$  % de ellas, encontramos co-localización de L29/Sec61 $\beta$  en los procesos distales de las células GFAP<sup>+</sup> (Figura 27 B y C). De manera similar a los experimentos previos, un pequeño porcentaje de células con morfologías similares a las GFAP<sup>+</sup>, que no expresaron la proteína cerulean ( $20 \pm 6$  %), presentan co-localización de las proteínas L29/Sec61 $\beta$  en procesos distales.



**Figura 27. Co-localización de L29eGFP/Sec61 $\beta$ mCherry en células GFAP<sup>+</sup> de cerebelo de ratón.** **A.** En verde expresión de la proteína Rpl29 fusionada al carboxilo terminal de la proteína fluorescente eGFP, en rojo la proteína Sec61 $\beta$  fusionada a mCherry, en azul la proteína cerulean expresada bajo el promotor GFAP y en amarillo el empalme de las tres señales. **B.** Análisis de co-localización de las proteínas RPL29 y Sec61 $\beta$  (en blanco) en células GFAP<sup>+</sup> (en azul); flechas indican co-localización en procesos y cabeza de flecha señala co-localización únicamente alrededor del núcleo. **C.** Gráfica de Venn donde se representa la proporción ( $50 \pm 8\%$ ) de células que expresan cerulean bajo el GFAP que presentan co-localización de las proteínas RPL29 y Sec61 $\beta$  en los procesos distales. N=3.

Para analizar la distribución de la co-localización de las proteínas RPL29/Sec61 $\beta$  en los procesos de células GFAP<sup>+</sup>, se realizaron acercamientos de ellas. Como se observa en la figura 28. La mayor densidad de co-localización (Figura 28B) se encontró alrededor del núcleo, sin embargo, a lo largo de los procesos podemos observar cúmulos bien definidos. Así mismo, existen porciones de la célula donde a pesar de estar presentes ambas proteínas, la co-localización es nula.



**Figura 28. Co-localización de RPL29eGFP/Sec61 $\beta$ mCherry en procesos de células GFAP<sup>+</sup> de cerebelo de ratón. A.** Expresión de la proteína RPL29 fusionada al carboxilo terminal de la proteína fluorescente eGFP (verde), expresión de la proteína Sec61 $\beta$  fusionada a mCherry (rojo) y expresión de la proteína cerulean expresada bajo el promotor GFAP (azul), empalme de las señales (amarillo). **B.** Análisis de co-localización de las proteínas RPL29 y Sec61 $\beta$  (en blanco) en célula GFAP<sup>+</sup> (en azul). **C.** Vista ortogonal muestra distribución intracelular de las proteínas RPL29eGFP y Sec61 $\beta$ -mCherry. N=13.

## 9. DISCUSIÓN

En este trabajo mostramos la expresión de receptores GABA<sub>A</sub> que incluyen las subunidades GABA<sub>ρ</sub> en las EGCs que bordean el cuarto ventrículo y en células GFAP<sup>+</sup> de la CG del cerebelo.

La capa periventricular del techo del cuarto ventrículo se encuentra formada por células gliales. Estas células tienen múltiples microvellosidades y son ciliadas, estos cilios permiten modular el flujo del líquido cefalorraquídeo (Alvarez-Morujó et al., 1992), la mayoría de estas células generan corrientes iónicas en respuesta a aplicaciones de GABA debido a que expresan receptores GABA<sub>A</sub> que incluyen las subunidades GABA<sub>ρ</sub>. Las respuestas a GABA son bloqueadas de manera parcial con TPMPA o bicuculina, y eliminadas por completo al co-aplicar ambos antagonistas (Reyes-Haro et al., 2013). En el presente trabajo mostramos evidencia de que, durante el desarrollo postnatal del cerebelo, las subunidades GABA<sub>ρ</sub> se encuentran ampliamente distribuidas en las EGCs pero aún desconocemos el papel que la transmisión GABAérgica pueda jugar en el sistema ventricular, por una parte podría estar detectando los niveles de GABA presentes en el líquido cefalorraquídeo, o bien el GABA que proviene del parénquima cerebeloso. Además, es necesario esclarecer cuál es la posición del receptor en las células endocelulares, pues desconocemos si se encuentra hacia la luz del ventrículo o en contacto con células vecinas.

Los cambios en la acción del GABA durante el desarrollo se deben a alteraciones de la transmisión y señalización GABAérgica. Durante el desarrollo, la composición y localización de las subunidades que conforman los receptores GABA<sub>A</sub> presentan cambios drásticos (Attwell et al., 1993); (Fon y Edwards., 2001); (Owens y Kriegstein., 2002); (Taylor y Gordon-Weeks., 1991); (Varjú et al., 2001);

(Araki et al., 1992); (Fritschy et al., 1994); (Gambarana et al., 1990); (Laurie et al., 1992); (Ma y Barker., 1995); (Maric et al., 1997). Las neuronas de la corteza cerebelosa expresan receptores GABA<sub>A</sub> conformados principalmente por las subunidades  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  (Fritschy y Mohler, 1995; Laurie et al., 1992; Persohn et al., 1992). Se sugiere que, a pesar de que las subunidades  $\beta 3$ ,  $\gamma 2$  y  $\gamma 3$  se expresan de manera abundante en estas neuronas en etapas tempranas del desarrollo (Laurie et al., 1992), los receptores GABA<sub>A</sub> no son funcionales debido a la ausencia de las subunidades  $\alpha$ , las cuales comienzan a expresarse y conformar los receptores funcionales al final de la etapa de proliferación (aproximadamente p8) (Takayama, 2005). En el presente trabajo, demostramos la presencia de GABA <sub>$\rho$ 1</sub> y GABA <sub>$\rho$ 2</sub> en etapas tempranas del desarrollo en neuronas y células GFAP<sup>+</sup> de la CG, la expresión de estas sugiere que la liberación extrasináptica de GABA podría estar activando receptores funcionales conformados por subunidades específicas, los cuales podrían estar involucrados en la regulación de mecanismos como proliferación, migración y/o maduración de las células del cerebelo.

El patrón de expresión que describimos en este trabajo concuerda parcialmente con reportes previos que sugieren que GABA <sub>$\rho$ 1</sub> y GABA <sub>$\rho$ 2</sub> se localizan en niveles bajos en neuronas de Purkinje y Golgi durante el desarrollo postnatal temprano (Mejía et al., 2008; Rozzo y Armelli., 2002). La expresión de receptores GABA<sub>A</sub> en neuronas inmaduras del cerebelo es fundamental para la formación de circuitos sinápticos (Meinecke y rakic., 1990; Zdilar et al., 1992; Nadler et al., 1994). Las células gliales forman parte de la sinapsis tripartita, (Müller et al., 1994; Reyes-Haro et al., 2013; Riquelme et al., 2002), donde probablemente se encuentren jugando un papel importante como sensores extrasinápticos de GABA, similar a lo que ocurre con las células progenitoras en forma de estrella GFAP<sup>+</sup> (Liu et al., 2005). Los receptores GABA<sub>A</sub> en astrocitos de cerebelo en cultivo presentan un componente de desensibilización lento ( $\tau = 48.6 \pm 16.4$  s, comparado con los GABA<sub>A</sub> clásicos  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  ( $\tau \leq 10$  s)), resultado de la presencia de las subunidades GABA <sub>$\rho$</sub> , las cuales podrían potencialmente

participar en la modulación de la transmisión GABAérgico (Pétriz., 2011 Tesis Maestría).

La determinación precisa de la expresión de las subunidades GABA $\rho$  en células gliales se realizó empleando el ratón transgénico que identifica las células GFAP<sup>+</sup> (Nolte et al., 2001), distinguiéndolas así, de otros linajes celulares. A pesar que el papel de las subunidades GABA $\rho$  en células gliales aún no es claro, se ha reportado que estas subunidades participan en la migración radial de las neuronas de corteza cerebral durante el desarrollo (Denter et al., 2010). Las neuronas inmaduras de la zona intermedia expresan una combinación de subunidades clásicas del receptor GABA $\alpha$  y GABA $\rho$ , lo que sugiere que la activación de GABA $\rho$  pudiese tener funciones similares durante el desarrollo del cerebelo; debido a que neuronas GABAérgicas inmaduras expresan transitoriamente GFAP durante su etapa de proliferación, existe la posibilidad de que la población de células que se ha identificado como glía corresponda a células multipotentes que pueden generar interneuronas y astrocitos (Silbereis et al., 2009).

Las propiedades electrofisiológicas y la dinámica del tráfico de los receptores GABA $\alpha$  han sido ampliamente estudiadas en neuronas *in vitro* (Petrini et al., 2014; Vithlani et al., 2011). Por ejemplo, se sabe que la difusión lateral en la región perisináptica es esencial para re-provisionar las sinapsis inhibitorias con el receptor; este mecanismo depende en parte de las subunidades GABA $\alpha$  y a través de este se controla la señalización GABAérgica (Thomas et al., 2005; Muir y Kittler., 2014). Además, se ha demostrado que alteraciones en el ensamble y tráfico de los receptores GABA $\alpha$  tienen impacto en sus propiedades funcionales las cuales son relevantes en enfermedades como la epilepsia, esquizofrenia, depresión, ansiedad, abuso de drogas, entre otras (Bateson, 2002; Chandler et al., 1998; Moss y Smart., 2001; Mueller et al., 2015). Con el fin de entender los mecanismos responsables de la distribución e inserción de los receptores GABA $\alpha$  en la membrana plasmática, se han realizado estudios de movimientos de partículas únicas a lo largo de axones, dendritas y conos de crecimiento axonal;

en donde de manera general se ha descrito que los receptores GABA<sub>A</sub> se distribuyen e insertan en la membrana plasmática principalmente a través de mecanismos de difusión libre y difusión lateral (asociada a movimientos direccionados) (Bouzigues et al., 2007). Durante periodos de difusión libre, los receptores GABA<sub>A</sub> “exploran” y se extienden hacia gran parte de la membrana y una vez que se asocian a microtubulos su movimiento se direcciona hacia zonas específicas de la membrana plasmática (Saxton et al., 1997). Ambos procesos son bastante dinámicos, presentando coeficientes de difusión de 0.26  $\mu\text{m}^2/\text{s}$  y 0.29  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ , respectivamente (Bouzigues et al., 2007). Contrario a esto, encontramos que en células gliales la dinámica de tráfico de GABA $\rho$ 2-GFP es más lenta comparada con los procesos de difusión de los receptores GABA<sub>A</sub> en neuronas. El coeficiente de difusión de las partículas que siguen movimientos direccionados (aplanadas y poligonales) es de  $0.15 \pm 0.03 \mu\text{m}^2/\text{s}$ , mientras que las partículas que siguen movimientos de difusión libre (estrelladas) presentan coeficientes de  $0.023 \pm 0.008 \mu\text{m}^2/\text{s}$ . Nuestros datos coinciden con valores reportados para el tráfico de vesículas y otras proteínas de membrana en astrocitos en cultivo, como son los transportadores de aminoácidos excitatorios 2 (EAAT2) y los transportadores de glutamato (GLT-1) (Cavender et al., 2015; Murphy-Royal et al., 2014; Potokar et al., 2013). Sin embargo, en estos trabajos, los investigadores analizaron las células que presentan morfologías aplanadas, por lo que, en estos estudios no se mostró evidencia sobre la influencia que ejerce el fenotipo de los astrocitos sobre el tráfico de proteínas.

Por otra parte, existe evidencia que sugiere la formación de heterómeros GABA<sub>A</sub>-GABA $\rho$  en el SNC (Harvey et al., 2006), nuestros datos señalan de manera clara la presencia de estos complejos heteroméricos *in vitro* e *in vivo*; en las células en cultivo encontramos que la mayor convergencia de la distribución de ambas entidades, reside en el soma de las células GFAP<sup>+</sup>. No evaluamos la dinámica de inserción a la membrana plasmática de las subunidades, sin embargo, empleando anticuerpos específicos dirigidos hacia el dominio extracelular de las mismas, observamos la presencia de algunas subunidades del

receptor GABA<sub>A</sub> incluyendo GABA<sub>ρ</sub> en la membrana plasmática del soma y procesos de las células en cultivo. Adicionalmente, el análisis de las trayectorias de GABA<sub>ρ</sub>2-GFP sugiere además de una movilidad limitada, diferencias dependientes del fenotipo: en las células aplanadas y poligonales el movimiento de GABA<sub>ρ</sub>2-GFP es lento y direccionado, mientras que en células estrelladas los movimientos son casi nulos y se efectúan a través de difusión simple. Procesos similares se describieron para el tráfico del receptor a cannabinoides 1 (CB1R1) en astrocitos de morfología aplanada *in vitro* (Osborne et al., 2009). Los astrocitos en cultivo con forma estrellada se parecen a los astrocitos maduros del sistema nervioso central (Vernadakis y Mangoura., 1988), por lo que, es probable que las diferencias encontradas, sean a causa del estado de maduración que presentan las células.

Los resultados discutidos previamente sugieren que la expresión temporal de las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> puede contribuir a la regulación precisa del desarrollo de las células gliales del cerebelo; la presencia de las subunidades GABA<sub>ρ</sub> ya sea formando homopentámeros o heteropentámeros hace más compleja la señalización GABAérgica durante el desarrollo postnatal temprano. Es claro que los receptores GABA<sub>A</sub> residen en los procesos de células GFAP<sup>+</sup>, sin embargo, aún no se ha determinado la manera en la que estos se transportan hacia la membrana plasmática. Las posibilidades son: 1) que se transporten en vesículas más pequeñas que el límite de resolución de los microscopios que empleamos en este estudio, 2) que el transporte esté regulado directamente por el ambiente de GABA externo, como sucede con el tráfico de GLT-1 (Ciaran et al., 2014), o 3) que la síntesis de proteínas se efectúe de manera local en los procesos; esta posibilidad parece probable dado que en este y otros estudios mostramos la presencia de aparato Golgi, RE y ácidos nucleicos en los procesos de las células en cultivo (Pivneva et al., 2008; Volterra et al., 2014). Consistente con esta sugerencia, identificamos en cultivos organotípicos de cerebelo las proteínas ribosomales RpL29 y RpS5 a lo largo de los procesos de las células

GFAP<sup>+</sup>. (Fig. 24-26) y la co-localización de las proteínas RPL29 y la Sec61 $\beta$  en los procesos distales de los astrocitos. Asimismo, estudios de ME revelan que en los procesos de los astrocitos se encuentra el elemento de poliadenilación citoplasmático de unión a proteína 1 (CREB1), el cual se sabe regula el tráfico y la traducción de mRNAs (Gerstner et al., 2012), esto no sólo apoya la hipótesis de la síntesis local en los procesos, sino que además sugiere que el tráfico de ribosomas y/o RNAs en los procesos de los astrocitos es un evento dinámico y controlado, el cual podría efectuarse a través de la unión de complejos proteicos ribosomales con elementos moleculares motores (kinesinas y miosinas), de manera similar a lo que ocurre en los axones neuronales (Sotelo et al., 2006). Para apoyar esta hipótesis se requieren estudios que evalúen de manera directa la síntesis local de proteínas. También queda por determinar si el tráfico selectivo de las subunidades GABA $\rho$  y/o su mRNA se efectúa a través de vías alternativas, y evaluar las propiedades fisiológicas de los receptores GABA $A$  que contienen las subunidades GABA $\rho$  en células gliales *in situ*.

## 10. CONCLUSIONES

1. Las subunidades GABA $\rho$  se expresan en células GFAP<sup>+</sup> localizadas en la zona subventricular y en la CG del cerebelo. El papel de estos receptores en este tipo celular aún no es claro.
2. En astrocitos en cultivo de cerebelo de ratón, los receptores funcionales GABA<sub>A</sub> que contienen las subunidades GABA $\rho$ , están conformados de la siguiente manera: 1) poblaciones de receptores homoméricos GABA $\rho$ ; 2) receptores GABA<sub>A</sub> clásicos y 3) receptores heteroméricos conformados por subunidades clásicas del receptor GABA<sub>A</sub> y subunidades GABA $\rho$ .
3. Los receptores GABA<sub>A</sub> residen en diferentes dominios intracelulares y su distribución y tráfico dependen del fenotipo del astrocito que los expresan.
4. La presencia de aparato de Golgi, RE, ácidos nucleicos y proteínas ribosomales en los procesos de células gliales, sugiere que la síntesis de proteínas pudiera llevarse a cabo de manera local en ellos.

## 11.PERSPECTIVAS

1. Determinar el papel de los receptores GABA<sub>A</sub> que contienen las subunidades GABA<sub>ρ</sub> en células gliales del cerebelo *in situ*.
2. Esclarecer los mecanismos de regulación del tráfico e inserción de las subunidades GABA<sub>ρ</sub> a la membrana plasmática de astrocitos.
3. Conocer la dinámica del tráfico de las proteínas ribosomales y evaluar si la síntesis de proteínas se efectúa en los procesos de células gliales.

## 12.REFERENCIAS

- Alvarez-Morujo A, Toranzo D, Blázquez JL, Peláez B, Sánchez A, Pastor FE, Amat G, Amat P. 1992. The ependymal surface of the fourth ventricle of the rat: a combined scanning and transmission electron microscopic study. *Histol Histopathol* 7(2):259-266.
- Andrade R., Malenka R., Nicoll R. 1986. A G protein couples serotonin and GABAB receptors to the same channels in hippocampus. *Science* 234:1261–1265.
- Araki, T., Kiyama, H., & Tohyama, M. 1992. GABAA receptor subunit messenger RNAs show differential expression during cortical development in the rat brain. *Neuroscience*, 51(3): 583-591.
- Attwell D., Barbour B., Szatkowski M. 1993. Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron*. 11: 401-407.
- Barakat L. y Bordey A. 2002. GAT-1 and Reversible GABA Transport in Bergmann Glia. *J. Neurophysiol* 88: 1407–1419.
- Bateson, A. N. 2002. Basic pharmacologic mechanisms involved in benzodiazepine tolerance and withdrawal. *Curr. Pharm. Des.* 8(1), 5–21.
- Ben-Ari Y., Cherubini E., Corradetti R., Gaiarsa J. 1989. Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurons. *Journal of Physiology*. 416: 303–325.
- Ben-Ari Y., Gaiarsa J., Tyzio R., Khazipov R. 2007. GABA: A pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiological Reviews*. 87: 1215–1284.

- Ben-Ari Y., Holmes G. 2006. Effects of seizures on developmental processes in the immature brain. *Lancet Neurology*. 5: 1055–1063.
- Bennett MR. y Balcar VJ. 1999. Forty years of amino acid transmission in the brain. *Neurochem int.* 35(4):269-80.
- Berger T, Walz W, Schnitzer J, Kettenmann H. 1992. GABA- and glutamate-activated currents in glial cells of the mouse corpus callosum slice. *J Neurosci Res.* 31(1):21-7.
- Bernstein M., Lyons S., Moller T., Kettenmann H. 1996. Receptor-mediated calcium signalling in glial cells from mouse corpus callosum slices. *J Neurosci Res* 46: 152–63.
- Bindokas V. e Ishida A. 1991. (-)-Baclofen and gamma-aminobutyric acid inhibit calcium currents in isolated retinal ganglion cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:10759–10763.
- Borden L., Smith K., Hartig P., Branchek T., Weinshank R. 1992. Molecular heterogeneity of the  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) transport system. Cloning of two novel high affinity GABA transporters from rat brain. *Journal Biological Chemistry.* 267: 21098-21104.
- Bormann J. 1988. Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes. *Trends Neurosci.* 11: 112-116.
- Bormann J. 2000. The ABC of GABA receptors. *TiPS* 21: 16-19.
- Bormann J. y Kettenmann H. 1988. Patch clamp study of GABA receptor Cl-channels in cultured astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 9336-9340.
- Bormann y Feigenspan. 1995. Differential pharmacology of GABAA and GABAC receptors on rat retinal bipolar cells. *Eur J Pharmacol.* 288: 97-104.
- Boue-Grabot E., Roudbaraki M., Bascles L., Tramu G., Bloch B., Garret M. 1998. Expression of GABA receptor rho subunits in rat brain. *J Neurochem.* 70: 899-907.

- Bouzigues C, Morel M, Triller A, y Dahan M. 2007. Asymmetric redistribution of GABA receptors during GABA gradient sensing by nerve growth cones analyzed by single quantum dot imaging. PNAS. vol. 104 no. 27 11251–11256.
- Bovolín 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. *Neurobiology* 89: 9344-9348.
- Bowery N. 1989. GABAB receptors and their significance in mammalian pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 10: 401-7.
- Brejc K., van Dijk W., Klaassen R., Schuurmans M., Van Der Oost J., Smit A. Y Sixma T. 2001. Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* 411:269-27.
- Calvo DJ., Vazquez AE., Miledi R. 1994. Cationic modulation of  $\rho 1$ -type  $\gamma$ -aminobutyrate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 12725-12729.
- Cammack J., Rakhilin S., Schwartz E. 1994. A GABA transporter operates asymmetrically and with variable stoichiometry. *Neuro.* 13: 949–960.
- Cavender C, Gottipati M, Parpura V. 2015. Trafficking of excitatory amino acid transporter 2-laden vesicles in cultured astrocytes: a comparison between approximate and exact determination of trajectory angles. *Amino Acids* 47:357–367.
- Chandler, L. J., Harris, R. A., and Crews. 1998. Ethanol tolerance and synaptic plity. *Trends Pharmacol. Sci.* 19(12), 491–495.
- Cherubini E., Gaiarsa J., Ben-Ari Y. 1991. GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends in Neurosciences.* 14: 515–519.

- Clark B. y Mobbs P. 1992. Transmitter-operated channels in rabbit retinal astrocytes studied in situ by whole-cell patch clamping. *J. Neurosci.* 12: 664-673.
- Connolly C. N., Krishek B. J., McDonald B. J., Smart T. G., Moss S. J. 1996. Assembly and cell surface expression of heteromeric and homomeric gamma-aminobutyric acid type A receptors. *J Biol Chem.* 271: 89-96.
- Conti F., Melone M., De Biasi S., Minelli A., Brecha N., Ducati A. 1998. Neuronal and glial colocalization of GAT-1, a high-affinity  $\gamma$ -aminobutyric acid plasma membrane transporter, in human cerebral cortex: with a note on its distribution in monkey cortex. *Journal of Comparative Neurology.* 396: 51-63.
- Corey J., Guastella J., Davidson N., Lester H. 1994. GABA uptake and release by a mammalian cell line stably expressing a cloned rat brain GABA transporter. *Molecular membrane biology.* 11: 23–30.
- Crossman A. y Neary D. 2007. *Neuroanatomía Texto y Atlas a color.* Manchester Reino Unido: MASSON.
- Cutting G., Lu L., O'Hara B., Kasch L. 1991. Cloning of the  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)  $\rho$ 1 cDNA: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2673-2677.
- Dave K y Bordey A. 2009. GABA increases  $Ca^{2+}$  in cerebellar granule cell precursors via depolarization: implications for proliferation. *IUBMB Life* 61(5):496-503.
- Delgado L., y Schmachtenberg O. 2008. Immunohistochemical localization of GABA, GAD65, and the receptor subunits GABAalpha1 and GABAB1 in the zebrafish cerebellum.
- Denter D., Heck N., Riedemann T., White R., Kilb W., Luhmann H. 2010. GABAC receptors are functionally expressed in the intermediate zone and regulate radial migration in the embryonic mouse neocortex. *Neuroscience* 167(1):124-134.

- Didelon F., Sciancalepore M., Savic' N., Mladinic' M., Bradbury A., Cherubini E. 2002. gamma-Aminobutyric acid rho receptor subunits in the developing rat hippocampus. *J Neurosci Res.* 67: 739-44.
- Doble A. y Martin IL. 1992. Multiple benzodiazepine receptors: no reason for anxiety. *Trends Pharmacol Sci.* 13: 76-81.
- Dolphin A., Huston E., Scott R. 1990. GABAB-mediated inhibition of calcium currents: a possible role in presynaptic inhibition. in *GABABReceptors in Mammalian Function*, Wiley, Chichester. 259–271
- During M., Ryder K., Spencer D. 1995. Hippocampal GABA transporter function in temporal-lobe epilepsy. *Nature.* 376: 174-177.
- Enz R. 2001. GABAC Receptors: A Molecular View. *Biol. Chem.* 382: 1111 – 1122.
- Enz R. y Cutting G. 1998. Molecular composition of GABAC receptors. *Vision Res.* 38: 1431-1441
- Erlander M. y Tobin A. 1991. The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: a review. *Neurochemical Research.* 16: 215–226.
- Esclapez M., Tillakaratne N., Kaufman D., Tobin A., Houser C. 1994. Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *Journal of Neuroscience.* 14: 1834–1855.
- Estrada-Mondragón A., Reyes-Ruiz J. M., Martínez-Torres A., Miledi R. 2010. Structure-function study of the fourth transmembrane segment of the GABA<sub>p1</sub> receptor. *PNAS* 107: 17780–17784.
- Feigenspan A., Bormann J. 1998. GABA-gated Cl<sup>-</sup> channels in the rat retina. *Prog Retin Eye Res.* 17: 99-126.
- Feigenspan A., Wässle H., Bormann J. 1993. Pharmacology of GABA receptor Cl<sup>-</sup> channels in rat retinal bipolar cells. *Nature* 361: 159-162.

- Fon, E. A., & Edwards, R. H. 2001. Molecular mechanisms of neurotransmitter release. *Muscle Nerve*, 24(5): 581-601.
- Fraser D., Mudrick-Dannon L., MacVicar B. 1994. Astrocytic GABA receptors. *Glia* 11: 83-93.
- Fritschy, J. M., & Mohler, H. 1995. GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J Comp Neurol*, 359(1): 154-194
- Fritschy, J. M., Paysan, J., Enna, A., & Mohler, H. 1994. Switch in the expression of rat GABAA-receptor subtypes during postnatal development: an immunohistochemical study. *J Neurosci*, 14(9): 5302-5324.
- Gage P. 1992. Activation and modulation of neuronal K<sup>+</sup> channels by GABA. *Trends Neurosci* 15:46–51.
- Gambarana, C., Pittman, R., & Siegel, R. E. 1990. Developmental expression of the GABAA receptor alpha 1 subunit mRNA in the rat brain. *J Neurobiol*, 21(8): 1169-1179.
- García-Marqués J y López-Mascaraque L. 2012. Clonal identity determines astrocyte cortical heterogeneity. *Cerebral Cortex*, 23(6):1463-72.
- Gerstner J, Vanderheyden M, LaVaute T, Westmark C, Rouhana L, Pack A, MarvWickens, Landry C. 2012. Time of day regulates subcellular trafficking, tripartite synaptic localization, and polyadenylation of the astrocytic fabp7 mRNA. *The Journal of Neuroscience*, 32(4):1383–1394.
- González-González MA. 2011. Análisis de la distribución del receptor GABA<sub>A</sub> en la zona periventricular del cerebelo. Universidad Autónoma de México. Tesis de Maestría.
- Green W., Millar N. 1995. Ion-channel assembly. *Trends Neurosci*. 6: 280-287.
- Guastella J., Nelson N., Nelson H. 1990. Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. *Science*. 249: 1303–1306.

- Gurba K. 2010. Assembly and Heterogeneity of GABAA receptors. Vanderbilt Brain Institute. 2: 25-32.
- Hackam AS., Wang TL., Guggino WB., Cutting GR. 1997. The N-terminal domain of human GABA receptor rho1 subunits contains signals for homooligomeric and heterooligomeric interaction. J Biol Chem. 272(21):13750-7.
- Harvey V., Duguid I., Krasel C., Stephens G. 2006. Evidence that GABA rho subunits contribute to functional ionotropic GABA receptors in mouse cerebellar Purkinje cells. J Physiol. 577: 127-139.
- Hashimoto M. y Hibi M. 2012. Development and evolution of cerebellar neural circuits. Dev Growth Differ. 3:373-89.
- Hill D., Bowery N., Hudson A., 1984. Inhibition of GABAB receptor binding by guanyl nucleotides. J Neurochem 42:652–657.
- Hirst W., Rice S., Minton J., Calver A., Pangalos M., Jenkins O., Price G. 2000. Characterisation of a CHO cell line stably co-expressing GABABR1b and GABABR2 receptors. Br. J Pharmacol 129:80.
- Hoogland T., y Kuhn B. 2010. Recent developments in the understanding of astrocyte function in the cerebellum in vivo. Cerebellum. 9(3):264-71.
- Hösli E, Otten U, Hösli L. 1997. Expression of GABA(A) receptors by reactive astrocytes in explant and primary cultures of rat CNS. Int J Dev Neurosci. 15(8):949-60.
- Huberfeld G., Wittner L., Clemenceau S. 2007. Perturbed chloride homeostasis and GABAergic signaling in human temporal lobe epilepsy. Journal of Neuroscience. 27: 9866–9873.
- Inoue M., Matsuo T., Ogata N. 1985. Possible involvement of K<sup>+</sup>-conductance in the action of gamma-aminobutyric acid in the guinea-pig hippocampus. Br J Pharmacol 86:515–524.

- Ito M. 2012. *The Cerebellum: Brain for an Implicit Self*. (FT Press Science, United States of America), First Ed.
- Jacob T., Moss S. Jurd R. 2008. GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci*. 5: 331-343.
- Jechlinger M., Pelz R., Tretter V., Klausberger T. Sieghart W. 1998. Subunit composition and quantitative importance of hetero-oligomeric receptors: GABAA receptors containing  $\alpha 6$  subunits. *J. Neurosci*. 18, 2449–2457.
- Johnston GAR. 1996. GABA<sub>A</sub> receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels?. *Trends Pharmacol Sci*. 17: 319-323.
- Johnston GAR. y Curtis D. R. 1975. Cis- and trans-4-aminocrotonic acid as GABA analogues of restricted conformation. *J Neurochem*. 24: 157-160.
- Jones S., Palmer M. 2011. Pharmacological analysis of the activation and receptor properties of the tonic GABA(C)R current in retinal bipolar cell terminals. *Plos one*. 9: e24892.
- Jung M., Lippert B., Metcalf B. 1977. The effect of 4 amino hex 5 ynoic acid ( $\gamma$  acetylenic GABA,  $\gamma$  ethynyl GABA) a catalytic inhibitor of GABA transaminase, on brain GABA metabolism in vivo. *Journal of Neurochemistry*. 28: 717–723.
- Kanner B. y Bendahan A. 1990. Two pharmacologically distinct sodium- and chloride-couple high-affinity  $\gamma$ -aminobutyric acid transporters are present in plasma membrane vesicles and reconstituted preparations from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87: 2550–2554.
- Karbon E., Duman R., Enna S., 1984. GABAB receptors and norepinephrine-stimulated cAMP production in rat brain cortex. *Brain Res* 306:327–332.

- Kaupmann K., Huggel K., Heid J., Flor PJ., Bischoff S., Mickel SJ., McMaster G., Angst C., Bittiger H., Froestl W., Bettler B. 1997. Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386: 239-246.
- Kettenmann H., Backus K., Schachner M. 1984. Aspartate, glutamate and gamma-aminobutyric acid depolarize cultured astrocytes. *Neurosci Lett.* 52: 25–9.
- Kettenmann H., Schachner M. 1985. Pharmacological properties of gamma-aminobutyric acid-, glutamate-, and aspartate-induced depolarizations in cultured astrocytes. *J Neurosci.* 5:3295-301.
- Kneussel M. 2002. Dynamic regulation of GABAA receptors at synaptic sites. *Brain Res Brain Res Rev.* 1: 74-86.
- Koziol L., Budding D., Chidekel D. 2011. From movement to thought: executive function, embodied cognition and the cerebellum. *Cerebellum.* 12(3): 1473-80.
- Kugler P. 1993. In situ measurements of enzyme activities in the brain. *Histochemical Journal.* 25: 329–338.
- Laurie, D. J., Wisden, W., & Seeburg, P. H. 1992. The distribution of thirteen GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *J Neurosci,* 12(11): 4151-4172.
- Le Novère N. y Changeux J. 1999. The Ligand Gated Ion Channel Database. *Nucleic Acids Res.* 27:340-342.
- Liu Q., López-Corcuera B., Mandiyan S., Nelson H., Nelson N. 1993. Molecular characterization of four pharmacologically distinct gamma-aminobutyric acid transporters in mouse brain. 1993. *Journal of Biological Chemistry.* 268: 2106-2112.

- Liu X., Wang Q., Haydar T., Bordey A. 2005. Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat Neurosci* 8(9):1179-1187.
- López-Chávez A., Miledi R., Martínez-Torres A. 2005. Cloning and functional expression of the bovine GABA(C) rho2 subunit. Molecular evidence of a widespread distribution in the CNS. *Neurosci.* 53: 421-427.
- Luckasiewicz P., Colleen R., Shields. 1998. Different combinations of GABAA and GABAC receptors confer distinct temporal properties to retinal synaptic responses. *J Neurophysiol.* 79: 3157-3167.
- Luckasiewicz P., Werblin F. 1994. A Novel GABA Receptor Modulates Synaptic Transmission from Bipolar to Ganglion and Amacrine Cells in the Tiger Salamander Retina. *The Journal of Neuroscience* 74: 1213-1223.
- Lukasiewicz P., Erika D., Botir T., Sagdullaev., McCall A. 2004. GABAC receptor-mediated inhibition in the retina. Elsevier Ltd.: 3289–3296.
- Ma, W., & Barker, J. L. 1995. Complementary expressions of transcripts encoding GAD67 and GABAA receptor alpha 4, beta 1, and gamma 1 subunits in the proliferative zone of the embryonic rat central nervous system. *J Neurosci*, 15(3 Pt 2): 2547-2560.
- Macdonald R., Kang Jing-Qiong., Gallagher M. 2010. Mutations in GABAA receptor subunits associated with genetic epilepsie. *J. Physiol.* 588: 1861-1869.
- Malchow R., Qian H., Ripps H. 1989. Gamma Aminobutyric acid (GABA), induced currents of skate Müller (glia) cells are mediated by neuronal-like GABAA receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 4220-4230.
- Maric, D., Maric, I., Ma, W., Lahojuji, F., Somogyi, R., Wen, X., Sieghart, W., Fritschy, J. M., & Barker, J. L. 1997. Anatomical gradients in proliferation and differentiation of embryonic rat CNS accessed by buoyant density fractionation: alpha 3, beta 3 and gamma 2 GABAA receptor subunit co-

expression by post-mitotic neocortical neurons correlates directly with cell buoyancy. *Eur J Neurosci*, 9(3): 507-522.

- Martínez-Delgado G., Reyes-Haro D., Espino-Saldaña A. E., Rosas-Arellano A., Pétriz A., Juárez-Mercado P., Miledi R., Martínez-Torres A. 2011. Dynamic targeting of GABA $\rho$ 2 receptors in retinal bipolar neurons and cerebellar astrocytes in culture. *Neuroreport* 22:4–9.
- McCall y Lukasiewicz. 2002. Elimination of the rho1 subunit abolishes GABA(C) receptor expression and alters visual processing in the mouse retina. *J Neurosci. Res.* 22: 4163-4174.
- McDonald R., y Olsen R. 1994. GABAA receptor channels. *Ann Rev Neurosci.* 17: 569-602.
- Meier S., Kafitz K., Rose C. 2008. Developmental profile and mechanisms of GABA-induced calcium signaling in hippocampal astrocytes. *Glia* 56: 1127–37.
- Meinecke DL y Rakic P. 1990. Developmental expression of GABA and subunits of the GABAA receptor complex in an inhibitory synaptic circuit in the rat cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res* 55(1):73-86.
- Mejía C., García-Alcocer G., Berumen L., Rosas-Arellano A., Miledi R., Martínez-Torres A. 2008. Expression of GABA $\rho$  subunits during rat cerebellum development. *Neurosci Lett.* 432: 1-6.
- Michalet X. 2010. Mean square displacement analysis of single-particle trajectories with localization error: Brownian motion in an isotropic medium. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* ;82(4 Pt 1):041914.
- 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. *PNAS.* 99: 13238-13242.
- Minelli A., De Biasi S., Brecha N., Zuccarello L., Conti F. 1996. GAT-3, a high-affinity GABA plasma membrane transporter, is localized to astrocytic

processes, and it is not confined to the vicinity of GABAergic synapses in the cerebral cortex. *Journal of Neuroscience*. 16: 6255–6264.

- Morris K., Moorefield C., Amin J. 1999. Differential Modulation of the Gamma-Aminobutyric Acid Type C Receptor by Neuroactive Steroids. *Mol. Pharm.* 56:752–759.
- Moss, S. J. and Smart, T. G. 2001. Constructing inhibitory synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* 2(4), 240–250.
- Mueller C., Remedies V., Haroutunian y Meador-Woodruff. 2015. Abnormal subcellular localization of GABAA receptor subunits in schizophrenia brain. *Transl Psychiatry* 5:612.
- Muir J y Kittler JT. 2014. Plasticity of GABAA receptor diffusion dynamics at the axon initial segment. *Front Cell Neurosci* 8:151.
- Müller T., Fritschy J., Grosche J., Pratt G., Möhler H., Kettenmann H. 1994. Developmental regulation of voltage-gated K<sup>+</sup> channel and GABAA receptor expression in Bergmann glial cells. *J Neurosci* 14(5 Pt 1):2503-2514.
- Murphy-Royal C, Dupuis J, Varela J, Panatier A, Pinson B, Baufreton J, Groc L y Oliet S. 2014. Surface diffusion of astrocytic glutamate transporters shapes synaptic transmission. *Nature*. 18: 2.
- Nadler L., Guirguis E., y Siegel R. 1994. GABAA receptor subunit polypeptides increase in parallel but exhibit distinct distributions in the developing rat cerebellum. *J Neurobiol* 25(12):1533-1544.
- Nilsson M., Eriksson P., Ronnback L., Hansson E. 1993. GABA induces Ca<sup>2+</sup> transients in astrocytes. *Neuroscience* 54: 605–14.
- Nolte C., Matyash M., Pivneva T., Schipke C., Ohlemeyer C., Hanisch U., Kirchhoff F., Kettenmann H. 2001. GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia* 33(1):72-86.

- Odagaki Y., y Koyama T. 2001. Identification of G alpha subtype(s) involved in gamma-aminobutyric acidB receptor-mediated high-affinity guanosine triphosphatase activity in rat cerebral cortical membranes. *Neurosci Lett.* 297:137–141
- Odagaki Y., Nishi N., Koyama T. 2000. Functional coupling of GABAB receptors with G proteins that are sensitive to N-ethylmaleimide treatment, suramin and benzalkonium chloride in rat cerebral cortical membranes. *J Neural Transm.* 107:1101–1116
- Ogurusu T., Eguchi G., Shingai R. 1997. Localization of gamma-aminobutyric acid (GABA) receptor rho 3 subunit in rat retina. *Neuroreport* 8: 925-927.
- Olsen R. y Sieghart W. 2008. *International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update.* *Pharmacol Rev.* 60: 243-60.
- Olsen R. y Tobin A. 1990. *Molecular Biology of GABAA receptors.* *FASEB J* 4: 1469-1480.
- Opitz-Araya, X., Barria, A. 2011. *Organotypic Hippocampal Slice Cultures.* *J. Vis. Exp.* (48), e2462, doi:10.3791/2462.
- Osborne K., Lee W., Malarkey E., Irving A., Parpura V. 2009. Dynamic imaging of cannabinoid receptor 1 vesicular trafficking in cultured astrocytes. *ASN Neuro* 1: 283-296.
- Owens, D. F., & Kriegstein, A. R. 2002. *Developmental neurotransmitters?* *Neuron*, 36(6): 989-991.
- Persohn E., Malherbe P. y Richards J. G. 1992. Comparative molecular neuroanatomy of cloned GABAA receptor subunits in the rat CNS. *J. Comp Neurol.* 326, 193–216.

- Petrini E., Ravasenga T., Hausrat T., Iurilli G., Olcese U., Racine V., Sibarita J., Jacob T., Moss S., Benfenati F., Medini P., Kneussel M., Barberis A. 2014. Synaptic recruitment of gephyrin regulates surface GABAA receptor dynamics for the expression of inhibitory LTP. *Nat Commun* 5:3921.
- Pétriz A. 2011. Expresión de receptores GABA $\rho$  en astrocitos de cerebelo de ratón. Universidad Autónoma de México. Tesis de Maestría.
- Pirker S., Schwarzer C., Wieselthaler A., Sieghart W. y Sperk G. 2000. GABAA receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* 101, 815–850.
- Pivneva T., Haas B., Reyes-Haro D., Laube G., Veh RW., Nolte C., Skibo G., Kettenmann H. 2008. Store-operated Ca $^{2+}$  entry in astrocytes: different spatial arrangement of endoplasmic reticulum explains functional diversity in vitro and in situ. *Cell Calcium* 43(6):591-601.
- Polenzani L., Woodward RM., Miledi R. 1991. Expression of mammalian  $\gamma$ -aminobutyric acid receptors with distinct pharmacology in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4318-4322.
- Pörtl A., Hauer B., Fuchs K., Tretter V., Sieghart W. 2003. Subunit composition and quantitative importance of GABAA receptor subtypes in the cerebellum of mouse and rat. *Journal of Neurochemistry* 87:1444–1455.
- Potokar M., Lacovich V., Kreft M., Zorec R. 2012. Rab4 and Rab5 GTPase are required for directional mobility of endocytic vesicles in astrocytes. *Glia*. 60:594–604.
- Potokar M, Vardjan N, Stenovec M, Gabrijel M, Trkov S, Jorgačevski J, Kreft M, Zorec R. 2013. Astrocytic Vesicle Mobility in Health and Disease. *nt. J. Mol. Sci.* 14, 11238-11258.
- Qian H. y Ripps H. 1999. Response kinetics and pharmacological properties of heteromeric receptors formed by coassembly of GABA  $\rho$ - and  $\gamma$ 2-subunits. *Proc.R. Soc. Lond. B.* 266: 2419–2425.

- Qian H. y Ripps H. 2008. Focus on Molecules: The GABAC Receptor. *Exp Eye Res* 88: 1002-1003.
- Qian H., Dowling JE. 1993. Novel GABA responses from rod-driven retinal horizontal cells. *Nature* 361: 159-162.
- Ragozzino D., Woodward R. 1996. Design and in vitro pharmacology of a selective gamma-aminobutyric acidC receptor antagonist. *Mol Pharmacol.* 50: 1024-1030.
- Reyes-Haro D., González-González A., Pétriz A., Rosas-Arellano A., Kettenmann H., Miledi R., Martínez-Torres A. 2013. GABA<sub>A</sub> receptor expression in ependymal glial cells of the cerebellum.
- Reyes-Haro D., Miledi R., Colunga-García J. 2005. Potassium currents in primary cultured astrocytes from the rat corpus callosum. *J Neurocytol.* 34: 411-420.
- Ribak C., Tong W., Brecha N. 1996. GABA plasma membrane transporters, GAT-1 and GAT-3, display different distributions in the rat hippocampus. *Journal of Comparative Neurology.* 367: 595–606.
- Riquelme R., Miralles C., y De Blas A. 2002. Bergmann glia GABA(A) receptors concentrate on the glial processes that wrap inhibitory synapses. *J Neurosci* 22(24):10720-10730.
- Riquelme R., Miralles P., De Blas A. 2002. Bergmann glia GABA(A) receptors concentrate on the glial processes that wrap inhibitory synapses. *J. Neuroscience* 22:10720-30
- Root C., Velázquez-Ulloa N., Monsalve G., Minakova E., y Spitzer N. 2008. Embryonically expressed GABA and glutamate drive electrical activity regulating neurotransmitter specification. *J Neurosci* 28(18):4777-4784.
- 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: 347-353.

- Rosas-Arellano A., Parodi J., Machuca Parra A., Sánchez-Gutierrez A., Inestrosa N., Miledi R., Matrínez-Torres A. 2011. The GABA(A) $\rho$  receptors in hippocampal spontaneous activity and their distribution in hippocampus, amygdala and visual cortex. *Neuroscience Letters*. 500: 20–2.
- Roth F. y Draguhn A. 2012. GABA Metabolism and transport: Effect on synaptic efficacy. *Neural Plasticity*. 2012:805830.
- Rozzo A. y Armelli M. 2002. Expression and dendritic mRNA localization of GABA $\rho$  receptor rho1 and rho2 subunits in developing rat brain and spinal cord. *Eur Journal Neuros*. 15: 1747-1758.
- Sarto-Jackson I., Sieghart W. 2008. Assembly of GABA(A) receptors (Review). *Mol Membr Biol*. 4: 302-310.
- Saxton MJ, Jacobson K. 1997. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 26:373–399.
- Schousboe I., Bro B., Schousboe A. 1977. Intramitochondrial localization of the 4 aminobutyrate 2 oxoglutarate transaminase from ox brain. *Biochemical Journal*. 162: 303–307.
- Shingai R., Yanagi K., Fukushima T., Sakata K., Ogurusu T. 1996. Functional expression of GABA rho 3 receptors in *Xenopus* oocytes. *Neurosci. Res*. 26: 387–390.
- Silbereis J., Cheng E., Ganat Y., Ment L., y Vaccarino F. 2009. Precursors with glial fibrillary acidic protein promoter activity transiently generate GABA interneurons in the postnatal cerebellum. *Stem Cells* 27(5):1152-1163.
- Soghomonian J. y Martin D. 1998. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why?. *Trends Pharmacol Sci*. 12: 500-505.
- Sotelo-Silveira J, Calliari A, Kun A, Koenig E, Sotelo R. 2006. RNA trafficking in axons. *Traffic*; 7: 508–515.
- Spitzer N. 2012. Activity-dependent neurotransmitter respecification. *Nat Rev Neurosci* 13(2):94-106.

- Steinhäuser C., Jabs R., Kettenmann H. 1994. Glutamate activates a cationic conductance and blocks potassium currents in identified glial cells of the mouse hippocampal slice. *Hippocampus* 4: 19-36.
- Strata P., Scelfo B., Sacchetti B. 2011. Involvement of cerebellum in emotional behavior. *Physiol. Res*: S39-S48.
- Tanaka M., Yamaguchi K., Tatsukawa T., Theis M., Willecke K., Itohara S. 2008. Connexin43 and Bergmann glia gap junctions in cerebellar function. *Front neurosci.* 2: 225-33.
- Tasneem A., Lyer L., Jakobsson E. y Aravind L. 2005. Identification of the prokaryotic ligand-gated ion channels and their implications for the mechanisms and origins of animal Cys-loop ion channels. *Genome Biol.* 6:4.
- Taylor, J., & Gordon-Weeks, P. R. 1991. Calcium-independent gamma-aminobutyric acid release from growth cones: role of gamma-aminobutyric acid transport. *J Neurochem*, 56(1): 273-280.
- Thomas P., Mortensen M., Hosie A., y Smart T. 2005. Dynamic mobility of functional GABAA receptors at inhibitory synapses. *Nat Neurosci* 8(7):889-897.
- Tretter V., Hauer B., Nusser Z., Mihalek R. M., Hoyer H., Homanics G.E., Somogyi P. y Sieghart W. 2001. Targeted disruption of the GABAA receptor  $\alpha$ 2 subunit gene leads to an upregulation of  $\gamma$ 2 subunit-containing receptors in cerebellar granule cells. *J. Biol.Chem.* 276: 10532–10538.
- Tsang S., Xu S. y Xue H. 2007. The evolution of GABAA receptor-like genes. *Mol Biol Evol.* 24:599-610.
- Tyzio R., Allene C., Nardou R. 2011. Depolarizing actions of GABA in immature neurons depend neither on ketone bodies nor on pyruvate. *Journal of Neuroscience.* 31: 34–45.

- Varju, P., Katarova, Z., Madarász, E., & Szabó, G. 2001. GABA signalling during development: new data and old questions. *Cell Tissue Res*, 305(2): 239-246.
- Vélez-Fort M., Audinat E., Angulo M. 2012. Central Role of GABA in Neuron-Glia Interactions. *The Neuroscientist*. 17: 1-14
- Verkhratsky A. y Butt A. 2008. *Glial Neurobiology*. England, John Wiley & Sons Ltd.
- Vernadakis, A., & Mangoura, D. A. 1988. Factors influencing glia growth in culture: nutrients and cell-secreted factors. *Prog Clin Biol Res*, 259: 57-79.
- Vithlani M., Terunuma M., Moss S. 2011. The dynamic modulation of GABAA receptor trafficking and its role in regulating the plasticity of inhibitory synapses. *Physiol Rev*. 91: 1009-22.
- Volterra A., Liudet N., & Savtchouk I. 2014. Astrocyte Ca<sup>2+</sup> signalling: an unexpected complexity. *Nat Rev Neurosci* 15(5):327-335.
- Wegelius K., Pasternack M. 1998. Distribution of GABA receptor rho subunit transcripts in the rat brain. *Eur J Neurosci*. 10: 350-357.
- Woodward R., Polenzani L., Miledi R. 1993. Characterization of Bicuculline/Baclofen-Insensitive  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Receptors Expressed in *Xenopus* Oocytes I. Effects of C1 Channel Inhibitors. *Mol Pharm*. 42: 165-173.
- Wu Y., Wang A., Diez-Sampedro A., Richerson G. 2007. Nonvesicular inhibitory neurotransmission via reversal of the GABA transporter GAT-1. *Neuron*. 56: 851–865.
- Xu J. y Wojcik W. 1986. Gamma aminobutyric acid B receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase in cultured cerebellar granule cells: blockade by islet-activating protein. *J Pharmacol Exp Ther* 239:568–573.

- Yamauchi A., Uchida S., Kwon H. 1992. Cloning of a Na<sup>+</sup>-andCl<sup>-</sup>-dependent betaine transporter that is regulated by hypertonicity. *Journal of Biological Chemistry*. 267: 649–652.

Zdilar D., Luntz-Leybman V., Frosthalm A., y Rotter A. 1992. Differential expression of GABAA/benzodiazepine receptor beta 1, beta 2, and beta 3 subunit mRNAs in the developing mouse cerebellum. *J Comp Neurol* 326(4):580-594.