



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

“EXPRESIÓN DE RECEPTORES GABA_ρ EN ASTROCITOS DE CEREBELO DE RATÓN”

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

PRESENTA:
Q.F.B. ADRIANA PÉTRIZ REYES

DIRECTORES DE TESIS:
DR. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES
DR. DANIEL REYES HARO

COMITÉ TUTOR:
DR. ALFREDO VARELA ECHAVARRIA
DR. FRANCISCO G. VAZQUEZ CUEVAS.

Campus Juriquilla, Querétaro. Noviembre 2011



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.

“Si el cerebro fuese tan simple que pudiésemos entenderlo, entonces seríamos tan simples que no podríamos entenderlo”.

Anónimo



Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología



EXPRESIÓN DE RECEPTORES GABA_ρ EN ASTROCITOS DE CEREBELO DE RATÓN

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

Presenta:
Q.F.B. Adriana Pétriz Reyes.

Directores de Tesis:
Dr. Ataúlfo Martínez Torres.
Dr. Daniel Reyes Haro.

Campus Juriquilla, Querétaro. Noviembre 2011

Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Neurobiología

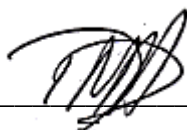
Los miembros del Jurado de Examen certificamos que la tesis elaborada por Adriana Pétriz Reyes, cuyo título es: "Expresión de receptores GABA ρ en astrocitos de cerebelo de ratón" se presenta como uno de los requisitos para obtener el grado de Maestría en Ciencias (Neurobiología) y cumple con los criterios de originalidad y calidad requeridos por la División de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Firmas

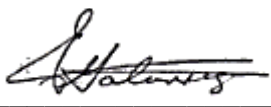
Presidente
Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera.



Secretario
Dr. Daniel Reyes Haro.



Vocal
Dr. Elvira Galarraga Palacio.



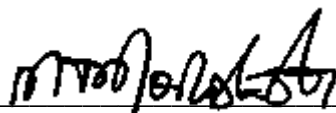
Suplente
Dr. Francisco G. Vázquez Cuevas.



Suplente
Dr. Gerardo Rojas Piloni.



Aprobado por el Comité Académico



Dra. María Teresa Morales Guzmán
Coordinadora del Programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología)

RESUMEN

El ácido γ -amino-butírico (GABA) juega un papel fundamental como neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central de los vertebrados y actúa en células nerviosas por la activación de receptores ionotrópicos (GABA_A) y/o metabotrópicos (GABA_B). El receptor GABA_A comprende 19 subunidades, dentro de las que se incluyen las subunidades GABA ρ 1-3. Las subunidades GABA ρ forman receptores homoméricos funcionales en las neuronas bipolares de la retina y en sistemas de expresión heteróloga, y receptores heteroméricos en las neuronas de Purkinje del cerebelo y en neuronas del hipocampo. Sin embargo su expresión en la glía no ha sido investigada. Datos preliminares de nuestro grupo indican que GABA ρ 1 y GABA ρ 2 son expresadas en la glía de la región subventricular del cerebelo que delimita el cuarto ventrículo y que es inmunoreactiva a la proteína ácido gliofibrilar (GFAP⁺), la cual es un marcador de astrocitos. El objetivo de este trabajo es determinar si los receptores GABA ρ se expresan en los cultivos primarios de astrocitos del cerebelo de ratón. Para ello se realizaron: 1) Estudios de RT-PCRs para evaluar la expresión del mRNA que codifica para las subunidades GABA ρ 1 y GABA ρ 2; 2) Estudios de inmunocitofluorescencia utilizando anticuerpos dirigidos contra GABA ρ 1 o ρ 2, y 3) Estudios de fijación de voltaje en la configuración de la célula completa para caracterizar la expresión funcional de GABA ρ . Mediante los estudios de RT-PCR se determinó la expresión de los transcritos GABA ρ 1, GABA ρ 2 y GFAP. Por otro lado, los ensayos de inmunocitofluorescencia revelaron que el 91.0 \pm 7.7% de las células en cultivo son GFAP⁺ y que GABA ρ 1 y GABA ρ 2 se expresan en un 60.0 \pm 6.8% y un 70.0 \pm 4.9% de las células en cultivo. Los resultados electrofisiológicos determinaron que los astrocitos presentan respuestas a GABA (EC₅₀ de 52 \pm 11.8 μ M), dichas respuestas son antagonizadas por bicuculina [100 μ M; 90.5 \pm 3.7%], picrotoxina [100 μ M; 69.9 \pm 8.6%] y TPMPA [100 μ M; 81.1 \pm 5.9%]. Debido a que el TPMPA es un antagonista selectivo de la subunidad GABA ρ se determinó la dosis respuesta de este fármaco y la IC₅₀ estimada fue de 5.9 \pm 0.6 μ M. Con base en estos datos, concluimos que GABA ρ está formando parte de los receptores GABA_A en astrocitos en cultivo.

ABSTRACT

The γ -amino butyric acid (GABA) plays a fundamental role as inhibitory neurotransmitter in the central nervous system of vertebrates and acts on the nerve cells by activating on ionotropic (GABA_A) and/or metabotropic (GABA_B) receptors. The GABA_A receptor is comprised by 19 subunits, among which are included the $\text{GABA}_{\rho 1-3}$ subunits. The GABA_{ρ} subunits form functional homomeric receptors in retinal bipolar neurons and in heterologous expression systems, and functional heteromeric receptors in cerebellar Purkinje neurons and hippocampal neurons. On the other hand, the expression of GABA_{ρ} in glial cells has not been explored. Recent data from our group showed the expression of $\text{GABA}_{\rho 1}$ and $\text{GABA}_{\rho 2}$ in glial fibrillary acidic protein positive (GFAP+) cells located in the cerebellar subventricular zone that faces the fourth ventricle. The purpose of this work was to determine if the cerebellar astrocytes in culture express the GABA_{ρ} receptors. Therefore different studies were performed: 1) RT-PCRs to determine the expression of GABA_{ρ} receptors mRNAs; 2) Immunofluorescence using antibodies against $\rho 1$ and $\rho 2$ and 3) whole cell patch clamp to define the electrophysiological properties of GABA receptors in glial cells. RT-PCR disclosed the expression of $\text{GABA}_{\rho 1}$ and $\text{GABA}_{\rho 2}$ mRNAs in astrocytes in culture; while the immunofluorescence revealed that the $91.0 \pm 7.7\%$ of cultured cells are GFAP+, and $\text{GABA}_{\rho 1}$ and $\text{GABA}_{\rho 2}$ were present in $60.0 \pm 6.8\%$ and $70.0 \pm 4.9\%$ of these cells, respectively. Electrophysiological results indicate that GABA evoked currents with an $\text{EC}_{50} = 52.2 \pm 11.8 \mu\text{M}$. These responses were antagonized by bicuculine [$100 \mu\text{M}$; $90.5 \pm 3.7\%$], picrotoxin [$100 \mu\text{M}$; $69.9 \pm 8.6\%$] and TPMPA [$100 \mu\text{M}$; $81.1 \pm 5.9\%$]. Since TPMPA is a specific antagonist of GABA_{ρ} subunits a dose response curve was performed and an IC_{50} of $5.9 \pm 0.6 \mu\text{M}$ was estimated. Based on these data, we concluded that GABA_{ρ} forms part of the functional GABA_A receptors expressed in astrocytes.

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A la **UNIVERSIDA AUTÓNOMA DE MÉXICO** por aceptarme en su programa de Maestría en Ciencias (Neurobiología).

Al Dr. Ataúlfo Martínez Torres, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por sus valiosos consejos para llevar a cabo este proyecto y por toda su paciencia. Totalmente agradecida.

Al Dr. Daniel Reyes Haro, por el apoyo y la ayuda brindada para sacar el proyecto adelante.

Al Dr. Lenin David Ochoa de la Paz y al Dr. Rogelio Arellano Ostoá, por su ayuda y enseñanza.

A la Técnico Académico M. en C. Ángeles Edith Espino Saldaña, por su valiosa ayuda durante la elaboración de este proyecto.

Al Auxiliar de Laboratorio Efrén Ruíz Alcibar por tener siempre tan buena disposición para ayudar.

A mis compañeros del laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular II: Abraham Rosas Arellano, Alejandra González González, Ana Patricia Juárez Mercado, Argel Raúl Estrada Mondragón, Arturo Israel Machuca Parra, Elizabeth Cabrera Ruiz, Ernesto Mora Loyola, Fernando Rosas Sánchez, Gustavo Martínez Delgado, Jazmín Castellanos González, Miriam Edith Amaro Lara, Teresa Leija... ¡Gracias!

Al personal académico, por el gran compromiso que tienen por enseñar y ser fuente de motivación durante la maestría, en especial a los Doctores: Alfredo Varela, Francisco Vázquez, Rogelio Arellano, Gerardo Piloni, Jorge Larriva, Gonzalo Martínez, Edith Garay y Carlos Saldaña.

A mi Comité Tutoral, al Dr. Alfredo Varela Echavarría y al Dr. Francisco G. Vázquez Cuevas por sus valiosos comentarios y sugerencias en cada uno de los tutorales.

A mi Jurado de Examen.

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera, Dr. Daniel Reyes Haro, Dra. Elvira Galarraga Palacio, Dr. Francisco G. Vazquez Cuevas, Dr. Gerardo Rojas Piloni.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Becario No. 334709

A la Unidad de Proteogenómica.
Dra. Anaid Antaramian Salas

A la Unidad de Microscopía.
ISC. Elsa Nydia Hernández Ríos

A la Unidad de Enseñanza.
M. en C. Leonor Casanova Rico

Al bioterio.
MVZ. José Martín García Servín.

A la unidad de videoconferencias.
Psic. Ma. de Lourdes Lara Ayala.

A la Biblioteca.
Dr. Francisco Javier Valles Valenzuela
Bib. Teresita de Jesús Pérez Cruz
MVZ Román Pacheco Barrita

DEDICATORIAS

A:

Mis padres Ma. Inés Reyes Pérez “María” y José Manuel Pétriz Guillén “Pétriz”, por la vida, el amor y el apoyo brindado siempre.

Mi hermana Viridiana Pétriz Reyes “Gusana”, por ser mi compañera en la vida, por ser mi mejor amiga y por todo el apoyo y confianza que me das.

“Socorro” mi abuelita, por todo el amor y cariño brindado.

Mis abuelitos “Paco y Flor” que se nos adelantaron en el camino, pero que siguen presenten.

Los queridos amigos y compañeros: Laura Briones, Sandra Mora, José Antonio Díaz, Florencia Muñoz, Ximena Rosas, Magali León, Alejandra González, Jazmín Castellanos, Teresa Leija, Miriam Amaro, Patricia Juárez, Argel Estrada, Edith Espino, Abraham Rosas, Arturo Machuca, Fernando Rosas, Efrén Ruiz, por su amistad y valiosos consejos.

Abraham Nequiz Ruiz “Oses”: por el gran apoyo que siempre me brindas y por el amor que me das.

Todos.....no lo hubiera logrado sin ustedes.

ÍNDICE

RESUMEN EN ESPAÑOL	<i>i</i>
ABSTRACT	<i>ii</i>
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Cerebelo: organización y composición celular.</i>	1
1.2. <i>Acido γ-aminobutírico.</i>	2
1.3. <i>Receptores de GABA.</i>	4
1.3.1. <i>Receptores GABA_A.</i>	5
1.3.1.1. <i>Receptores GABA_A en el cerebelo.</i>	6
1.3.2. <i>Receptores GABA_{ρ}.</i>	7
1.3.2.1. <i>Características farmacológicas del receptor GABA_{ρ}.</i>	9
1.3.2.2. <i>Importancia fisiológica de los receptores GABA_{ρ}.</i>	11
2. ANTECEDENTES	13
2.1. <i>Distribución de GABA_{ρ} en el Sistema Nervioso Central (SNC).</i>	13
2.2. <i>Receptores GABA_A en células gliales.</i>	15
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVOS	18
5.1. <i>Objetivo general.</i>	18

5.2.	<i>Objetivos específicos.</i>	18
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	19
6.1.	<i>Cultivos primarios de astrocitos.</i>	19
6.2.	<i>Extracción de RNA y RT-PCR.</i>	19
6.3.	<i>Doble inmunocitofluorescencia.</i>	20
6.4.	<i>Registros electrofisiológicos.</i>	21
7.	RESULTADOS	24
7.1.	<i>Características de los astrocitos en cultivo.</i>	24
7.2.	<i>Expresión de GABAρ1 y GABAρ2 en astrocitos en cultivo.</i>	25
7.3.	<i>Distribución de GABAρ1 en cultivos primarios de astrocitos.</i>	25
7.4.	<i>Distribución de GABAρ2 en cultivos primarios de astrocitos.</i>	27
7.5.	<i>Propiedades electrofisiológicas de receptores a GABA de los astrocitos en cultivo.</i>	29
7.5.1.	<i>Corrientes dependientes de voltaje en astrocitos en cultivo.</i>	29
7.5.2.	<i>Respuestas mediadas por GABA en astrocitos en cultivo.</i>	31
7.5.3.	<i>Estimación de la desensibilización de los receptores GABA$_A$ expresados en astrocitos en cultivo.</i>	32
7.5.4.	<i>Caracterización farmacológica de los receptores a GABA en astrocitos en cultivo.</i>	33
7.5.5.	<i>Curva de inhibición dosis-respuesta del TPMPA sobre las respuestas de GABA (50μM).</i>	35
8.	DISCUSIÓN	37

9.	CONCLUSIONES	42
10.	REFERENCIAS	43
11.	LISTA DE FIGURAS	67
12.	LISTA DE TABLAS	68
13.	INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA	69

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Cerebelo: organización y composición celular.*

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 motoras, el comportamiento emocional y el aprendizaje (Koziol et al., 2011., Strata et al., 2011). Controla el mantenimiento del equilibrio, influye en la postura y tono muscular y coordina el movimiento (Crossman et al., 2007).

El cerebelo está constituido básicamente de una capa externa de sustancia gris, la corteza cerebelosa, y un núcleo interno de sustancia blanca. La corteza cerebelosa está muy plegada, por lo que forma numerosas láminas orientadas transversalmente. Esta, se conforma por varios tipos de neuronas: las células granulares, las células de Purkinje, las células de Golgi y las células en cesto. (Voogd y Glickstei, 2011). En el adulto, estos tipos celulares forman conexiones estereotipadas organizadas en tres capas laminadas: 1) una capa externa rica en fibras denominada capa molecular, 2) una capa intermedia que contiene a las células de Purkinje y 3) una capa interna llamada capa granular (Crossman et al., 2007).

En la capa intermedia, cubriendo las células de Purkinje, se localiza la glía de Bergmann, un tipo de glía radial altamente especializado. Cada una de estas células envuelve entre 2000 y 8000 contactos sinápticos (Verkhatsky, 2008). El cerebelo contiene gran cantidad de astrocitos, los cuales se distribuyen principalmente en la capa granular y en la sustancia blanca (Tanaka et al., 2008).

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

1.2. Ácido γ -aminobutírico.

El ácido γ -aminobutírico (GABA) y la glicina son los neurotransmisores más importantes en el sistema nervioso central (SNC) (Bennett y Balcar, 1999). El GABA tiene como principal precursor al ácido L-glutámico, aunque no es el único, ya que también puede sintetizarse a partir de piruvato y de distintos aminoácidos. El primer paso en la síntesis de GABA está mediado por la enzima GABA α -cetoglutarato transaminasa (GABA-T), la cual cataliza la conversión del α -cetoglutarato proveniente del metabolismo de la glucosa en el ciclo de Krebs, en ácido L-glutámico (Siegel, 2006) (Fig. 1). Posteriormente el GABA es sintetizado por la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD), la cual presenta dos isoformas GAD65 y GAD67. Ambas isoformas se encuentran presentes en la mayoría de las neuronas GABAérgicas del SNC, sin embargo GAD65 parece estar unida a la membrana y en las terminales nerviosas, mientras que GAD67 se encuentra ampliamente distribuida en la célula. Además, GAD67 sintetiza preferentemente GABA citoplasmático mientras que GAD65 sintetiza el GABA para la liberación vesicular hacia la hendidura sináptica. (Soghomonian y Martin, 1998).

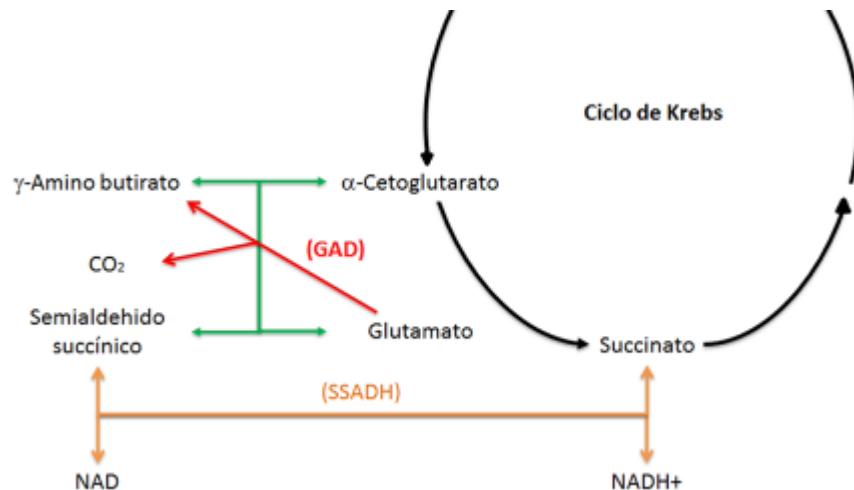


Figura 1. Vías de síntesis de GABA.

La liberación de GABA hacia la hendidura sináptica se puede efectuar por dos mecanismos: el primero es rápido y transitorio, el segundo es tónico. La liberación rápida surge de la activación de mecanismos de exocitosis dependientes de $[Ca^{2+}]$ estimulados por despolarización neuronal; mientras que la liberación tónica se presenta debido a la activación del canal iónico Best1, inducida por cambios en el volumen celular (Lee, 2010), y en neuroblastos, debido a la activación reversa del transportador de GABA tipo 1 (GAT1) (Platel et al., 2008). Cualquiera que sea el mecanismo de liberación, el GABA se difunde hacia los receptores que se encuentran localizados en la membrana de la célula postsináptica. La acción del GABA en la sinapsis concluye con su recaptura, la cual se lleva a cabo gracias a la acción de los transportadores de GABA, que se expresan tanto en la neurona presináptica como en las células gliales que la rodean (Siegel, 2006), y de los cuales existen cuatro tipos, GAT1 a GAT4 (Borden, 1996). La translocación de una molécula de GABA por estas proteínas requiere el transporte simultáneo de dos moléculas de Na^+ y una de Cl^- (Verkhratsky, 2007) (Fig. 2).

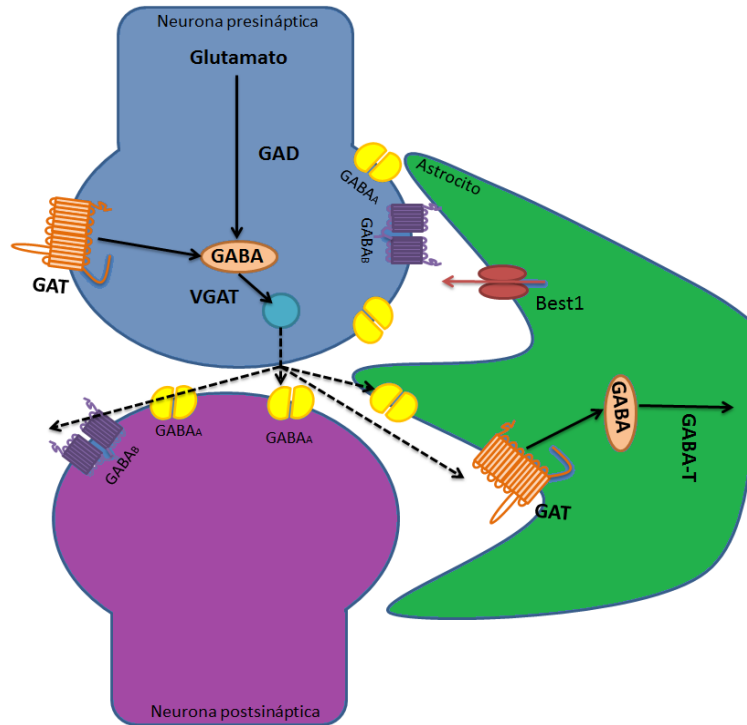


Figura 2. Diagrama de la síntesis y transporte de GABA en la sinapsis. El GABA es sintetizado a partir de glutamato por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), es transportado hacia el interior de vesículas a través del transportador del neurotransmisor vesicular (VGAT). El GABA puede ser liberado vesiculado o no-vesiculado (vía Best1). Los receptores GABA se encuentran localizados en la pre y la postsinápsis. 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 tanto en las neuronas como en las células gliales. En azul: neurona presináptica; en morado: neurona postsináptica y en verde: astrocito.

1.3. Receptores a GABA.

El GABA ejerce su acción al activar receptores de tipo ionotrópico o metabotrópico. Los receptores GABA_A son ionotrópicos mientras que los receptores GABA_B 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 estos últimos son: el sistema de adenilato ciclasa y los canales de Ca²⁺ y K⁺ (Hill et al., 1984; Karbon et al., 1984; Hirst et al., 2000; Inoue et al., 1985; Andrade et al., 1986; Xu y Wojcik, 1986;

Dolphin et al., 1990; Bindokas e Ishida, 1991; Gage, 1992). La actividad de los receptores GABA_B está mediada por la activación de proteínas G pertenecientes a la familia de las proteínas sensibles a la toxina pertussis G_{iα}/G_{oα}, en particular G_{i2α} (Odagaki et al., 2000; Odagaki y Koyama, 2001), que actúan sobre un sistema de segundos mensajeros intracelulares. Los receptores GABA_B son activados de manera selectiva por baclofeno y son insensibles a los moduladores (como las benzodiazepinas) y antagonistas del receptor GABA_A (Bowery, 1989).

1.3.1. Receptores GABA_A.

Los receptores GABA_A, 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, γ 1-3, δ , ϵ , ρ 1-3, θ , π) (Olsen et al., 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 contiene un extremo amino-terminal extracelular de aproximadamente 200 aminoácidos, cuatro regiones transmembranales y un carboxilo-terminal extracelular, el cual es más largo y variante en su composición de aminoácidos que el N-terminal (Brejc et al., 2001; Le Novère y Changeux, 1999; Tasneem et al., 2005; Tsang et al., 2007). Al ensamblarse, dichas subunidades forman un canal que permite el flujo de iones de cloro en respuesta a la unión de GABA (Bormann, 2000).

Los receptores GABA_A son modulados por los barbitúricos, las benzodiazepinas, los neuroesteroides y el etanol (Bormann, 1988; Doble et al., 1992; Mcdonald et al., 1994), y son antagonizados por los 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 et al., 1998).

Mediante técnicas de inmunohistoquímica y de inmunoprecipitación se ha demostrado que la combinación de las subunidades $\alpha 1$ $\beta 2$ $\gamma 2$ es la más común en el cerebro de mamíferos (McKernan et al., 1996). También se ha encontrado que la subunidad $\gamma 2$ puede formar homómeros funcionales en un sistema heterólogo (Matinez-Torres y Miledi 2004), y que esta subunidad es necesaria para la formación del sitio de unión a benzodiazepinas. Sin embargo, la subunidad $\gamma 2$ no es necesaria para el ensamble de receptores funcionales, ni para que se efectúe el transporte e inserción en la membrana plasmática (Connolly et al., 1996; Connolly et al., 1999; Sontheimer et al., 1989).

1.3.1.1. Receptores GABA_A en el cerebelo.

En el cerebelo se han identificado 16 de las subunidades del receptor GABA_A (α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ y ρ 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).

Durante el desarrollo del cerebelo existe una expresión diferencial de las subunidades que conforman el receptor, por ejemplo, en el ratón las subunidades $\alpha 2$ y $\alpha 3$ son expresadas antes de que las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 6$ aparezcan (Takayama e Inoue, 2004a). La expresión del transcrito de las subunidades $\alpha 2$ aparece primero en zonas diferenciadas a partir del día embrionario 13 (E13), y para el día E14 la proteína $\alpha 2$ se localiza en las células granulares en migración y diferenciadas y en las células de los núcleos cerebelosos, mientras que la subunidad $\alpha 3$, se presenta en las células de Purkinje en desarrollo al igual que en las neuronas de los núcleos cerebelosos y desaparece de las células de Purkinje al final de la primer semana postnatal (Takayama e Inoue, 2004b). Referente a las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 6$, ambas se expresan a partir del día E19 y se encuentran al momento del nacimiento. Sin embargo la expresión de la subunidad $\alpha 1$ comienza a disminuir entre el día postnatal 14 (P14) y el P21 (Poulter et

al., 1992), mientras que el pico más alto de la expresión de la subunidad $\alpha 6$ se encuentra en el día P21. La expresión temporal de estas dos subunidades coinciden con la formación de los contactos sinápticos en las dendritas de las células granulares, lo que sugiere que la inervación aferente de estas neuronas está relacionada con el incremento en la expresión de estas subunidades (Zheng et al., 1993).

Por otra parte, en las células granulares la subunidad $\alpha 6$ participa en la expresión de las subunidades δ . Se ha visto que al suprimir la expresión de $\alpha 6$, las subunidades δ no se expresan. Por tanto $\alpha 6$ influye en el ensamble de los receptores GABA_A conformado por las subunidades $\alpha 1\beta 1\gamma 2\delta$, $\alpha 4\beta 1\gamma 2\delta$ y $\alpha 6\beta 1\gamma 2\delta$, así como en la farmacología de los receptores GABA_A. Lo anterior sugiere la existencia de mecanismos selectivos para el ensamblaje de los receptores GABA_A (Hevers et al., 2000; Lüddens et al., 1990).

También existen estudios sobre las diversas subunidades de los receptores GABA_A presentes en los astrocitos cerebelosos, los cuales indican que a excepción de las subunidades $\alpha 6$ y $\gamma 2$, todas las demás subunidades presentes en las células granulares, se localizan en los astrocitos. Además las células granulares expresan en mayor proporción las subunidades $\alpha 1$, $\alpha 5$ y $\alpha 6$, mientras que en los astrocitos las subunidades $\alpha 1$ y $\alpha 2$ son las más abundantes (Bovolin, 1992).

Estos estudios proporcionan las bases de que existen cambios en la expresión y composición de los receptores GABA_A en la glía, los cuales han sido poco estudiados tanto *in vitro* como *in situ* (Tateishi, 2006).

1.3.2. Receptor GABA_p

Los receptores GABA_p se encuentran clasificados dentro de los receptores GABA_A, son selectivos al ión cloro y se expresan en varias partes del cerebro de vertebrados. Fueron originalmente descritos en interneuronas de la médula espinal de gato. Proponiendo la existencia de diferentes conformaciones de los receptores GABA_A,

basándose en las diferencia 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).

La caracterización funcional de los receptores GABA ρ se realizó utilizando ovocitos de *Xenopus laevis*, a los cuales se les inyectó mRNA aislado del cerebro de mamífero o de la retina. Los ovocitos inyectados con el mRNA de la corteza cerebral presentaron respuestas características a GABA $_A$, es decir corrientes rápidas transitorias provocadas por la desensibilización que presentan los receptores al ser activados por su agonista. Por otra parte, los ovocitos inyectados con el mRNA de la retina presentaron respuestas con una activación rápida e inactivación lenta, insensibles a bicuculina y baclofeno, antagonistas de los receptores GABA $_A$ y GABA $_B$ respectivamente, y no presentaron modulación por barbitúricos y benzodiazepinas (Polenzani et al., 1991; Woodward et al., 1992; Woodward et al., 1993). Estos estudios permitieron concluir que en la retina se expresa un receptor funcional a GABA diferente a los receptores GABA $_A$ y GABA $_B$.

La primer subunidad clonada de los receptores GABA ρ se obtuvo de una biblioteca de cDNA de retina (Cutting et al., 1991). Se sabe que dichos receptores están conformados por las subunidades $\rho 1$, $\rho 2$ y $\rho 3$, las cuales se pueden ensamblar como homo o heteropentámeros (Ogurusu et al., 1997; Shingai et al., 1996; Wang et al., 1994). Cada una de estas subunidades posee cuatro dominios transmembranales (TM) (Fig. 3B), un pequeño dominio C-terminal extracelular y un dominio N-terminal extracelular largo que contiene dos residuos de cisteína, los cuales forman un puente disulfuro. El dominio extracelular constituye el sitio de unión a GABA formado por la interfaz entre dos subunidades vecinas. El dominio TM2 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 $^-$ en el centro del receptor (Fig.3A). A pesar de que esta región presenta un alto grado de homología en todas las subunidades GABA ρ , existe una diferencia consistente en la posición 20, ya que mientras GABA $\rho 1$ presenta un residuo de prolina, en GABA $\rho 2$ encontramos un residuo de serina. Por otra

parte, para GABA ρ 3 no se conocen las diferencias aminoacídicas en esta posición. Las diferencias entre GABA ρ 1 y GABA ρ 2 influyen en la farmacología, selectividad, cinética del canal y conductancia del receptor (Estrada-Mondragón, 2010; Quian et al., 1999; Quian et al., 2008).

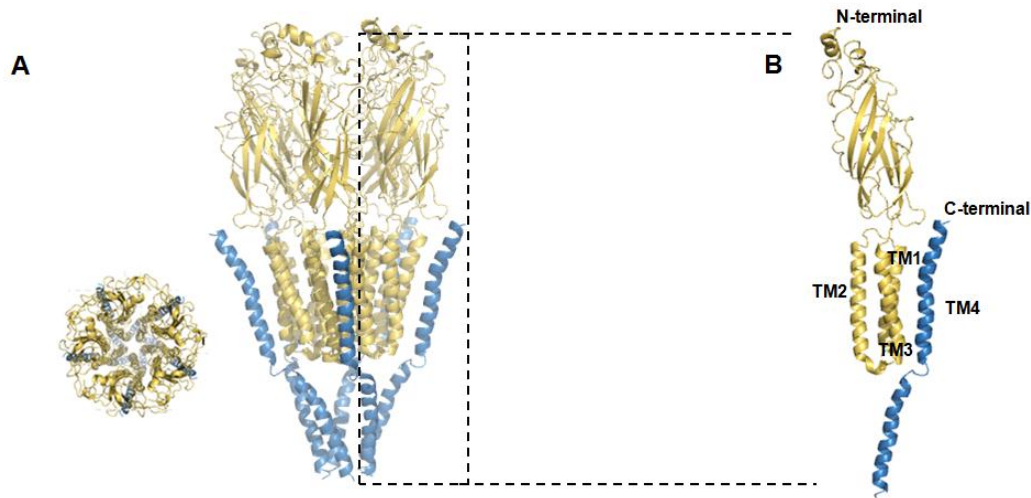


Figura 3. Modelo estructural de GABA ρ 1. **A.** Diagramas de cintas de las subunidades que conforman a GABA ρ 1 vistos en los planos del dominio extracelular y transmembranal, respectivamente (izquierda a derecha). **B.** Representación perpendicular a la membrana de una subunidad del receptor conformada por 4 pases transmembranales (TM1-TM4), el extremo amino terminal (N-terminal), el extremo carboxilo terminal (C-terminal), y un asa intracelular entre el TM3 y TM4 (modificado de Estrada-Mondragón, 2010).

1.3.2.1. Características farmacológicas del Receptor GABA ρ

Los receptores GABA ρ poseen una sensibilidad a GABA 10 veces mayor que la de los receptores GABA $_A$ (Qian et al., 1993; Woodward et al., 1992, Woodward et al., 1993). Los receptores GABA ρ 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 $_A$ (Feigenspan et al., 1993; Feigenspan y Bormann, 1994). Además los receptores GABA ρ presentan un perfil farmacológico particular: son insensibles a la bicuculina, (antagonista del receptor GABA $_A$) y no son activados por baclofeno (agonista del receptor GABA $_B$). Los moduladores del receptor GABA $_A$ como

los barbitúricos y las benzodiazepinas, no tienen efecto sobre los receptores GABA_ρ, mientras algunos neuroesteroides como: alotetrahydrodeoxicorticosterona, alfaxalona, alopregnanolona, pregnanolona, 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_ρ, 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-amidinotiopropanoico son antagonistas débiles del receptor GABA_ρ. Mientras que el ácido 1, 2, 5, 6-tetrahidropiridin-4-metilsulfínico (TPMPA) y ácido acético 4-imidazol lo antagonizan fuertemente (Ragozzino et al., 1996). Finalmente, las respuestas a GABA también son inhibidas por el ión zinc en los receptores GABA_{ρ1} homoméricos (Tabla.1) (Calvo et al., 1994).

Tabla 1. Propiedades funcionales y farmacológicas de los receptores ionotrópicos GABA_A y GABA_ρ.

	GABA _A	GABA _ρ
Consecuencia de la activación	Paso de Cl ⁻	Paso de Cl ⁻
Subunidades	α, β, γ, δ, ε, π y θ	ρ1, ρ2 y ρ3
Agonistas	Muscimol, glicina, TACA, isoguvacina, I4AA, THIP, Zolpidem, TAMP, CACA.	TACA, CACA, glicina β-alanina, CAMP, 5-Me-IAA, TAMP, muscimol.
Antagonistas	Bicuculina y Picrotoxina	TPMPA, P4MPA, 3-APA y 3-APMPA, I4AA, Isoguvacina, P4S, THIP, Zinc, picrotoxina.
Tiempo medio de apertura	25 A 30 ms	150 a 200 ms
GABA EC ₅₀	5-100 μM	1-4 μM
Coeficiente Hill	2	1.8
Tamaño del poro	5.6 Å	5.1 Å

(Bormann, 2000; Enna et al., 1997; Johnston et al., 2010).

1.3.2.2. **Importancia fisiológica de los receptores GABA_ρ**

Los receptores GABA_ρ se han estudiado principalmente en la retina, ya que es ahí donde se expresan predominantemente, específicamente en neuronas bipolares. Utilizando ratones *Knock out* para GABA_ρ1 (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_ρ. Esta inhibición es la encargada de regular la excitabilidad de las células ganglionares. Lo anterior se demostró, ya que al eliminar la expresión del receptor se produce la reducción y la disminución de las corrientes activadas por GABA y de las corrientes sinápticas inhibitorias evocadas con estímulos luminosos (L-IPSCs). Esto sugiere que GABA_ρ 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 ρ participan en la modulación de la transmisión de señales entre las neuronas bipolares y ganglionares (Luckasiewicz, et al., 1994; Luckasiewicz, et al., 1998; Luckasiewicz, et al., 2004).

En el cerebelo los receptores a GABA que incluyen la subunidad GABA ρ 1, están asociados a canales iónicos constitutivamente abiertos, por lo que, probablemente tengan una posible contribución en la inhibición tónica GABAérgica. Lo anterior fue propuesto tras evaluar la inhibición con TPMPA, de las corrientes tónicas de las células de Purkinje (Harvey et al., 2006).

2. ANTECEDENTES

2.1. *Distribución de GABA ρ en el sistema nervioso central (SNC).*

A pesar de que los receptores GABA ρ son expresados predominantemente en la retina, también han sido identificados en otras partes del SNC (Enz y Cutting, 1999), mediante técnicas como “*Northern blot*”, “*Western blot*”, hibridación *in situ*, inmunohistoquímica y ensayos de RT-PCR. En conjunto estos estudios demostraron la expresión de GABA ρ en la corteza (Wegelius et al., 1998), los colículos superiores (Boue-Grabot et al., 1998), la médula espinal (Rozzo et al., 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, el puente (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., 2003; Mejía et al., 2008).

Diversos estudios en el cerebelo de bovino y de roedores reportaron la expresión de GABA ρ 1 y GABA ρ 2 en las neuronas en canasta, de Golgi y de Purkinje (Harvey et al., 2003; López-Chávez et al., 2005; Mejía et al., 2008; Rosas-Arellano et al., 2007; Rozzo et al., 2002). Adicionalmente, existen datos que evidencian la expresión diferencial de los receptores GABA ρ en el cerebelo durante el desarrollo. Mientras la expresión de GABA ρ 1 y GABA ρ 2 permanece constante, la expresión de GABA ρ 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).

La acción moduladora sobre la excitabilidad neuronal y la liberación de neurotransmisores que tiene la expresión de los receptores GABA $_A$ y GABA $_B$ en las neuronas de Purkinje y Golgi está muy bien documentada, sin embargo poco se sabe sobre el papel que juegan los receptores GABA ρ en los circuitos de la corteza cerebelosa (Mejía et al., 2008). En este sentido, Harvey y colaboradores (2006) encontraron una población de células de Purkinje que expresan receptores a GABA que

presentan una mezcla de las características farmacológicas de los receptores GABA_A clásicos y los GABA_ρ, lo que sugiere la participación de receptores heteropentaméricos en la inhibición de la sinapsis entre interneuronas y las células de Purkinje.

Por otra parte, las células de Purkinje que expresan GABA_ρ (Fig. 4) (Harvey et al., 2006., Rosas-Arellano, Tesis en Proceso) se encuentran en contacto estrecho con la glía de Bergmann. Estas células expresan receptores GABA_A y el transportador GAT1 (Barakat y Bordey, 2002., Riquelme et al., 2006), lo que sugiere que la transmisión GABAérgica es clave en la fisiología de estos tipos celulares y para el correcto funcionamiento del cerebelo.

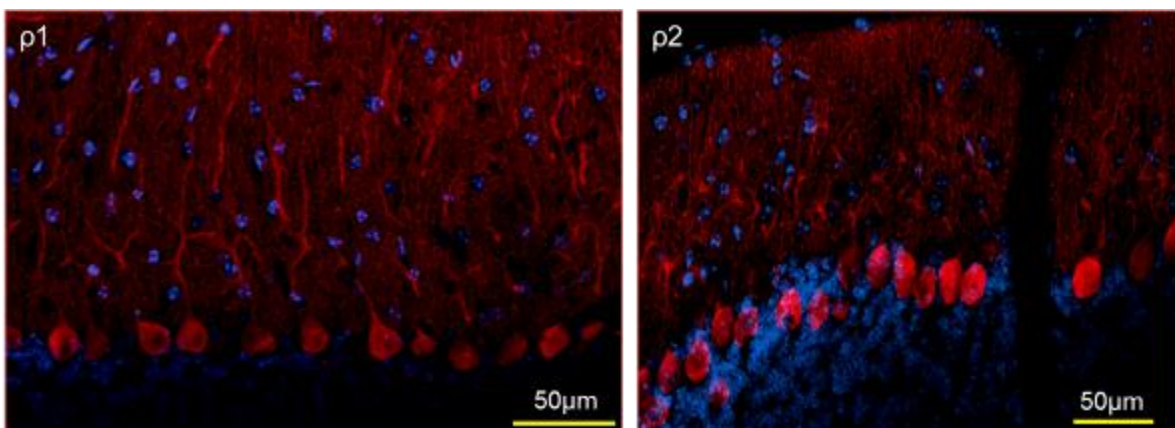


Figura 4. Expresión de GABA_ρ1 y GABA_ρ2 en neuronas de Purkinje del cerebelo de ratón adulto. Distribución de GABA_ρ1 y GABA_ρ2 en somas y árboles dendríticos de las neuronas de Purkinje. (tomada de Rosas Arellano, en proceso).

Al igual que otras células gliales, la glía de Bergmann, que es considerada un tipo de astrocito especializado, participa en la modulación de la transmisión química mediada por neurotransmisores. (Hoogland y Kuhn, 2010., López-Juarez, 2008).

2.2. Receptores GABA_A en células gliales.

Se sabe que los receptores GABA_A son expresados en la glía de Bergmann y en otros tipos de células gliales de diferentes regiones del cerebro (Verkhratsky, 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_A 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).

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 Kettenman, 1988; Kettenmann et al., 1984; Kettenmann y Schachner, 1985). Las propiedades de los receptores GABA_A expresados en la glía no son muy distintas de aquellas observadas en las neuronas: en esencia son canales iónicos dependientes de ligando, permeables a cloro y son modulados por benzodiazepinas. Sin embargo, funcionalmente existe una diferencia, ya que las células gliales contienen mucho más Cl⁻ que las neuronas (35mM vs. ~3-5mM). Además el potencial de equilibrio para el Cl⁻ en astrocitos es cercano a -40mV, mientras que en neuronas es de -70mV. Como consecuencia, la activación de los receptores GABA_A en células gliales incrementa el flujo de iones Cl⁻ e inhibe los canales de K⁺, por tanto genera la despolarización de la célula (Verkhratsky, 2008).

Varios estudios han mostrado la expresión funcional de los receptores GABA_A en la glía. Sin embargo se desconoce si la subunidad GABA_ρ participa en estas respuestas. Recientemente estudios de RT-PCR e hibridación *in situ* realizados por nuestro grupo indican la expresión de GABA_ρ1 y GABA_ρ2 en astrocitos de la zona subventricular del cuarto ventrículo (Fig. 5) (Martínez-Delgado et al., 2011). La expresión de GABA_ρ en células gliales podría conferirles propiedades funcionales únicas. Por ello, como objetivo del presente estudio se planteó demostrar la expresión funcional de GABA_ρ en los cultivos primarios de astrocitos

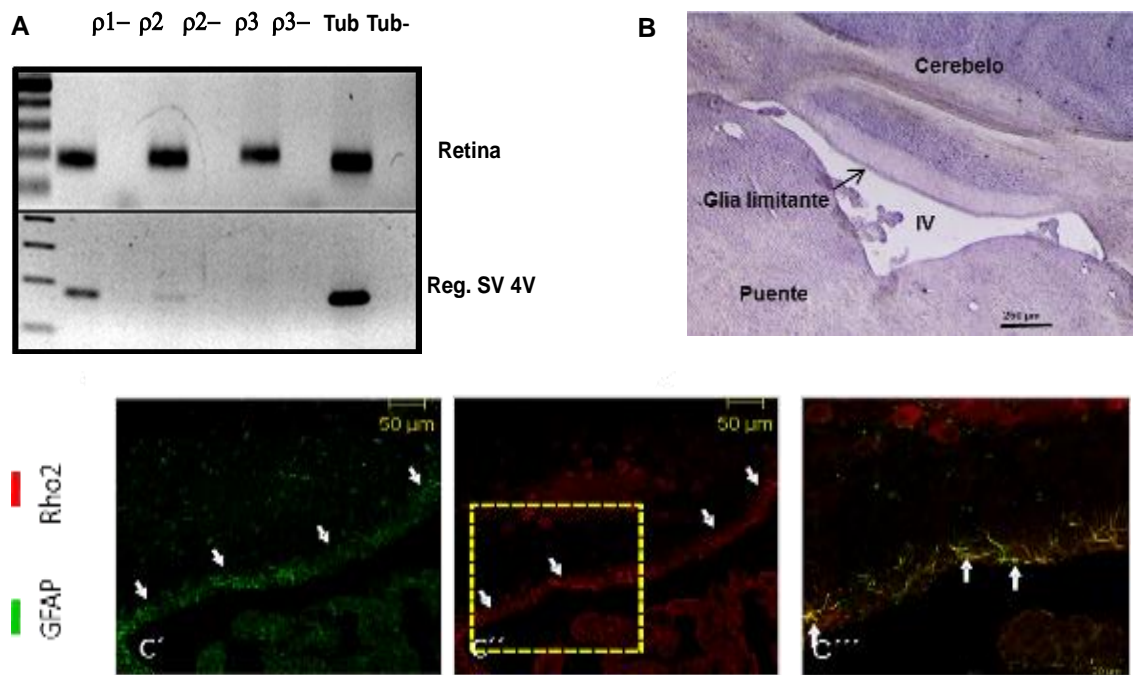


Figura 5. Expresión de GABA ρ en células gliales del cerebelo. **A.** Estudios de RT-PCR que indican la expresión de GABA ρ 1 y GABA ρ 2 en la zona subventricular. **B.** Expresión de GABA ρ 1 en la glía limitante determinada mediante la técnica de hibridación in situ. **C.** Localización de GABA ρ 2 en glía limitante mediante inmunocitoquímica; **C'**. Localización de células inmunoreactivas a GFAP (**C'**). **C'''**. Empalme de las señales GABA ρ y GFAP. Abreviaciones: 4V: cuarto ventrículo (tomado de Gonzáles-Gonzáles y Rosas-Arellano, tesis en proceso).

3. JUSTIFICACIÓN

La transmisión GABAérgica es clave en el cerebelo. Existen varios reportes sobre la expresión de receptor GABA_A, los cuales incluyen a las subunidades GABA_ρ en las neuronas en cesta, de Golgi y de Purkinje (Harvey et al., 2003; López-Chávez et al., 2005; Rosas-Arellano et al., 2007; Rozzo et al., 2002, Mejía et al., 2008). Adicionalmente, se sabe de la expresión de receptores GABA_A en las células gliales, en cultivos primarios (*in vitro*) y en la glía de Bergmann (*in situ*) (Bovolin et al., 1992; Müller et al., 1994). Esto sugiere que la glía participa en esta transmisión GABAérgica.

En los astrocitos, la activación de los receptores GABA_A produce despolarizaciones (Kettenmann et al., 1984., Kettenmann y Schachner, 1985) y las corrientes mediadas por la activación de dichos receptores, presentan conductancias y cinéticas de activación similares a aquellas generadas en neuronas, pero con diferencias en la modulación farmacológica (Bormann and Kettenmann 1988; Rosewater and Sontheimer 1994). Lo anterior, sugiere que los receptores GABA_A en astrocitos están conformados por una composición específica de subunidades. Aunque, esta composición no ha sido completamente identificada, estudios de RT-PCR e inmunofluorescencia sugieren la presencia de varias subunidades del receptor ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\gamma 1$, entre otras) en astrocitos de cerebelo (Bovolin et al., 1992).

El papel funcional de la activación de los receptores GABA_A en astrocitos, no se conoce del todo. Se sugiere que la despolarización causada por la activación de estos receptores, activa canales de calcio dependientes de voltaje y propicia un aumento en los niveles de Ca²⁺ intracelular (Bernstein et al., 1996; Fraser et al., 1995; Meier et al., 2008; Nilsson et al., 1993). Debido a que estas señales de Ca²⁺ representan la forma de excitabilidad usada por los astrocitos para integrar 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 M. et al., 2011).

Debido a la gran cantidad de astrocitos presentes en cerebelo, a la importancia de la transmisión GABAérgica en esta zona y con el fin de contribuir en el entendimiento de la función de los receptores ionotrópicos en las células gliales, este estudio abordó la expresión y funcionalidad de los receptores GABA_A en astrocitos en cultivo aislados de cerebelo de ratón.

Para alcanzar nuestros objetivos se aprovechó el potencial que ofrecen los astrocitos en cultivo, en los que se lograron estudiar las características electrofisiológicas y farmacológicas del receptor GABA_ρ *in vitro*.

4. HIPÓTESIS

Los cultivos primarios de astrocitos del cerebelo expresan receptores funcionales GABA_A que incluyen a GABA_ρ.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión, distribución y propiedades funcionales de los receptores GABA_ρ en cultivos primarios de astrocitos del cerebelo de ratón.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la expresión y distribución de los receptores GABA_ρ en los cultivos primarios de astrocitos de cerebelo de ratón.
2. Estudiar las propiedades electrofisiológicas de los receptores GABA_A expresados en los cultivos primarios de astrocitos y determinar si la subunidad GABA_ρ participa en las respuestas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. *Cultivos primarios de astrocitos.*

Los cultivos de astrocitos se realizaron con cerebelos de ratones CD1 de 5 días de edad postnatal. Los animales fueron sacrificados de acuerdo con las políticas éticas de la Universidad Autónoma de México, para la atención y manejo de los animales. Una vez diseccionado el cerebelo, se disociaron las células mecánicamente y se sembraron aproximadamente 200 000 células por caja Petri de 35mm. Las células disociadas crecieron en un medio de cultivo denominado Medio Dulbecco Modificado por Eagle (DMEM), suplementado con 10% de suero bovino fetal, 100UI/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomina. 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).

6.2. *Extracción de RNA y RT-PCR.*

El RNA total de retina 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 y posteriormente se realizó la transcripción reversa a cDNA utilizando la enzima *SuperScript™ II RNase H Reverse Transcriptase* (Invitrogen). Para realizar esta reacción se utilizaron dos mezclas; mezcla 1: 2µg del RNA total se mezcló con 1.5µl de 0.5 µg/µl de oligo dT (Invitrogen), 1µl de mezcla de dNTP [10mM] y agua. Mezcla 2: 4µl de solución de reacción 5X (250 mM, Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, pH 8.3), 2µl de DTT [0.1M] y 1µl de SuperScript II™. La mezcla 1 se calentó a 65°C por 5 minutos para desnaturalizar el RNA y posteriormente se colocó rápidamente en hielo, posteriormente se le añadió la mezcla 2 y se incubó a 42°C por 50 min. La reacción se inactivó incubando a 70°C por 15 min. La reacción de PCR se realizó de acuerdo a las especificaciones de fabricación (Invitrogen) usando los oligonucleótidos específicos para cada transcrito, diseñados flanqueando exones para evitar contaminación con DNA genómico: Tubulina (Tub), GABA_ρ1 (ρ1), GABA_ρ2 (ρ2) y

GFAP (Tabla 2). Las reacciones de PCR incluyen una mezcla de reacción 1X (20 mM Tris-HCl, pH 8.4, 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM mezcla de dNTP, 0.2 μM de cada oligo y 5U de la enzima Taq polimerasa. Todas las reacciones se realizaron a 94°C por 30 seg, 65°C por 30 seg y 72°C por 30 seg, en 35 ciclos, después se incubó a 94°C por 1 min y a 72° C por 5 min. Finalmente 2μl de cada reacción de PCR se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% (Rosas-Arellano et al., 2011).

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR

Gen	Oligo F	Oligo R	Productos
Tub	5'-gcctcccactgtggtacccg-3'	5'-ccctcctccatgccctcacc-3'	174pb
ρ1	5'-cgaggagcacacgacgatgcc-3'	5'-ctgcacatccacgcccacagg-3'	174pb
ρ2	5'-cctgatggctctcgtggagag-3'	5'-ccaaaggctggcctcatggtg-3'	197pb
GFAP	5'-agccagcagaggcagggcagg-3'	5'-tctctgcacgctcgctcgccc-3'	239pb

(Rosas-Arellano et al., 2011).

6.3. Doble Inmunofluorescencia.

Para la localización de GABA ρ 1 y GABA ρ 2 en astrocitos marcados con GFAP del cerebelo de ratón se realizó una doble inmunofluorescencia, utilizando la técnica descrita previamente (Rosas-Arellano et al., 2007) con algunas modificaciones. Las células se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos salina (0.1M PBS), se fijaron con paraformaldehído al 4% en 0.1M PBS, metanol y acetona, y se lavaron nuevamente en 0.1M PBS. Después de lavar con 0.5% Tween 20 en PBS (PBS-T), se bloquearon las uniones inespecíficas con solución bloqueadora de suero normal de burro (2% suero normal de burro, 0.1% albumina de suero bovino, 0.1% Triton y 0.05% Tween20 en PBS); luego se procedió a incubar las células por dos días a 4°C con el anticuerpo primario generado en cabra anti-GABA ρ 1 o anti-GABA ρ 2 (goat IgG anti-GABA ρ 1/ anti-GABA ρ 2, Santa Cruz Biotechnology), diluido en solución de incubación (0.05% timerosal y 0.1% Tween20 en PBS). Posteriormente las células fueron lavadas con PBS-T e incubadas toda la noche a 4°C con el anticuerpo secundario generado en burro conjugado con Alexa 488 (donkey anti-goat Alexa488 conjugated, Molecular

Probes). Después de ser lavadas con PBS-T, las células se incubaron a 4°C por dos días con el segundo anticuerpo primario generado en cabra (goat IgG anti- Glial Fibrillary Acidic Protein [GFAP], Santa Cruz Biotechnology). Nuevamente se lavaron las células con PBS-T y se incubaron por toda la noche con el segundo anticuerpo secundario generado en burro y conjugado con Alexa 594 (donkey anti-goat Alexa594 conjugated, Molecular Probes). Se realizó una contratinción con *4',6-Diamidino-2-phenylindole* (DAPI).

Finalmente las células se montaron en Vectashield H-1000 (Vector Laboratories), se observaron en microscopio confocal Zeiss LSM510 Meta; 561nm para excitar Alexa 594, 488nm para Alexa488 y 750nm para DAPI; y se analizaron con el procesador de imágenes *Aim Image Examiner* y con *Image J*.

Se utilizaron tres cultivos independientes y de cada uno se cuantificaron al azar 450 células. Del total de células se formaron tres grupos: 1) células GFAP⁺; 2) células GABA_ρ1 positivas y 3) células GABA_ρ2 positivas. Así mismo las células GFAP⁺ se subdividieron en 3 subgrupos: 1) células planas; 2) células con somas poligonales y 3) células estrelladas. Para cada grupo y subgrupo, se calculó en porcentaje con respecto al total de células cuantificadas, la media y el error estándar.

6.4. Registros electrofisiológicos.

Los registros se realizaron utilizando la técnica de fijación de voltaje en la configuración de la célula completa, con células cultivadas de cuatro a seis días. Para realizar el registro se colocó una fracción del cubre objetos (con una confluencia aproximada del 10% de astrocitos) y en la cámara de registro sobre la platina de un microscopio invertido. Las células se mantuvieron en perfusión continua con solución extracelular a pH 7.2 de composición (en mM) 150 NaCl, 5.4 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 5 HEPES y 10 glucosa. Se utilizaron capilares de borosilicato para obtener micropipetas de registro mismas que contienen una solución con la siguiente composición (en mM): 130 KCl, 0.5 CaCl₂, 5 EGTA, 2 MgCl₂, 10 HEPES, 3 ATP-Mg y 0.4 GTP-Na (pH=7.4).

Las células que presentaron morfología con algunos procesos fueron las elegidas para estudiar su respuesta a diferentes concentraciones de GABA y evaluar el efecto farmacológico del TPMPA [0, 5, 10, 50, 100, 250 μ M] y la picrotoxina [100 μ M].

Se evaluó la activación de corrientes dependientes de voltaje generadas con un protocolo de corrientes despolarizantes (-60 a 80mV con incrementos de 20mV) aplicadas después de dar un pulso hiperpolarizante de -110mV. De esta manera se evaluó la presencia de corrientes de K^+ dependientes de voltaje (Reyes-Haro et al., 2005).

Para conocer la ocurrencia de las corrientes de K^+ en los astrocitos en cultivo. El total de células registradas (n=60) se dividió en tres perfiles de corriente: 1) corriente con mayor componente de corriente K_A . 2) corriente tipo K_{DR} con componente de corriente K_A . 3) corriente tipo K_{DR} . Por cada perfil se calculó la media y el error estándar y se comparó con respecto al total de células registradas.

Para realizar la curva-dosis respuesta de GABA, se utilizaron diferentes concentraciones de GABA (10, 20, 30, 50, 100, 250 μ M). De cada una de ellas, se calculó el promedio y el error estándar de 5 amplitudes generadas por diferentes células.

Con el fin de determinar si los receptores a GABA en astrocitos sufren desensibilización. Se realizaron 5 aplicaciones repetidas del agonista. Posteriormente se analizaron las amplitudes de las corrientes (normalizadas con respecto a la primera aplicación) y se desarrolló un análisis de varianzas (ANOVA) de una vía para determinar si las disminuciones entre cada aplicación son significativamente diferentes. Para determinar hasta qué número de aplicación, la desensibilización es significativa, se realizó la prueba *post hoc*: LSD de Fisher ($p < 0.05$).

Finalmente, con el fin de determinar si las amplitudes de las amplitudes corriente generadas con los diferentes fármacos (bicuculina, TPMPA y picrotoxina) son diferentes

con respecto a las amplitudes de corriente generadas con GABA. Se implementó un ANOVA de una vía y un análisis post hoc de Dunnett ($p < 0.05$). Para cada fármaco se realizaron 6 experimentos independientes.

7. RESULTADOS

7.1. Características morfológicas de los astrocitos en cultivo.

En los cultivos primarios en los que se utilizó el medio DMEM se aprecian tres tipos de morfologías características de astrocitos en cultivo (Sontheimer et al., 1992):

a) astrocitos en forma plana sin procesos y somas alargados, representan el $50 \pm 4.9\%$ (media \pm error estándar de la media) de las células en cultivo (Fig. 6A); b) astrocitos aplanados con somas poligonales que presentan algunos procesos forman el $45 \pm 3.7\%$ (Fig. 6B); c) astrocitos con morfología estelar rodeados por numerosos procesos arborizados y somas pequeños y redondos son el $5 \pm 1.4\%$ de las células (Fig. 6C); $n = 450$ de 3 cultivos independientes (Fig. 6).

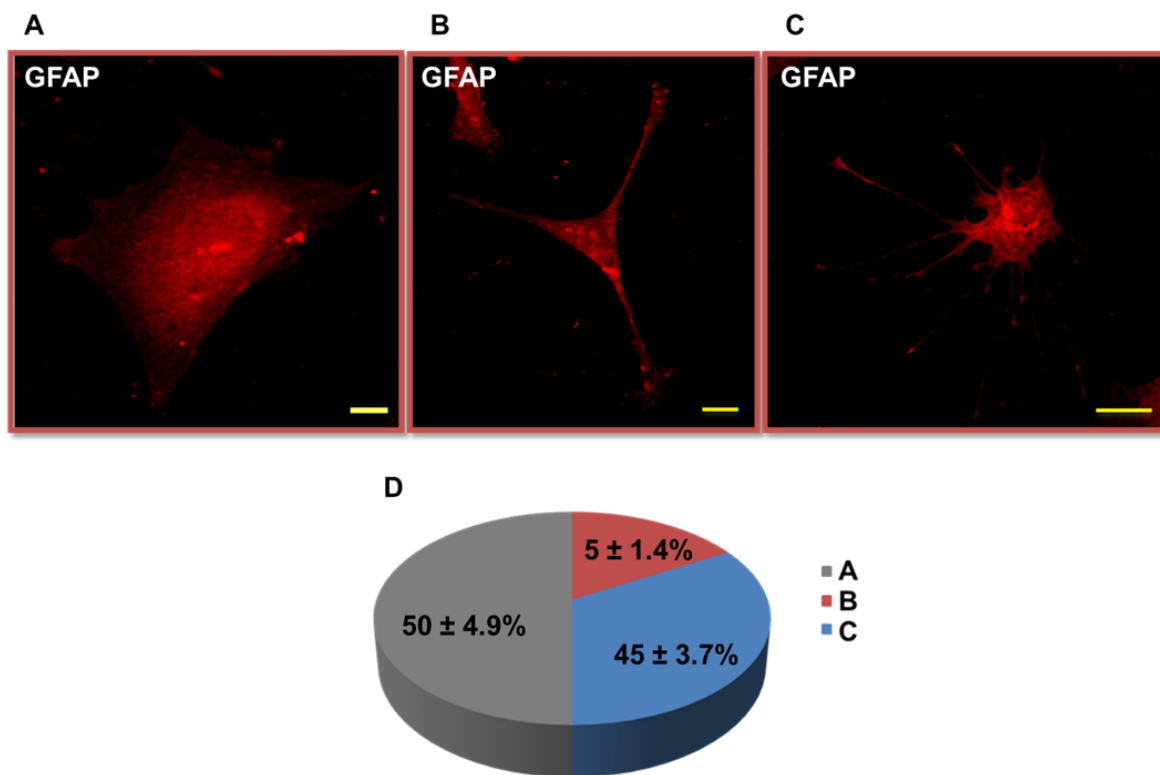


Figura 6. Morfología de astrocitos GFAP⁺ en cultivo con medio DMEM. **A.** Morfología plana, sin procesos y somas alargados. **B.** Astrocitos con somas poligonales y con pocos procesos. **C.** Astrocitos en forma estelar, ampliamente ramificados. **D.** Porcentaje de cada uno de los tipos de morfología de las células GFAP⁺ ($n = 450$ células de cada cultivo, en 3 cultivos independiente). Barras igual a 20 μ M.

7.2. Expresión de GABA ρ 1 y GABA ρ 2 en astrocitos en cultivo.

Se aisló el RNA al quinto día de cultivo (Fig. 7A). Posteriormente, utilizando la técnica de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) con oligonucleotidos específicos (Tabla 2), se determinó la expresión de los transcritos: GABA ρ 1, GABA ρ 2, GFAP y tubulina. Aunque esta técnica no es cuantitativa, los resultados indican una débil expresión de GABA ρ 1 y GABA ρ 2 en los astrocitos en cultivo (Fig. 7B).

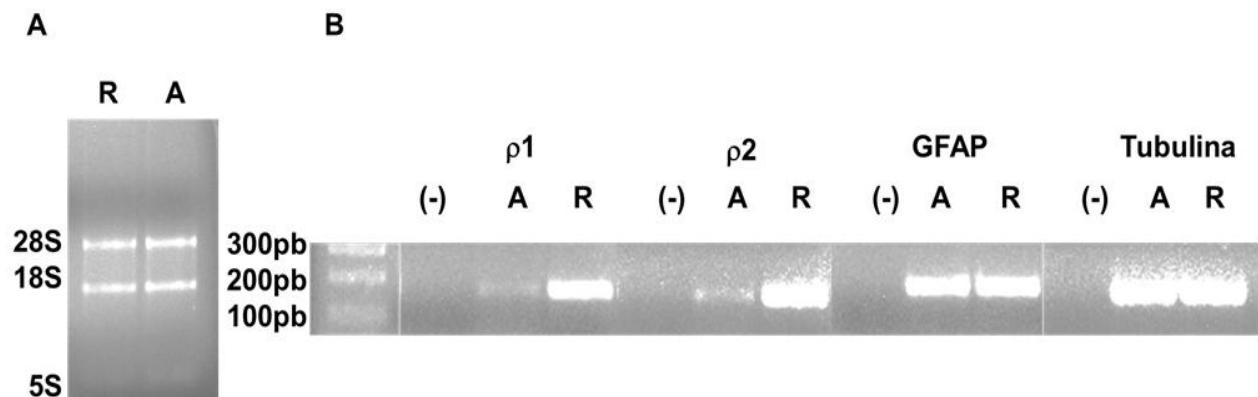


Figura 7. A. Expresión de GABA ρ 1, GABA ρ 2, GFAP y tubulina en astrocitos de cerebelo de ratón en cultivo y en retina. A. RNA total extraído de astrocitos (A) y retina (R), 28S, 18S y 5S son las subunidades de RNA ribosomal. B. Gel de agarosa al 2% muestra los productos de amplificación por RT-PCR de Tubulina, GABA ρ 1 (ρ 1), GABA ρ 2 (ρ 2) y GFAP en astrocitos en cultivo de cerebelo de ratón, 300pb, 200pb y 100pb se refiere al número de pares de bases del marcador de pesos moleculares. Como tejido control positivo se utilizó retina y como transcrito constitutivo tubulina. Como controles negativos (-) los reactivos de las reacciones sin cDNA. n=3.

7.3. Distribución de GABA ρ 1 en cultivos primarios de astrocitos.

Realizando dobles inmunolocalizaciones (n=3, tres cultivos independientes de 3 animales distintos) empleando anticuerpos primarios específicos para GABA ρ 1 (Fig. 8A) y para GFAP (Fig. 8B), se determinó que el $60 \pm 7.0\%$ de las células en cultivo son inmunoreactivas para GABA ρ 1 y para GFAP (n = 450 células).

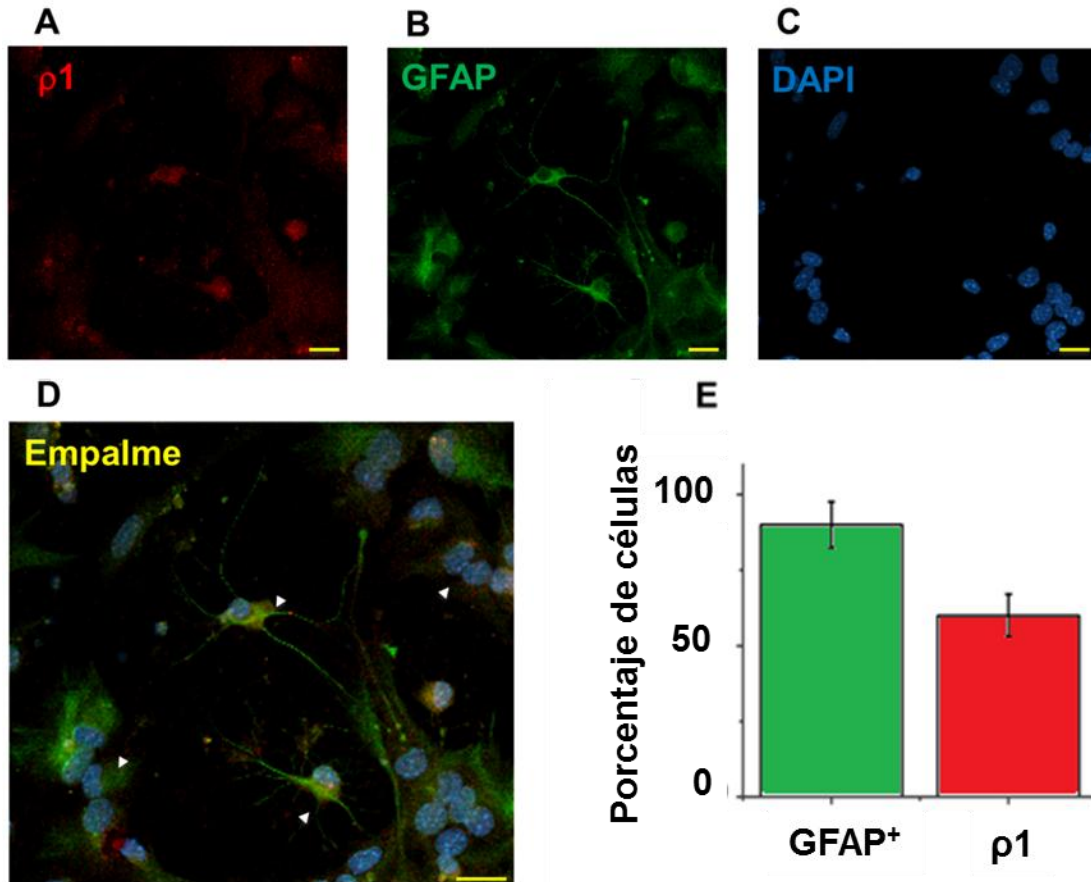


Figura 8. Distribución GABAp1 en astrocitos de cerebelo de ratón en cultivo. A. Inmunoreactividad a GABAp1. **B.** Células inmunoreactivas a GFAP. **C.** Tinción nuclear con DAPI. **D.** Superposición de los tres canales donde se muestran la colocación de GABAp1 y GFAP (cabezas de flecha). **E.** Gráfica que indica el porcentaje de células inmunopositivas para GFAP y GABAp1 (promedio de 450 células de cada cultivo, 3 cultivos independientes). Las barras equivalen a 20 μ m.

Para conocer la distribución de GABAp1 en los astrocitos, se tomaron imágenes de células independientes inmunoreactivas para GFAP, en donde localizamos el receptor principalmente en la región perinuclear y en algunos procesos distales, esto en los tres tipos de morfología citadas anteriormente (Fig. 9).

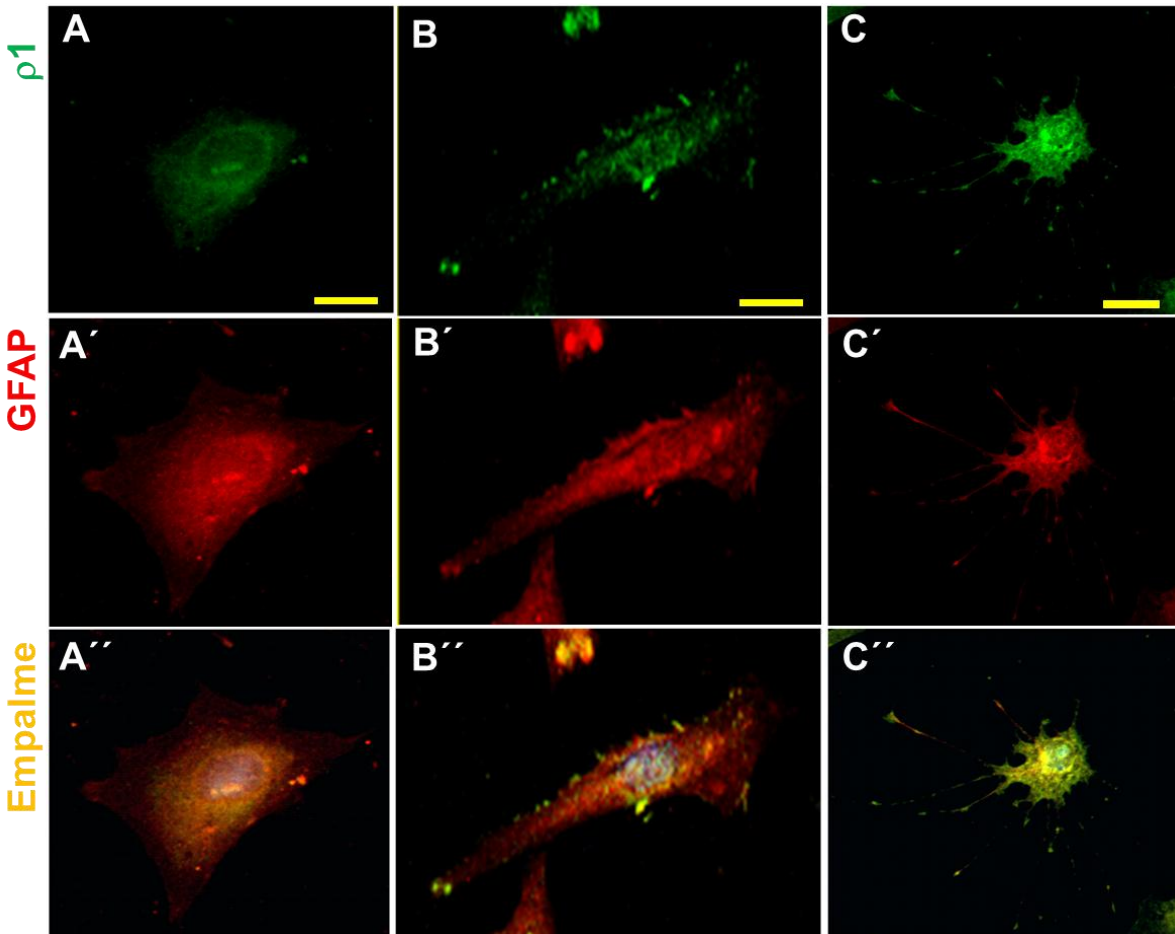


Figura 9. Doble inmunocitofluorescencia para GABAp1 y GFAP. Primera fila (A-C) muestra la inmunoreactividad a GABAp1 en células con morfología plana sin procesos (A), con somas poligonales y pocos procesos (B) y morfología estrellada (C). **Segunda fila (A'-C')** Marcaje para para GFAP. **Tercera fila (A''-C'')** colocalización de las señales para GABAp1 y GFAP. La tinción nuclear se realizó con DAPI. Las barras equivalen a 20 μ m.

7.4. Distribución de GABAp2 en cultivos primarios de astrocitos.

En cuanto a GABAp2 se refiere, encontramos que se presenta en un $70.0 \pm 4.97\%$ de las células en cultivo, las cuales son también GFAP positivas, GABAp2 se presenta en mayor proporción en la región perinuclear y en los procesos distales de los astrocitos (Fig. 10).

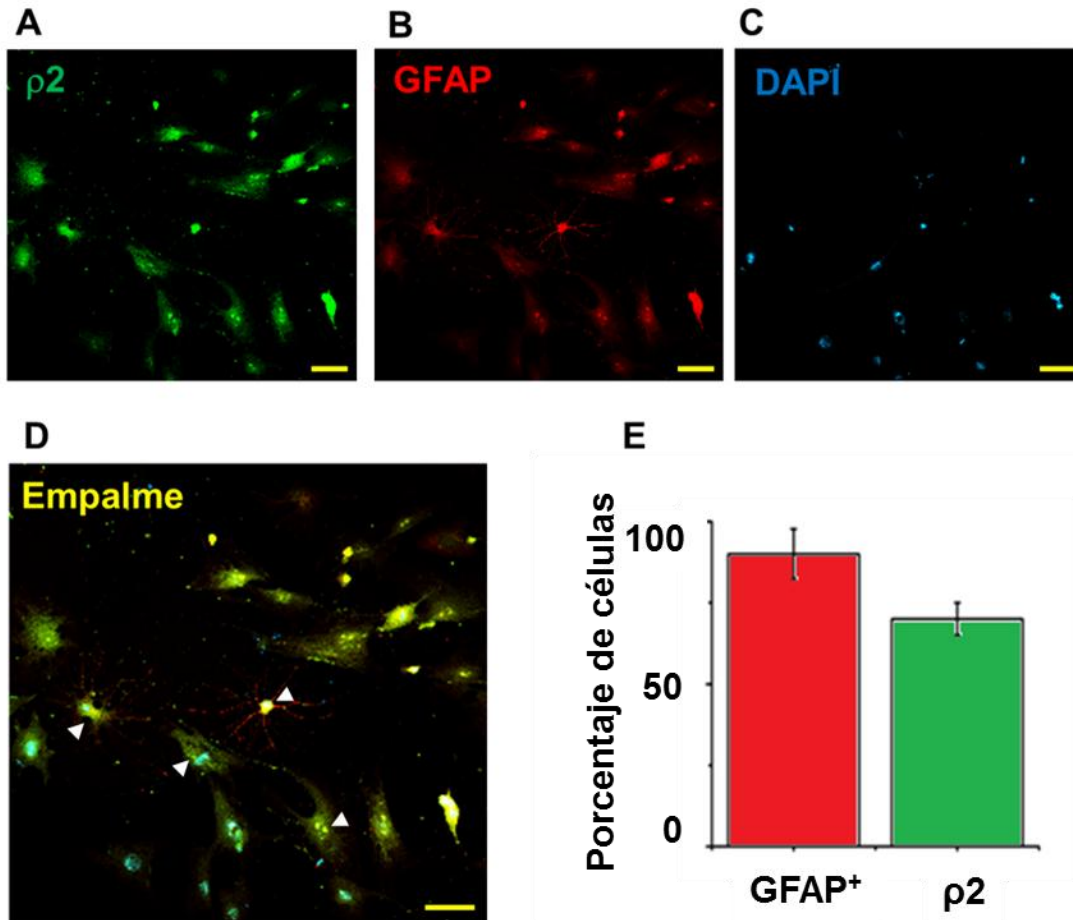


Figura 10. Inmunoreactividad para GABA ρ 2 en cultivos primarios de astrocitos del cerebelo de ratón. A, B. Doble inmunocitofluorescencia para GABA ρ 2 y GFAP. **C.** Tinción nuclear con DAPI. **D.** Colocalización de las señales para GABA ρ 2 y GFAP (cabezas de flecha). **E.** Gráfica que indica el porcentaje de células inmunopositivas para GFAP y a GABA ρ 2 (promedio de 450 células de cada cultivo, 3 cultivos independientes). Las barras equivalen a 50 μ m.

GABA ρ 2 se distribuye principalmente en la región perinuclear y en los procesos distales de los astrocitos (Fig. 11).

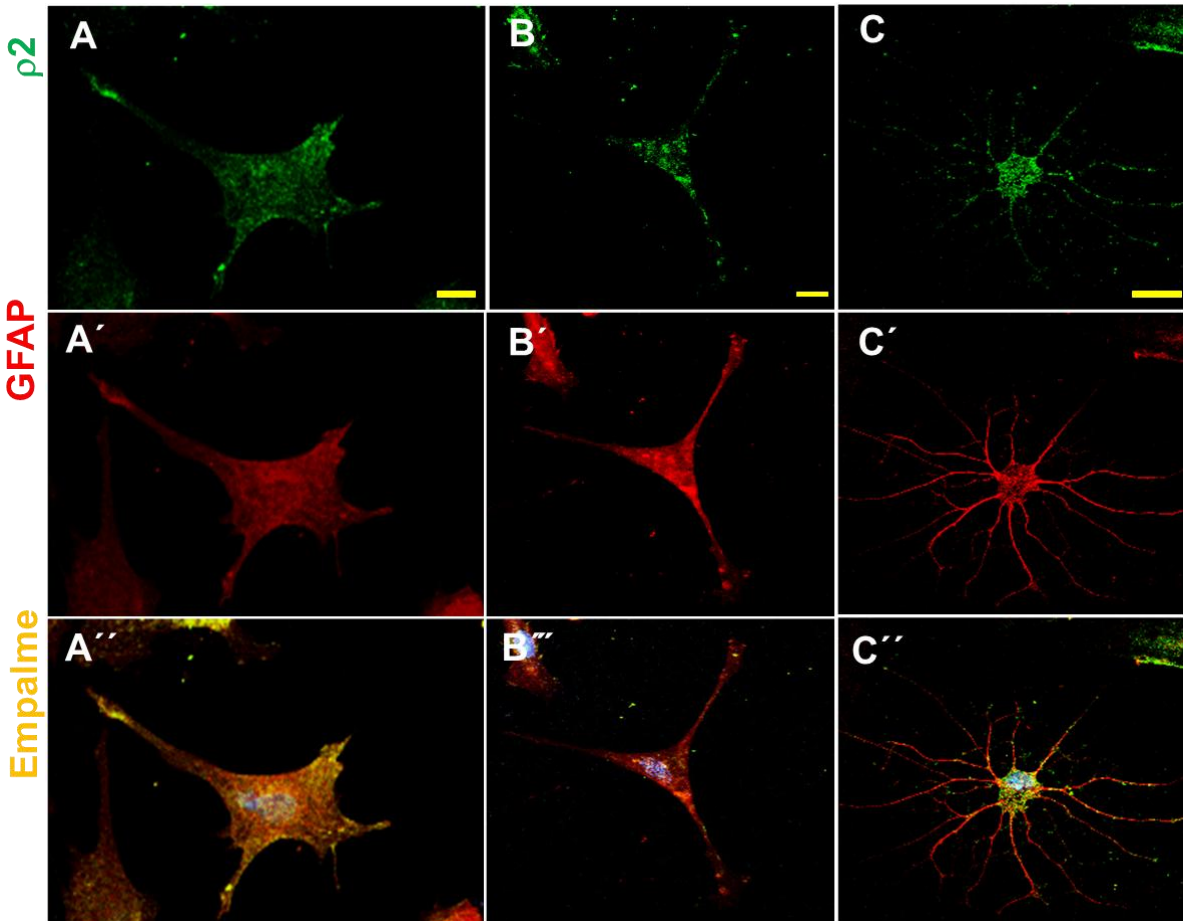


Figura 11. Patrón de expresión de la subunidad GABA ρ 2. Las imágenes ilustran los resultados de la doble inmunocitofluorescencia para GABA ρ 2 y GFAP en células con morfología plana (A) somas poligonales con algunos procesos (B) y estrellada (C). En la **primera fila (A'-C')** se muestra inmunoreactividad a \square GABA ρ 2; en la **segunda fila (A''-C'')** la inmunoreactividad a GFAP de las tres diferentes morfologías analizadas y en la **última fila (A'''-C''')** la colocalización de las señales obtenidas para GABA ρ 2 y GFAP, la tinción nuclear de las células se realizó con DAPI. Las barras equivalen a 20 μ m.

7.5. *Propiedades electrofisiológicas de receptores a GABA de los astrocitos en cultivo.*

7.5.1. *Corrientes dependientes de voltaje en astrocitos en cultivo.*

Las células gliales se caracterizan por su alta permeabilidad a potasio que es favorecida por la expresión de canales iónicos selectivos para este ión (Ransom y Kettenmann, 1990). En nuestros cultivos primarios de astrocitos de cerebelo

identificamos tres tipos de corrientes salientes que con base a sus propiedades cinéticas corresponden a: 1) una corriente con rectificación retardada (K_{DR}), 2) otra que presenta activación transitoria (K_A) y 3) una que presenta una mezcla de ambas. Las tres corrientes son activadas cuando se aplica un prepulso hiperpolarizante de -110 mV y enseguida pulsos de voltaje despolarizantes (ver métodos).

La corriente tipo K_A fue dominante en un 50% del total de las células registradas ($n=60$). La combinación de las corrientes tipo K_{DR} y K_A se presentó en un 31% del total de las células registradas ($n=60$). K_{DR} fue la corriente dominante en el 19% del total de las células registradas ($n=60$) (Fig. 12A, B y C). Las relaciones corriente-voltaje (I-V) obtenidas nos indican que las respuestas están dadas por corrientes salientes, y su activación se efectúa alrededor de los -40mV (Fig. 12D).

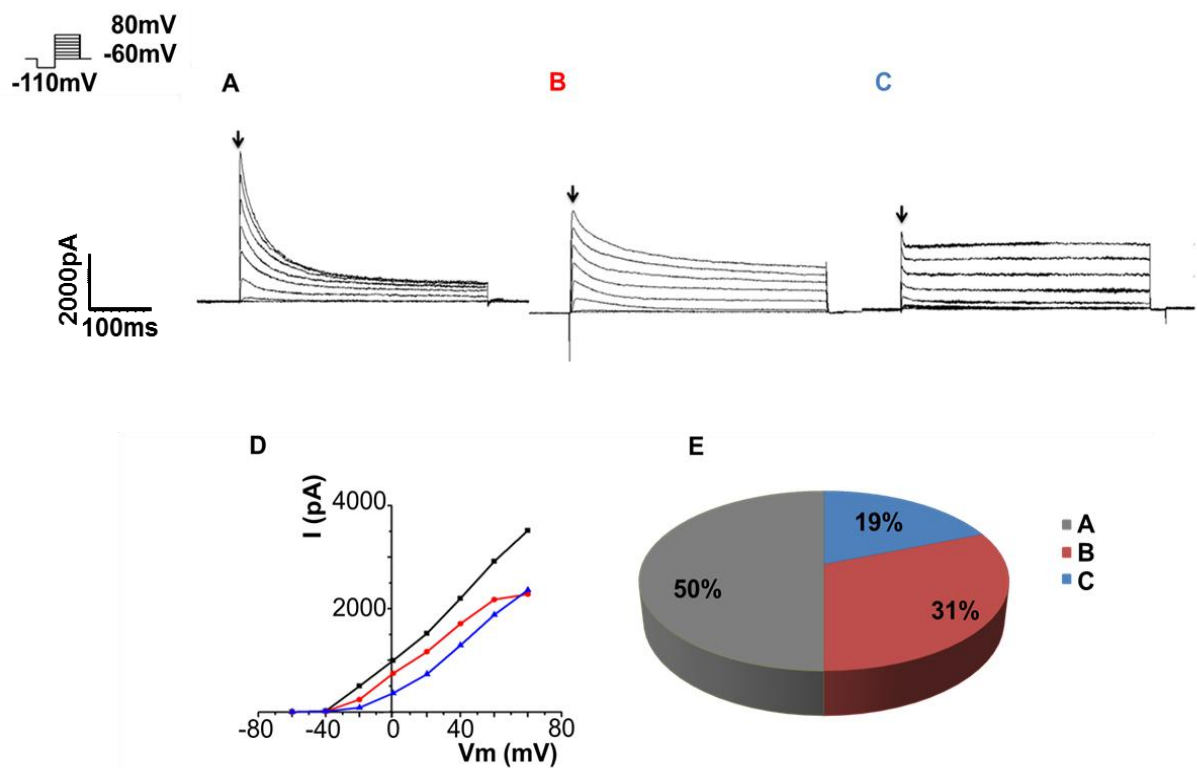


Figura 12. Corrientes dependientes de voltaje en astrocitos en cultivo. A. Corriente con mayor componente de corriente K_A . **B.** Corriente tipo K_{DR} con componente de corriente K_A . **C.** Corriente tipo K_{DR} . **D.** Relación I-V de A, B y C. **E.** Porcentaje de ocurrencia de las corrientes de K^+ en astrocitos en cultivo. $n=60$ (Protocolo de activación en trazo de arriba).

7.5.2. Respuestas mediadas por GABA en astrocitos en cultivo.

Los estudios de control de voltaje en la configuración de la célula completa nos permitieron investigar las propiedades funcionales de las respuestas a GABA en los cultivos primarios de astrocitos. Nuestro primer objetivo fue determinar la concentración de GABA necesaria para obtener una corriente del 50% de la amplitud máxima (EC_{50}), para ello las células registradas fueron fijadas a un voltaje de $-60mV$ y se aplicaron diferentes concentraciones de GABA (en μM): 0, 10, 20, 30, 50, 100 y 250, por 30s. La amplitud de las corrientes registradas se graficó en función de las distintas concentraciones de GABA (Fig. 13A). Los datos nos permitieron estimar una EC_{50} de $52 \pm 11.8\mu M$ (Fig. 13B).

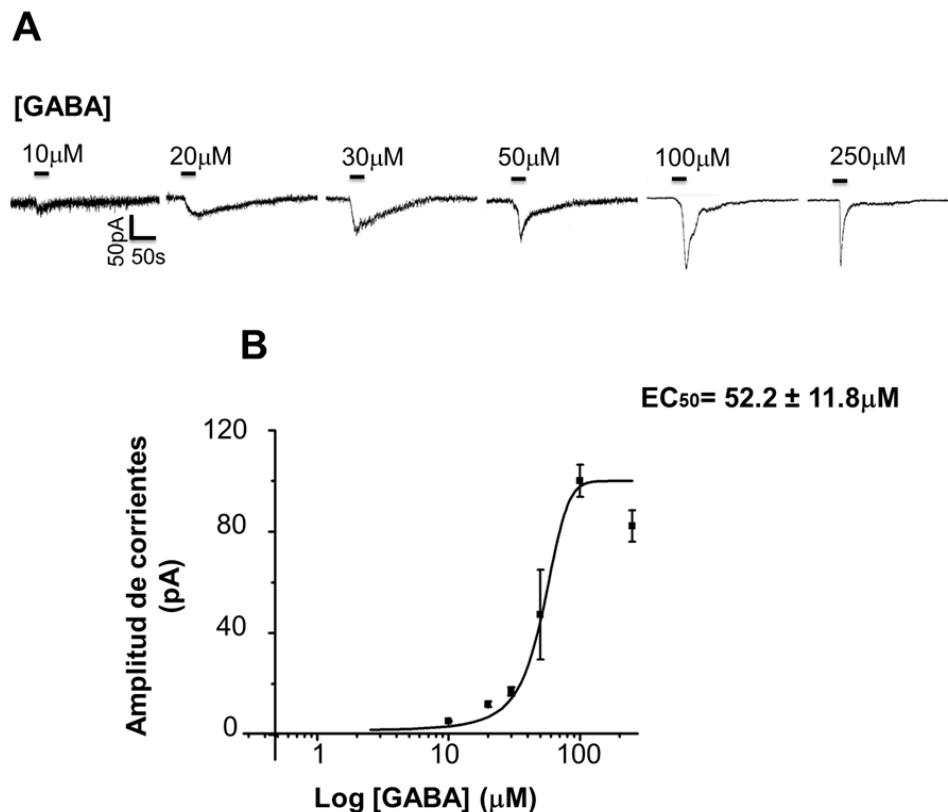


Figura 13. Respuestas a GABA en astrocitos en cultivo. **A.** Respuestas a diferentes concentraciones de GABA (10, 20, 30, 50, 100, 250 μM). **B.** La curva concentración-respuesta de GABA fue ajustada a un modelo sigmoideo y se estimó una EC_{50} de $52.2 \pm 11.8\mu M$. Los valores son el promedio de 5 datos para cada concentración \pm error estándar.

Los datos muestran que la activación de los receptores GABA en astrocitos es dependiente de la concentración, activando corrientes entrantes tras la aplicación de GABA (a partir de [10 μ M]). La máxima amplitud (1046.7 ± 67.1 pA) se alcanzó aplicando GABA (100 μ M) (Fig. 13A). Las corrientes generadas con GABA (50 μ M, 100 μ M y 250 μ M) presentan dos componentes de inactivación: uno rápido y otro lento.

7.5.3. Estimación de la desensibilización de los receptores GABA_A expresados en astrocitos en cultivo.

Con el fin de determinar el grado de desensibilización de los receptores GABA_A en los astrocitos, se realizaron cinco aplicaciones de GABA (50 μ M), en la solución extracelular, con lavados de 7 min. entre cada aplicación. Con los datos obtenidos elaboramos una curva de desensibilización, en la cual observamos que la amplitud de la respuesta disminuye con respecto al número de aplicaciones de GABA. Específicamente se determinó que existe una disminución del $59.6 \pm 22.3\%$ de la corriente después de una segunda aplicación de GABA [50 μ M] (Fig. 14). Debido a ello y con el fin de evitar la desensibilización de los receptores, los siguientes experimentos se realizaron sin previa aplicación del GABA.

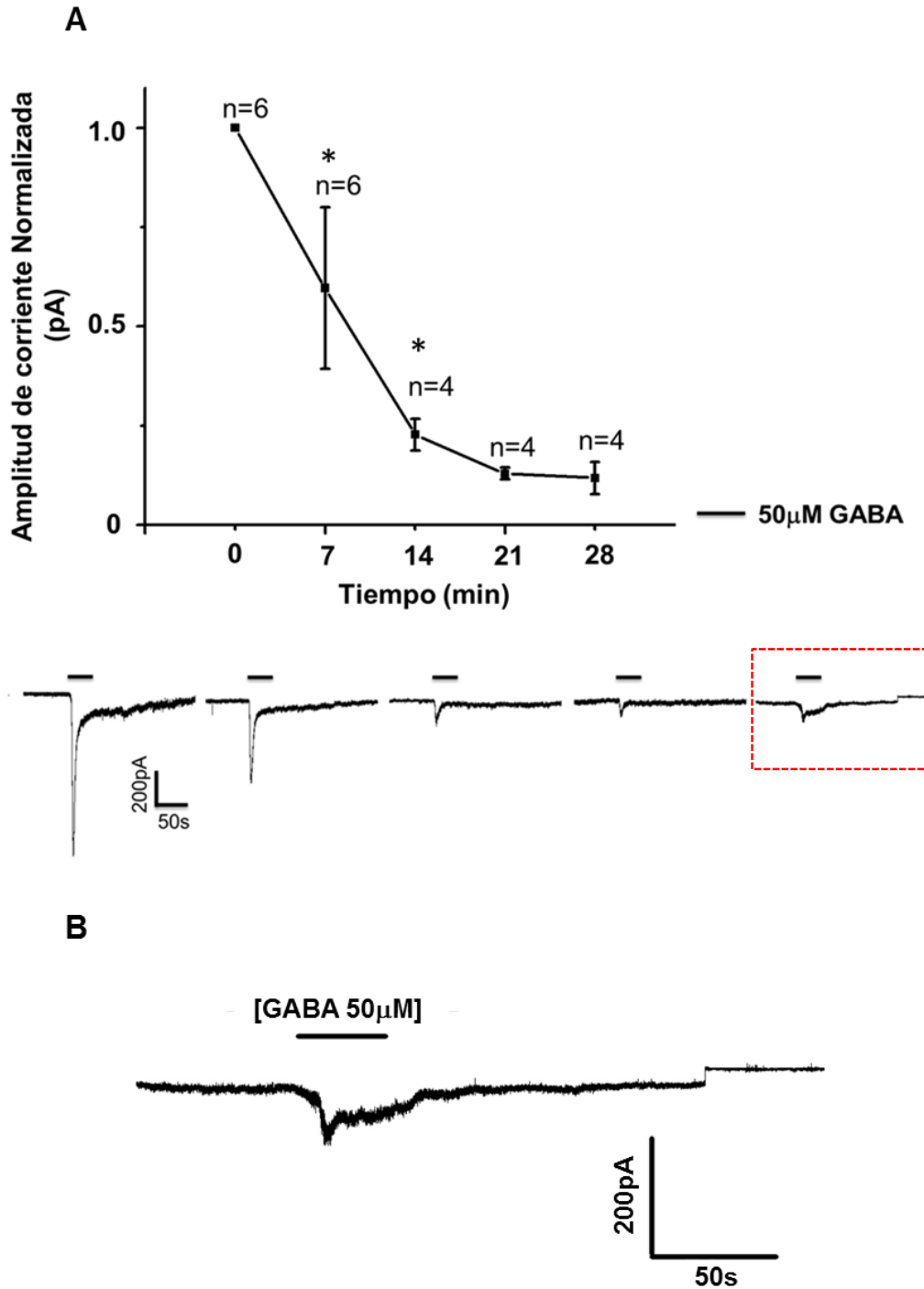


Figura 14. Curva de desensibilización a GABA en astrocitos en cultivo. A. Curva de desensibilización muestra que la amplitud de las corrientes activadas por GABA disminuye de manera proporcional al número de aplicaciones del agonista; tras la segunda aplicación de GABA, la amplitud de las corrientes disminuye en un $59.62 \pm 22.27\%$. **B.** Ampliación del recuadro rojo en A. Muestra una respuesta a GABA ($50\mu\text{M}$) con una cinética de inactivación lenta, en comparación a las anteriores aplicaciones. Los asteriscos indican diferencias significativas determinadas mediante ANOVA de una vía ($p= 1.88201\text{E-}4$) y prueba LSD de Fisher ($*p<0.05$).

7.5.4. Caracterización farmacológica de los receptores a GABA en astrocitos en cultivo.

Con el fin de determinar si las respuestas generadas tras la aplicación de GABA son mediadas por la activación del receptor GABA_A, se utilizó la bicuculina, antagonista selectivo de estos receptores. Sin previa aplicación de GABA (50μM), se adicionó a la solución extracelular bicuculina [100μM] y GABA [50μM]. Esto produjo una inhibición del 90.5 ± 3.7% (Fig. 15B y F) de la respuesta de GABA [50μM] (Fig. 15A y F). Con ello, se comprobó que las respuestas generadas por GABA son mediadas por la activación de los receptores GABA_A. Sin embargo, como podemos apreciar en la figura 15B, existe una corriente que persiste después de la aplicación de bicuculina (100μM), la cual pudiera deberse a la activación de GABA_ρ. Para caracterizar este componente, se adicionó además del GABA [50μM] y la bicuculina (100μM), TPMPA [10μM], antagonista selectivo de los receptores GABA_ρ. Este coctel farmacológico produjo una inhibición de las respuestas a GABA del 99.1 ± 0.3% (Fig. 15C y F), sugiriendo así, la participación activa de los receptores GABA_ρ en la generación de respuestas a GABA.

En otro grupo de experimentos se evaluó el efecto antagonista de la picrotoxina (PTX) sobre las respuestas a GABA. Al agregar en el medio PTX [100μM], las corrientes a GABA [50μM] (Fig. 15D) se bloquearon en un 69.9 ± 8.6% (Fig. 15 E y F), quedando al igual que con bicuculina una corriente persistente que no es bloqueada. En conjunto, estos datos demostraban la presencia de una corriente insensible a los antagonistas clásicos del receptor GABA_A.

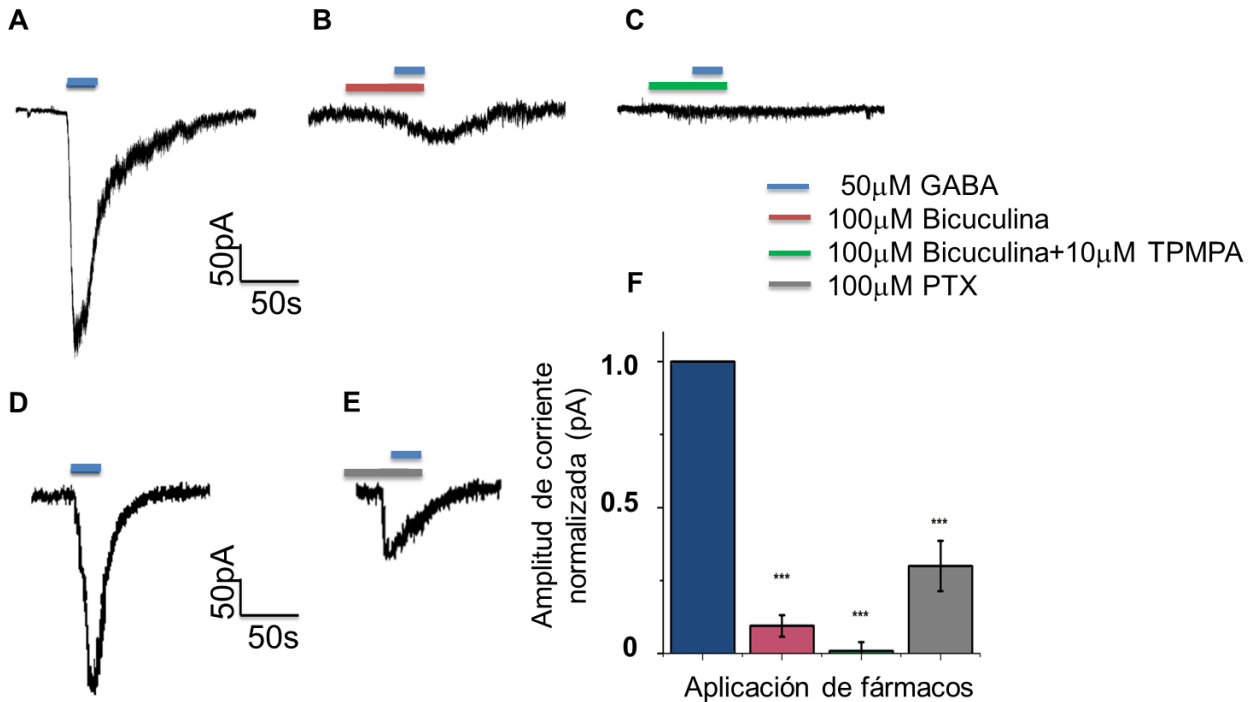


Figura 15. Efecto de antagonistas sobre las corrientes mediadas por GABA en astrocitos en cultivo. A y D. Respuestas a GABA 50 μM. **B.** Aplicación de bicuculina [100 μM] disminuye parcialmente (90.5±3.7%) las respuestas mediadas por GABA [50 μM] (en azul). **C.** Bicuculina [100 μM] y TPMPA [10 μM] elimina en un (99.1±0.3%) la corriente que persiste al aplicar bicuculina [100 μM]. **E.** Picrotoxina [100 μM] bloquea parcialmente (69.9±8.6%) las respuestas mediadas por GABA [50 μM]. **F.** Gráfica 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 PTX [100 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 (** $p<0.05$).

7.5.5. Curva de inhibición dosis-respuesta del TPMPA sobre las respuestas de GABA (50 μM).

Una vez que se determinó que existía un componente de la corriente a GABA que era sensible a TPMPA se procedió a estimar la concentración necesaria para inhibir el 50% de la respuesta (IC_{50}). Las corrientes de GABA (50 μM) se obtuvieron en ausencia o presencia de distintas concentraciones de TPMPA (5, 7, 10, 50, 100 y 200 μM) (previa incubación de TPMPA por 20 segundos) (Fig. 16). Nuestros resultados

muestran que el TPMPA inhibe de forma dosis-dependiente las corrientes generadas por GABA ($IC_{50}=5.9 \pm 0.6\mu M$).

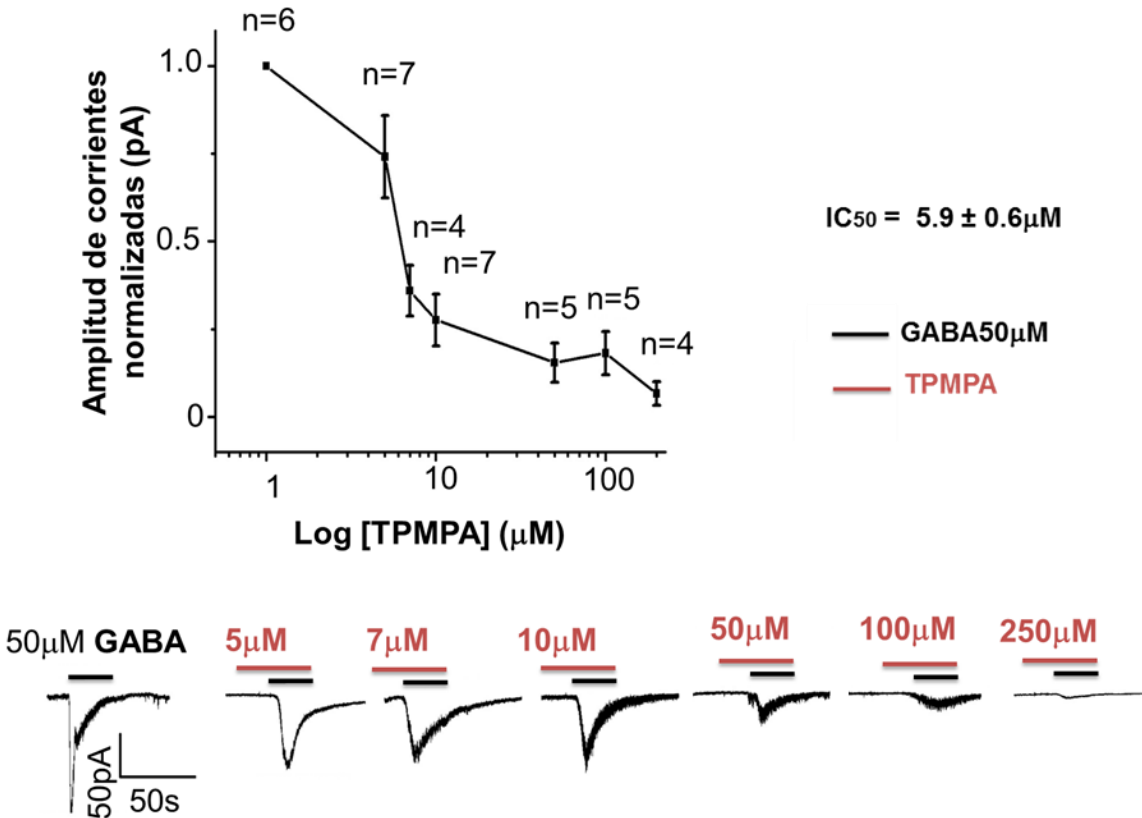


Figura 16. Curva de inhibición de TPMPA sobre las respuestas a GABA (50 μM). Respuestas mediadas por GABA [50 μM] en presencia de TPMPA (0, 5, 10, 50, 100, 250 μM).

Con esta serie de experimentos se demuestra la expresión funcional de GABA_p que sumado a los datos de RT-PCR e inmunocitofluorescencia señalan la participación de GABA_{p1} y GABA_{p2} en la activación de las corrientes generadas al aplicar GABA.

8. DISCUSIÓN

En el presente estudio mostramos evidencias que apoyan la hipótesis que los astrocitos en cultivo expresan las subunidades GABA ρ . Nuestros resultados indican la expresión de los transcritos y de proteínas de GABA ρ 1 y GABA ρ 2 en los astrocitos en cultivo. Los estudios de inmunocitofluorescencia sugieren que GABA ρ se encuentra en más de la mitad (60-70%) de las células GFAP⁺ en cultivo. GABA ρ 1 y GABA ρ 2 se localizan de manera específica en las zonas distales de los procesos y de manera difusa en los somas. Distribución similar a la que presenta la construcción quimérica GABA ρ 2-GFP en los astrocitos en cultivo (Información suplementaria). Esto, concuerda con que la síntesis y el ensamble de los receptores GABA_A se llevan a cabo en el retículo endoplásmico, alrededor del núcleo (Charych et al., 2004; Connolly et al., 1996; Connolly et al., 1999; Matthias Kneussel, 2002). Por otra parte, sabemos que los procesos gliales son elementos estructurales que se asocian con los compartimentos pre y postsinápticos; tomando esto en cuenta, la localización específica de GABA ρ en las terminales de los procesos gliales podría ser requerida en su papel fundamental en el procesamiento de la información sináptica (Reichenbach et al., 2010). Un ejemplo de la modulación sináptica por parte de células gliales, es la presencia de los receptores GABA_A en los procesos de la glía de Bergmann, los cuales se encuentran envolviendo los somas de las células de Purkinje, las dendritas y algunas espinas dendríticas (Müller, 1994, Riquelme et al., 2002).

La primera evidencia sobre la expresión funcional de los receptores GABA_A en astrocitos, se demostró en células en cultivo (Kettenmann et al., 1984; Kettenmann y Schachner, 1985; Fraser et al., 1994). En estos estudios se describió que estos receptores presentan conductancias y cinéticas de activación similares a los que se expresan en neuronas, pero con diferencias en la modulación por benzodiazepinas. (Bormann y Kettenmann, 1988; Rosewater y Sontheimer 1994). Sugiriendo con ello, que en astrocitos, los receptores GABA_A están conformados por subunidades específicas. Hasta el momento se ha identificado la expresión funcional de las subunidades α 1 y β 1 en astrocitos de hipocampo (Fraser et al., 1995), y de las

subunidades $\alpha 2$ y $\gamma 1$ en la glía de Bergmann (Riquelme et al., 2002). Sin embargo, se desconocía la expresión funcional de la subunidad GABA ρ en la glía. Nuestro estudio demuestra que GABA ρ se expresa y es funcional en cultivos primarios de astrocitos de cerebelo.

Al igual que estudios previos en cultivos primarios de astrocitos (Bormann et al., 1998), encontramos que las corrientes generadas por la administración de GABA son dependientes de la concentración del agonista. De esta forma, determinamos que el valor de la EC₅₀ es de 52 μ M, valor cercano al estimado previamente para los receptores GABA_A en cultivos primarios de astrocitos (30 μ M) (Bormann et al., 1998). Algo que llamó nuestra atención fue que la aplicación extracelular de bajas concentraciones (rango de 10 a 30 μ M) de GABA generó corrientes con una cinética de inactivación lenta, mientras que a concentraciones altas (a partir de 50 μ M) se observaron dos cinéticas de inactivación: una transitoria (rápida) y otra lenta. Una hipótesis para explicar este comportamiento es que la inactivación lenta corresponde a los receptores GABA ρ , ya que a diferencia de los GABA_A, estos no se desensibilizan en presencia del agonista (Polenzani et al., 1991). En relación a este último punto, nuestros datos obtenidos tras varias aplicaciones de GABA (50 μ M) son consistentes, ya que encontramos que una parte de las corrientes mediadas por GABA disminuyen en la segunda aplicación de GABA. Sin embargo tras la cuarta y quinta aplicación, la disminución de las corrientes no es significativa. Sugiriendo así, la presencia de un componente que no sufre desensibilización al agonista, el cual podría corresponder a GABA ρ .

En apoyo a este argumento nuestros datos muestran que las corrientes activadas por GABA (50 μ M) no son totalmente inhibidas con bicuculina (100 μ M), antagonista selectivo de los receptores GABA_A. La misma corriente remanente se observó tras la aplicación de picrotoxina (100 μ M), bloqueador selectivo de los mismos receptores, lo que sugiere, la expresión funcional de GABA ρ . En este sentido, Polenzani y colaboradores (1991), describieron que el RNA extraído de retina, expresa receptores GABA_A, los cuales a pesar de ser activados por GABA, son insensibles a

bicuculina y parcialmente bloqueados con picrotoxina, además de que las corrientes de Cl⁻ generadas tras su activación presentaron baja desensibilización. Este hecho sugirió la presencia de receptores a GABA con diferentes propiedades farmacológicas a las conocidas para los receptores GABA_A, y que se definieron como GABA_ρ (Polenzani et al 1991, Woodward et al 1992, 1993). Más tarde se describieron características similares en las neuronas bipolares de retina y la expresión funcional de los receptores GABA_ρ en este tipo celular fue demostrada (Feisgenspan y Borman, 1994).

Para evaluar la posibilidad de que GABA_ρ se encuentra formando parte de los receptores funcionales a GABA expresados en los astrocitos en cultivo, estudiamos el efecto del TPMPA, principal antagonista de GABA_ρ (Ragozzino et al., 1996). Una propuesta del presente trabajo es que los receptores de los astrocitos en cultivo forman heteropentámeros que incluyen a GABA_ρ, ya que, GABA_ρ puede ensamblarse a manera de heterómeros con otras subunidades de los receptores GABA_A en neuronas de Purkinje (Harvey et al., 2006). Para evaluar esta posibilidad aplicamos el TPMPA a una concentración alta (100 μM) y encontramos que existe una inhibición parcial (81.0 ± 5.9) de las respuestas mediadas por GABA (50 μM), quedando un pequeño porcentaje de corriente insensible al TPMPA. Este dato, aunado al hecho de que ni la bicuculina (100 μM), ni la picrotoxina (100 μM) bloquean en su totalidad las respuestas a GABA, sugiere que los receptores GABA_A al igual que en las neuronas de Purkinje podrían estar ensamblados a manera de heteropentámeros (Harvey et al., 2006) en los astrocitos en cultivo. La segunda posibilidad es que GABA_ρ se encuentre formando homopentámeros, como lo hace tanto al expresarlos de manera heteróloga en ovocitos de *X. laevis* como en retina (Connaughton et al., 2005; Enz y Cutting, 1999; Polenzani et al., 1991; Quian y Dowling, 1995; Woodward et al., 1992; Woodward et al., 1993). Con el fin de explorar esta alternativa, y debido a que los receptores homoméricos de GABA_ρ presentan una mayor sensibilidad al TPMPA que los heteroméricos, aplicamos este fármaco a menor concentración (10 μM). Nuestros datos mostraron una inhibición parcial de las respuestas a GABA (77.2 ± 10.2%). Esto sugiere que los receptores a GABA que expresan los astrocitos en cultivo son sensibles al TPMPA aún a bajas concentraciones y con ello apoya la posibilidad de que se formen también receptores

GABA ρ homoméricos. Finalmente y para determinar la sensibilidad al TPMPA de los receptores a GABA en astrocitos, se realizó una curva dosis-respuesta y de acuerdo a ella se determinó que la IC₅₀ del fármaco es de $5.9 \pm 6.9 \mu\text{M}$. Este valor se asemeja al reportado para los receptores GABA ρ expresados en ovocitos (IC₅₀ = 0.7 a 4 μM), lo que sugiere que los receptores a GABA en astrocitos son sensibles al TPMPA. Sin embargo la concentración requerida para inhibir el cincuenta por ciento de las respuestas es mayor en comparación a las reportadas para receptores GABA ρ homoméricos (Chebib, 2004; Martinez-Martínez et al., 2003; Polenzani et al., 1991; Ragozzino et al., 1996).

Tomando en cuenta todos estos datos, podemos afirmar que los astrocitos de cerebelo de ratón en cultivo expresan receptores a GABA con propiedades farmacológicas que implican la participación de GABA ρ . Nuestros datos también sugieren tres posibilidades: 1) la formación de homómeros GABA ρ y receptores clásicos, 2) la formación de heterómeros GABA ρ /GABA α y 3) la presencia de receptores GABA α clásicos. En estudios previos, la hipótesis sobre la expresión de receptores híbridos conformados por las subunidades $\rho 1$, $\alpha 1$ y $\gamma 2$, fue apoyada por estudios de inmunohistoquímica, en los que se determinó que dichas subunidades co-expresan en una misma neurona, además de que ensayos de co-inmunoprecipitación demostraron que las tres subunidades se asocian físicamente, muy posiblemente formando heteropentámeros funcionales (Milligan et al, 2004). A diferencia de estos datos, nuestros resultados no nos permiten determinar con precisión si GABA ρ se encuentra formando heterómeros con las subunidades de los receptores GABA α , o bien, si existe una población de células que expresan de manera independiente ambos tipos de receptores.

Este estudio podría enriquecerse con técnicas de co-inmunoprecipitación para determinar si la asociación de GABA ρ con alguna subunidad del receptor GABA α se presenta, o bien que GABA ρ solo forme homómeros. Otra propuesta sería, investigar la función de las células GFAP⁺ que expresan la subunidad GABA ρ . Empleando ingeniería genética se podrían diseñar ratones *Knock out* para GABA ρ en células GFAP⁺, con el

fin de evaluar si se ve afectada la transmisión GABAérgicas en el cerebelo al comprometerse su expresión.

Es importante mencionar que, la mayoría de las células gliales, incluyendo los astrocitos, expresan receptores funcionales a GABA tanto metabotrópicos como ionotrópicos. Los mecanismos de señalización que permiten la activación de estos receptores, son probablemente tan complejos como los descritos en las neuronas. Estos mecanismos involucran la transmisión sináptica y la extrasináptica. Una propuesta de ello es, que al activarse los receptores GABA_A en astrocitos, se generan despolarizaciones que provocan elevaciones de Ca²⁺ intracelular, mediadas por la activación de canales de calcio dependientes de voltaje (VGCCs) (Bernstein et al., 1996., Fraser et al., 1995., Meier et al., 2008; Nilsson et al., 1993). Estas elevaciones de Ca²⁺ son la forma de excitabilidad que se encuentra en los astrocitos para integrar la actividad neuronal (Perea et al., 2009). Por tanto, las despolarizaciones mediadas por GABA podrían ser la manera en la que las neuronas influyen la actividad astrocítica. Como consecuencia de la actividad astrocítica, los astrocitos retroalimentan a las neuronas por medio de la liberación de GABA no vesiculado (Lee et al., 2010). Aunque los mecanismos de señalización mediados por el GABA en las células gliales aún no se conocen del todo, y tampoco se han podido descifrar todas las funciones desempeñadas por la señalización GABAérgica en las interacciones neurona-glia, se sugiere, que la activación de receptores a GABA en células gliales, modula funciones importantes del cerebro, tales como la actividad neuronal (Barres, 2008., Benedetti, 2011), la diferenciación tanto astrocítica como neuronal (Matsutani y Yamamoto, 1997., Mong et al., 2002., Runquist y Alonso, 2003., Tozuka et al., 2005), la mielinización y la neuroprotección (Angúlo, 2011., Barres, 2008).

9. CONCLUSIONES.

1. Los astrocitos en cultivo expresan el transcrito que codifica para las subunidades GABA ρ 1 y GABA ρ 2.
2. Las subunidades GABA ρ 1 y GABA ρ 2 se encuentran en los astrocitos en cultivo distribuidos principalmente en el soma y en algunos procesos distales.
3. La activación de los receptores GABA $_A$ es dependientes de la concentración de GABA y presentan una EC $_{50}$ de 52 μ M.
4. Las respuestas a GABA son inhibidas parcialmente por bicuculina [100 μ M] y picrotoxina [100 μ M](90.5 \pm 3.7% y 66.9 \pm 8.6%, respectivamente). La coaplicación de bicuculina [100 μ M] y TPMPA [10 μ M] bloquea la respuesta a GABA en un 99.1 \pm 8.6%. Esto sugiere, que los receptores GABA ρ median parte de las respuestas a GABA.
5. La inhibición de las corrientes a GABA es dependiente de la concentración de TPMPA (IC $_{50}$ = 5.9 \pm 6.9 μ M).

10. REFERENCIAS

Agulhon C., Fiacco T., McCarthy K. 2006. Hippocampal short- and long-term plasticity are not modulated by astrocyte Ca²⁺ signaling. *Science* 327: 1250-1254.

Alakuijala A., Alakuijala J., Pasternack M. 2006. Evidence for a functional role of GABA receptors in the rat mature hippocampus. *Eur J Neurosci.* 23: 514-520.

Alder J., Cho NK., Hatten ME. 1996. Embryonic precursor cells from the rhombic lip are specified to a cerebellar granule neuron identity. *Neuron* 17:389–399.

Altman J. y Bayer S. 1997. *Development of the Cerebellar System: In Relation to Its Evolution, Structure, and Function.* Boca Raton, FL: CRC Press.

Andrade R., Malenka R., Nicoll R. 1986. A G protein couples serotonin and GABA_B receptors to the same channels in hippocampus. *Science* 234:1261–1265.

Angulo M., Le-Meur K., Kozlov A., Charpak S., Audinat E. 2008. GABA, a forgotten gliotransmitter. *Prog Neurobiol.* 86: 297–303.

Barakat L. y Bordey A. 2002. GAT-1 and Reversible GABA Transport in Bergmann Glia. *J. Neurophysiol* 88: 1407–1419.

Barres B., Chun L. y Correy D. 1988. Ion channel expression by white matter glia: 1. Type 2 astrocytes and oligodendrocytes. *Glia* 1: 10-30.

Barres B., Koroshetz W., Swartz K., Chun L., Correy D. 1990. Ion channel expression by white matter glia: The O2-A glial progenitor cell. *Neuron* 4: 507-524.

Baude A., Nusser Z., Roberts JD., Mulvihill E., McIlhinney RA., Somogyi P. 1993. The metabotropic glutamate receptor (mGluR1 alpha) is concentrated at perisynaptic

membrane of neuronal subpopulations as detected by immunogold reaction. *Neuron* 11: 771–787.

Ben-Ari Y. 2002. Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci.* 3: 728-739.

Benedetti B. Matyash V., Kettenmann H. 2011. Astrocytes control GABAergic inhibition of neurons in the mouse barrel cortex. *J Physiol.* 589: 1159-72.

Bennett M. y Balcar V. 1999. Forty years of amino acid transmission in the brain. *Neurochem Int.* 35: 269-80.

Berger T., Waltz W., Schnitzer J., Kettenmann H. 1992. GABA and glutamate active currents in glial cell of corpus callosum slice. *J. Neurosci. Res* 31: 21-27.

Bergles DE., D. J., Jahr CE. 1997. Glutamate transporter currents in Bergmann glial cells follow the time course of extrasynaptic glutamate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14821–14825.

Bergles DE. y Jahr CE. 1997. Synaptic activation of glutamate transporters in hippocampal astrocytes. *Neuron* 19: 1297–308.

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.

Bevan S. y Lindsay R. M. 1985. Voltage-dependent potassium currents in cultured astrocytes. *Nature* 315: 229-232.

Bevan S., Lindsay R. M., Perkins M. N., Raff M. C. 1987. Voltage-gate ionic channels in rat cultured astrocytes, reactive astrocytes, and an astrocytes-oligodendrocytes progenitor cell. *J. Physiol.* 82: 327-335.

Bezzy P., Carmignoto G., Pasti L., Vesce S., Rossi D., Rizzini B. L., Pozzan T., Volterra A. 1998. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391: 281-5.

Bezzy P., Gundersen V., Galbete J. L., Seifer G., Steinhäuser C., Pilati E., Volterra A. 2004. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nature Neurosci.* 7: 613-620.

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.

Bolteus, A. J. y Bordey, A. 2004. GABA Release and uptake regulate neuronal Precursor Migration in the postnatal subventricular zone. *J. Neurosci.* 24, 7623–7631.

Borden L. 1996. GABA transporter heterogeneity: pharmacology and cellular localization. *Neurochem Int.* 29: 335–356.

Bordey, A. 2006. Adult neurogenesis: basic concepts of Signaling. *Cell Cycle* 5, 722–728.

Bormann y Feigenspan. 1995. Differential pharmacology of GABAA and GABAC receptors on rat retinal bipolar cells. *Eur J Pharmacol.* 288: 97-104.

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., Hamill OP., Sakmann B. 1987. Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and γ -aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurons. *J. Physiol.* 385: 243-861.

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.

Bovolin P., Santi MR., Puia G., Costa E., Grayson D. 1992. Expression patterns of gamma-aminobutyric acid type A receptor subunit mRNAs in primary cultures of granule neurons and astrocytes from neonatal rat cerebella. *Neurobiology* 89: 9344-9348.

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.

Bowery N. 1989. GABA_B receptors and their significance in mammalian pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 10: 401-7.

Brejč 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.

Bushong E., Martone M., Ellisman M. 2004. Maturation of astrocyte morphology and the establishment of astrocyte domains during postnatal hippocampal development. *Int. J. Dev. Neurosci.* 22: 73-86.

Calvo DJ., Vazquez AE., Miledi R. 1994. Cationic modulation of $\rho 1$ -type γ -aminobutyrate receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 12725-12729.

Capela A., Temple S. 2002. LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron* 35:865–875.

Charych E., Wendou Yu., Miralles., Serwanski D., Xuejing Li, Rubio M., De Blas A. 2004. The brefeldin A-inhibited GDP/GTP exchange factor 2, a protein involved in

vesicular trafficking, interacts with the β subunits of the GABA_A receptors. *Journal of Neurochemistry* 90: 173–189.

Chebib M. 2004. GABAC receptor ion channels. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 31: 800-4.

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.

Connaughton V., Nelson R., Bender A. 2008. Electrophysiological evidence of GABA_A and GABAC receptors on zebrafishretinal bipolar cells. *Vis Neuosci*. 23: 139-53.

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.

Connolly C. N., Uren J. M., Thomas P., Gorrie G. H., Gibson A., Smart T. G., Moss S. J. 1999. Subcellular localization and endocytosis of homomeric gamma2 subunit splice variants of gamma-aminobutyric acid type A receptors. *Mol Cell Neurosci*. 4: 259-71.

Crippa D., Schenk U., Francolini M., Rosa P., Verderio C., Zonta M., Pozzan T., Matteoli M., Carmignoto G. 2006. Synaptobrevin 2-expressing vesicles in rat astrocytes: insights into molecular characterization, dynamics and exocytosis. *J Physiol*. 570: 567-582.

Crossman A. R. y Neary D. 2007. *Neuroanatomía Texto y Atlas a color*. Manchester Reino Unido: MASSON.

Cutting GR., Lu L., O'Hara BF., Kasch LM. 1991. Cloning of the γ -aminobutyric acid (GABA) p1 cDNA: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 2673-2677.

Deitmer J. y Rose C. 2010. Ion changes and signalling in perisynaptic glia. *Brain research reviews*; 63: 113-129.

Delgado L. y Schmachtenberg O. 2008. Immunohistochemical localization of GABA, GAD65, and the receptor subunits GABA α 1 and GABAB1 in the zebrafish cerebellum. *Cerebellum*. 7: 444-50.

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. GABA $_B$ -mediated inhibition of calcium currents: a possible role in presynaptic inhibition. in *GABA $_B$ Receptors in Mammalian Function*, Wiley, Chichester. 259–271

Enz R. 2001. GABAC Receptors: A Molecular View. *Biol. Chem*. 382: 1111 – 1122.

Enz R; Cutting GR. 1998. Molecular composition of GABAC receptors. *Vision Res*. 38: 1431-1441.

Estrada-Mondragón A., Reyes-Ruiz J. M., Martínez-Torres A., Miledi R. 2010. Structure-function study of the fourth transmembrane segment of the GABA ρ 1 receptor. *PNAS* 107: 17780–17784.

Feigenspan A. 1994. Modulation of GABA ρ receptors in rat retinal bipolar cells by protein kinase C. *J Physiol*. 481: 325-30.

Feigenspan A. y J. Bormann. 1998. GABA-gated Cl⁻ channels in the rat retina. *Prog Retin Eye Res.* 17: 99-126.

Feigenspan A., Wässle H., Bormann J. 1993. Pharmacology of GABA receptor Cl⁻ channels in rat retinal bipolar cells. *Nature* 361: 159-162.

Fiszman M. L. 2005. Insights into GABA functions in the developing cerebellum, *Int. Rev. Neurobiol.* 71: 95–112.

Fraser D., Mudrick-Dannon L., MacVicar B. 1994. Astrocytic GABA receptors. *Glia* 11: 83-93.

Fraser D., Duffy S., Angelides K., Perez-Velazquez J., Kettenmann H., MacVicar B. 1995. GABA_A/benzodiazepine receptors in acutely isolated hippocampal astrocytes. *J Neurosci* 15: 2720–32.

Gage P. 1992. Activation and modulation of neuronal K⁺ channels by GABA. *Trends Neurosci* 15:46–51.

Ganat YM., Silbereis J., Cave C. 2006. Early postnatal astroglial cells produce multilineage precursors and neural stem cells in vivo. *J Neurosci.* 26: 8609–8621.

Gao Y., Ji R. 2010. Targeting astrocyte signaling for chronic pain. *Neurotherapeutics.* 7: 482-93.

Gilbert P., Kettenmann H., Schachner M. 1984. gamma-Aminobutyric acid directly depolarizes cultured oligodendrocytes. *J Neurosci.* 4: 561-569.

Graham A. R., Johnston., Mary Chebib., Jane R., Hanrahan., Kenneth N., Mewett. 2010. Neurochemicals for the Investigation of GABAC Receptors. *Neurochem Res.*

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.* 272:13750-7.

Halassa M. M., Fellin T., Haydon P. G. 2009. Tripartite synapses: roles for astrocytic purines in the control of synaptic physiology and behavior. *Neuropharmacology* 57: 343–346.

Hallonet ME., Teillet MA., Le Douarin NM. 1990. A new approach to the development of the cerebellum provided by the quail-chick marker system. *Development* 108:19–31.

Hanley J., Jones E., Moss S. 2000. GABA Receptor rho 1 subunit Interacts with a novel splice variant of the glycine transporter, GLYT-1. *J Biol Chem.* 276: 840-846.

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.

Haydon P. G. y Carmignoto G. 2006. Astrocyte control of synaptic transmission and neurovascular coupling. *Physiol. Rev.* 86: 1009–1031.

Henneberger C., Papouin T., Oliet S. H. R., Rusakov D. A. 2010. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature* 463: 232–236.

Hevers W., Korpi E., Lüddens H. 2000. Assembly of functional alpha6beta3gamma2delta GABA(A) receptors in vitro. *Neuroreport* 11:4103-6.

Hill D., Bowery N., Hudson A., 1984. Inhibition of GABA_B 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 GABA_BR1b and GABA_BR2 receptors. *Br. J Pharmacol* 129:80.

Hoogland T. M., Kuhn B. 2010. Recent developments in the understanding of astrocyte function in the cerebellum in vivo. *Cerebellum* 9: 264-71.

Hoshino M. 2006. Molecular machinery governing GABAergic neuron specification in the cerebellum. *Cerebellum* 5:193–198.

Housley G. 2011. Recent insights into the regulation of breathing. *Auton Neurosci.* 164: 3-5.

Inoue M., Matsuo T., Ogata N. 1985. Possible involvement of K⁺-conductance in the action of gamma-aminobutyric acid in the guinea-pig hippocampus. *Br J Pharmacol* 86:515–524.

Jechlinger M., Pelz R., Tretter V., Klausberger T. Sieghart W. 1998. Subunit composition and quantitative importance of hetero-oligomeric receptors: GABA_A receptors containing $\alpha 6$ subunits. *J. Neurosci.* 18, 2449–2457.

Johnston GAR. 1996. GABA_C 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.

Kandel ER., Schwartz JH., Jessell TM. 2000. Principles of neural science. México: Mc Graw-Hill Interamericana.

Kang J., Goldman L., S.A., Nedergaard M. 2003. Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat. Neuron* 40: 971-982.

Karbon E., Duman R., Enna S., 1984. GABA_B 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. y Bruce R. 1995. *Neuroglía*. New York, Oxford.

Kettenmann H., Gilbert P., Schachner M. 1984. Depolarization of cultured oligodendrocytes by glutamate and GABA. *Neurosci Lett.* 47: 271-276.

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.

Kinney G. A. y Spain W. J. 2002. Synaptically evoked GABA transporter currents in neocortical glia. *J Neurophysiol.* 88: 2899-908.

Klein C., Butt SJ., Machold RP. 2005. Cerebellum- and forebrain-derived stem cells possess intrinsic regional character. *Development* 132:4497–4508.

Kneussel M. 2002. Dynamic regulation of GABA receptors at synaptic sites. *Brain research views* 39: 74-83.

Komuro H., Yacubova E., Rakic P. 2001. Mode and tempo of tangential cell migration in the cerebellar external granular layer. *J Neurosci.* 21: 527–540.

Koziol L., Budding D., Chidekel D. 2011. From movement to thought: executive function, embodied cognition and the cerebellum. *Cerebellum.* 12311: 1473-80

Kreft M. 2009. Regulated exocytosis and vesicle trafficking in astrocytes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1152: 30–42.

Krueger J., Taishi P., De A., Davis C., Winters B., Clinton j., Szentirmai E., Zielinski M. 2010. ATP and the purine type 2 X7 receptor affect sleep. *J. Appl Physiol.* 109: 1318-27.

Lalo U., Pankratov Y., Parpura V., Verkhratsy A. 2010. Ionotropic receptors in neuronal-astroglial signaling: What is the role of “excitable” molecules in non-excitable cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research.* 1813: 992-1002.

Laurie D. J., Seeburg P. H. y Wisden W. 1992 The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum. *J. Neurosci.* 12, 1063–1076.

Lee A., Kessler JD., Read TA. 2005. Isolation of neural stem cells from the postnatal cerebellum. *Nat Neurosci.* 8:723–729.

Lee S., Bo-Eun Y., Ken B., Soo-Jin., Hyungju P., Hee-Sup., George J., Justin L. 2010. Channel-mediated tonic GABA release from glia. *Science* 330: 790-796.

Leto K., Carletti B., Williams IM. 2006. Different types of cerebellar GABAergic interneurons originate from a common pool of multipotent progenitor cells. *J Neurosci.* 26:11682–11694.

Le Novère N. y Changeux J. 1999. The Ligand Gated Ion Channel Database. *Nucleic Acids Res.* 27:340-342.

Liu X., Wang Q., Haydar T. F., y Bordey A. 2005. Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP expressing progenitors. *Nat. Neurosci.* 8, 1179–1187.

Lledo P. M., Alonso M., y Grubb M.S. 2006. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 179–193.

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.

López-Juarez A. 2008. Receptores y transportadores en la glía de Bregmann: posibles funciones en la fisiología del cerebelo. *Rev Neurol.* 47: 527-535.

Lukasiewicz P., Colleen R., Shields. 1998. Different combinations of GABA_A and GABA_C receptors confer distinct temporal properties to retinal synaptic responses. *J Neurophysiol.* 79: 3157-3167.

Lukasiewicz P., Erika D., Botir T., Sagdullaev., McCall A. 2004. GABA_C receptor-mediated inhibition in the retina. Elsevier Ltd.: 3289–3296.

Lukasiewicz 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. y Wong R. 1997. GABA_C receptors on ferret retinal bipolar cells: a diversity of subtypes in mammals? *Vis. Neurosci.*, 14, 989-994.

Lüddens H., Pritchett DB., Köhler M., Killisch I., Keinänen K., Monyer H., Sprengel R., Seeburg PH. 1990. Cerebellar GABAA receptor selective for a behavioural alcohol antagonist. *Nature* 346: 648-51.

Macdonald R. y Olsen R. 1994. GABAA receptor channels. *Annual Review of Neuroscience* 17: 569-602.

Machold R. y Fishell G. 2005. Math1 is expressed in temporally discrete pools of cerebellar rhombic-lip neural progenitors. *Neuron* 48:17–24.

Malchow R. P., Qian H. 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.

Maricich SM. y Herrup K. 1999. Pax-2 expression defines a subset of GABAergic interneurons and their precursors in the developing murine cerebellum. *J Neurobiol.* 41:281–294.

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 ρ 2 receptors in retinal bipolar neurons and cerebellar astrocytes in culture. *Neuroreport* 22:4–9.

Martínez-Martínez A., Reyes-Ruiz J., Martínez-Torres A., Miledi R. 2004. Functional expression in frog oocytes of human rho1 receptors produced in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101: 682-6.

Martínez-Torres A. y Miledi R. 2004. Expression of functional receptors by the human gamma-aminobutyric acid A gamma 2 subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 3220-3223.

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

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 RL. y Olsen RW. 1994. GABA_A receptor channels. *Ann Rev Neurosci.* 17: 569-602.

McKernan RM. y Whiting PJ. 1996. Which GABAA-receptor subtypes really occur in the brain?. *Trends Neuro Sci.* 19: 386.

Meier S., Kafitz K., Rose C. 2008. Developmental profile and mechanisms of GABA-induced calcium signaling in hippocampal astrocytes. *Glia* 56: 1127–37.

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

Miale IL. y Sidman RL. 1961. An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Exp Neurol.* 4:277–296.

Milligan C., Buckely N., Garret M., Deuchars J., Deuchars S. 2004. Evidence for unhibition mediated by coassembly of GABAA and GABA_C receptor subunits in native central neurons. *J Neuroscience* 18:24: 7241-50.

Mong J., Nunez J., McCarthy M. 2002. GABA mediates steroid-induced astrocyte differentiation in the neonatal rat hypothalamus. *J Neuroendocrinol* 14: 45–55.

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.

Müller T., Fritschy J. M., Grosche J., Möhler H., Kettenmann H. 1994. Developmental regulation of voltage-gate K⁺ channel and GABA receptor expression in Bergmann glial cells. *J. Neurosci.* 14: 2503-2514.

Newman E. 2001. Propagation of intracellular calcium waves in retinal astrocytes and Müller cells. *J. Neurosci.* 21: 2215-2223.

Newmann E. 2003. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci.* 26: 536-542.

Nguyen L., Malgrange B., Breuskin I., Bettendorff L., Moonen G., Belachew S. y Rigo J. M. 2003. Autocrine/paracrine activation of the GABA(A) receptor inhibits the proliferation of neurogenic polysialylated neural cell adhesion molecule-positive (PSA-NCAM+) precursor cells from postnatal striatum. *J. Neurosci.* 23: 3278–3294.

Nilsson M., Eriksson P., Ronnback L., Hansson E. 1993. GABA induces Ca²⁺ transients in astrocytes. *Neuroscience* 54: 605–14.

Odagaki Y., Nishi N., Koyama T. 2000. Functional coupling of GABA_B 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

Odagaki Y. y Koyama T. 2001. Identification of G alpha subtype(s) involved in gamma-aminobutyric acid_B receptor-mediated high-affinity guanosine triphosphatase activity in rat cerebral cortical membranes. *Neurosci Lett.* 297:137–141

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 RW. 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 RW. y Tobin AJ. 1990. Molecular Biology of GABA_A receptors. *FASEB J* 4: 1469-1480.

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.

Otis T. S., Kavanaugh M. P., Jahr C. E. 1997. Postsynaptic glutamate transport at the climbing fiber-Purkinje cell synapse. *Science* 277: 1515-8

Owens D. F. y Kriegstein A. R. 2002. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 715–727.

Parpura V., Basarsky T. A., Liu F., Jeftinija K., Jeftinija S., Haydon P. G. 1994. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369: 744-7.

Parpura V., Baker B., jeras M., Zorec R. 2010. Regulated exocytosis in astrocytic signal integration. *Neurochem Int.* 57: 451-9.

Pascual O., Casper K. B., Kubera C., Zhang J., Revilla-Sanchez R., Sul J.-Y., Takano H., Moss S. J., McCarthy K., Haydon P.G. 2005. Astrocytic purinergic signaling coordinates synaptic networks. *Science* 310: 113–116.

Pasti L., Volterra A., Pozzan T., Carmignoto G. 1997. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J. Neurosci.* 17: 7817-7830.

Perea G., Navarrete M., Araque A. 2009. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends in neuroscience* 32: 8

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

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

Platel J., Lacar B., Bordey A. 2007. GABA and Glutamate signaling: homeostatic control of adult forebrain neurogenesis. *J Mol Histol.* 38: 303-311.

Polenzani L., Woodward RM., Miledi R. 1991. Expression of mammalian γ -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

Poulter M.O., Barker J.L., O'Carroll A.M., Lolait S.J., Mahan L.C. 1992. Differential and transient expression of GABAA receptor alpha-subunit mRNAs in the developing rat CNS. *Journal of Neuroscience* 12, 2888e2900.

Potokar M., Kreft M., Panqrsic T., Zorec R. 2005. Vesicle mobility studied in cultured astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 329: 678-683.

Potokar M., Kreft M., So-Young L. Takano H., Philip G. Haydon., Zorec R. 2009. Trafficking of astrocytic vesicles in hippocampal slices. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 390 1192–1196.

Qian H., Dowling JE. 1993. Novel GABA responses from rod-driven retinal horizontal cells. *Nature* 361: 159-162.

Qian H. y Ripps H. 1999. Response kinetics and pharmacological properties of heteromeric receptors formed by coassembly of GABA ρ - and γ 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.

Ragozzino D., Woodward R. 1996. Design and in vitro pharmacology of a selective gamma-aminobutyric acidC receptor antagonist. *Mol Pharmacol.* 50: 1024-1030.

Rasom BR. y Kettenmann H. 1990. Electrical coupling, without dye coupling, between mammalian astrocytes and oligodendrocytes in cell culture. *Glia* 3: 258-66

Reichenbach A., Derouiche A., Kirchooff F. 2010. Morphology and dynamics of perrisynaptic glia. *Brain research reviews* 63: 11-25

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.

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

Rosas-Arellano A., Ochoa-de la Paz LD., Miledi R., Martínez-Torres A. 2007. Brain distribution and molecular cloning of the bovine GABA ρ 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) ρ receptors in hippocampal spontaneous activity and their distribution in hippocampus, amygdala and visual cortex. *Neuroscience Letters*. 500: 20–2.

Rosas-Arellano A. Distribution of GABA ρ subunits in cerebellum. In process.

Rosewater K., y Sontheimer H. 1994. Fibrous and protoplasmic astrocytes express GABAA receptors that differ in benzodiazepine pharmacology. *Brain Res*. 636: 73–80.

Rozzo A., Armellin; M. 2002. Expression and dendritic mRNA localization of GABA ρ receptor rho1 and rho2 subunits in developing rat brain and spinal cord. *Eur Journal Neuros*. 15: 1747-1758.

Runquist M. y Alonso G. 2003. GABAergic signaling mediates the morphological organization of astrocytes in the adult rat forebrain. *Glia* 41: 137–51.

Sambrook J. 2001. *Molecular cloning. A laboratory manual*. . EUA, Russell D. Press.

Schipke C. G., Boucsein C., Ohlemeyer C., Kirchhoff F., Kettenmann H. 2002. Astrocyte Ca²⁺ waves trigger responses in microglial cells in brain slices. *FASEB J*. 16: 255-257.

Scolari M., Acosta G. 2007. D-serine: a new word in the glutamatergic neuro-glia language. *Amino Acids* 33: 563-574.

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.

Siegel G., Wayne A., Brady S., Price D. 2006. *Basic Neurochemistry Molecular, cellular and medical aspect*. Canadá, ELSEVIER.

Silbereis J., Ganat Y. M., Ment L. R., Vaccarino F. M. 2009. Precursors with GFAP promoter activity transiently generate GABA interneurons in the postnatal cerebellum. *NIH-PA 27*: 1152–1163.

Soghomonian J. y Martin D. 1998. Two isoforms of glutamate descarboxylase: why?. *Trends Pharmacol. Sci.* 19: 500-505.

Song X., Meng F., Ramsey D., Ripps H., Qian H. 2005. The GABA rho1 subunit interacts with a cellular retinoic acid binding protein in mammalian retina. *Neuroscience* 136: 467-475.

Sontheimer H., Becker C., Pritchett D., Schofield P., Grenningloh G., Kettenmann H., Betz H., Seeburg P. 1989. Functional chloride channels by mammalian cell expression of rat glycine receptor subunit. *Neuron* 2: 1491-1497.

Sontheimer H., Black J., Ransom B., Waxman SG. 1992. Ion channels in spinal cord astrocytes in vitro. I. Transient expression of high levels of Na⁺ and K⁺ channels. *J Neurophysiol.* 68: 985-1000.

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

Stewart R., Hoge G., Zigova T., y Luskin M. 2002. Neural progenitor cells of the neonatal rat anterior subventricular zone express functional GABA(A) receptors. *J. Neurobiol.* 50: 305–322.

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

Strata P. Scelfo B. Sacchetti B. 2011. Involvement of Cerebellum in Emotional Behavior. *Physiol. Res.* 60: 39-48.

Striedinger K., Meda P., Scemes E. 2007. Exocytosis of ATP from astrocyte progenitors modulates spontaneous Ca^{2+} oscillations and cell migration. *Glia* 55: 652-62.

Takayama C. e Inoue Y. 2004a. Morphological development and maturation of the GABAergic synapses in the mouse cerebellar granular layer. *Brain Res. Dev. Brain Res* 150: 175–188

Takayama C. e Inoue Y. 2004b. Transient expression of GABAA receptor $\alpha 2$ and $\alpha 3$ subunits in differentiating cerebellar neurons. *Developmental Brain Research* 148: 169–177.

Takayama C. 2005. Formation of GABAergic synapses in the cerebellum. *Cerebellum* 4: 171–177.

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.

Tateishi N., Shimoda T., Manako J., Katsumata S., Shinagawa R., Ohno H. 2006. Relevance of astrocytic activation to reductions of astrocytic GABA_A receptors. *Brain Res.* 1089: 79-91.

Tozuka Y., Fukuda S., Namba T., Seki T., Hisatsune T. 2005. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron* 47: 803–15.

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 δ 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

Vélez-Fort M., Audinat E., Angulo M. 2011. 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.

Volterra A. y Bezzi P. 2002. Release of neurotransmitters from glial cells. In tripartite synapse: Glia in synaptic transmission. Oxford University Press.

Voogd J. y Glickstein M. 1998. The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci.* 21: 370-375.

Wang T., Guggino W., Cutting G. 1994. A novel gamma-aminobutyric acid receptor subunit ($\rho 2$) cloned from human retina forms bicuculline-insensitive homooligomeric receptors in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci. Res.* 14: 6524–6231.

Wang X., Lou N., Xu Q., Tian G., Peng W., Han X., Kang J., Takano T., Nedergaard M. 2006. Astrocytic Ca^{2+} signaling evoked by sensory stimulation in vivo. *Nat. Neurosci.* 9: 816-823.

Wang D., Krueger D., y Bordey A. 2003b. GABA depolarizes neuronal progenitors of the postnatal subventricular zone via GABAA receptor activation. *J. Physiol. (Lond.)* 550, 785–800.

Wegelius K., Pasternack M. 1998. Distribution of GABA receptor rho subunit transcripts in the rat brain. *Eur J Neurosci.* 10: 350-357.

Weisheit G., Gliem M., Endl E. 2006. Postnatal development of the murine cerebellar cortex: formation and early dispersal of basket, stellate and Golgi neurons. *Eur J Neurosci.* 24:466–478.

Woodward R., Polenzani L., Miledi R. 1992. Characterization of Bicuculline/Baclofen-Insensitive γ -Aminobutyric Acid Receptors Expressed in *Xenopus* Oocytes I. Effects of C1 Channel Inhibitors. *Mol Pharm.* 42: 165-173.

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

Young S., Platel Jean-Claude., Jakob V., Nielsen., Niels A., Jensen., Bordey A. 2010. GABAA increases calcium in subventricular zone astrocyte-like cells through L- and T-type voltage-gated calcium channels. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 4: 8.

Zhang D., Pan Z., Zhang X., Brideau A. y Lipton S. 1995. Cloning of a gamma-aminobutyric acid type C receptor subunit in rat retina with a methionine residue critical for picrotoxinin channel block. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92: 11756–11760

Zhao C., Deng W. y Gage F. H. 2008. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132: 645–660.

Zhang J., Wang H., Ye c Q., Ge W., Chen Y., Jiang Z., Wu C., Poo M., Duan S. 2003. ATP released by astrocytes mediates glutamatergic activity-dependent heterosynaptic suppression. *Neuron* 40: 971-982.

Zhang Z., Gong N., Wang W., Xu L., Xu T. L. 2008. Bell-shaped D-serine actions on hippocampal long-term depression and spatial memory retrieval. *Cereb. Cortex* 18: 2391–2401.

Zheng W., Santi M., Bovolín P., Marlier L., Grayson D. 1993. Development expression of the $\alpha 6$ GABAA receptor subunit mRNA occurs only after cerebellar granule cell migration. *Developmental Brain Research* 75: 91-103.

Zhu J., Wei X., Liu J., Hu Y., Xu J. 2009. Interaction of glia activation and neurotransmission in hippocampus of neuropathic rats treated with mirtazapine. *Exp. Clin. Psychopharmacol.* 17: 198–203.

11. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vías de síntesis de GABA	3
Figura 2. Diagrama de la síntesis y transporte de GABA en la sinapsis	4
Figura 3. Modelo estructural de GABA ρ 1	9
Figura 4. Expresión de GABA ρ 1 y GABA ρ 2 en neuronas de Purkinje del cerebelo de ratón adulto	14
Figura 5. Expresión de GABA ρ en células gliales del cerebelo	16
Figura 6. Morfología de astrocitos GFAP ⁺ en cultivo con medio DMEM	24
Figura 7. . Expresión de GABA ρ 1, GABA ρ 2, GFAP y tubulina en astrocitos de cerebelo de ratón en cultivo y en retina	25
Figura 8. Distribución GABA ρ 1 en astrocitos de cerebelo de ratón en cultivo	26
Figura 9. Doble inmunocitofluorecencia para GABA ρ 1 y GFAP ⁺	27
Figura 10. Inmunoreactividad para GABA ρ 2 en cultivos primarios de astrocitos del cerebelo de ratón.	28
Figura 11. Doble inmunocitofluorecencia para GABA ρ 1 y GFAP ⁺	29
Figura 12. Corrientes dependientes de voltaje en astrocitos en cultivo	30
Figura 13. Respuestas a GABA en astrocitos en cultivo	31
Figura 14. Curva de desensibilización a GABA en astrocitos en cultivo	33
Figura 15. Inhibición de las respuestas mediadas por GABA en astrocitos en cultivo.	35
Figura 16. Curva concentración-respuesta de TPMPA en astrocitos en cultivo	36
Figura 17S. Distribución de la proteína quimérica GABA ρ 2-GFP en astrocitos en cultivo.	69

12. LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades funcionales y farmacológicas de los receptores ionotrópicos GABA _A y GABA _ρ	10
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR	20

13. INFORMACIÓN SUPLEMENTARIA

Expresión de GABA ρ 2-GFP por medio de Infección adenoviral de cultivos primarios de astrocitos

Con el fin de dilucidar el tráfico de GABA ρ 2, se construyó un vector adenoviral que lleva la fusión de los genes que codifican para la proteína verde fluorescente (GFP) y para GABA ρ 2. Tras infectar los astrocitos en cultivo con el adenovirus que porta la quimera GABA ρ 2-GFP (Fig. 17S-A), encontramos que el tamaño de los cúmulos de GABA ρ 2-GFP miden \sim 100nm de diámetro, tamaño similar a otras proteínas transportadas en vesículas en astrocitos (Crippa et al., 2006., Potokar et al., 2005) y se encuentran distribuidos mayoritariamente en el soma (37 ± 8 cúmulos) y en menor proporción en los procesos (9 ± 4 cúmulos) (Fig. 17S-C). La mayoría de los cúmulos de GABA ρ 2-GFP no muestran un direccionamiento selectivo, comportamiento similar al de los receptores CBR1 (Osborne et al., 2009) en astrocitos (Martínez-Delgado et al., 2011). Estos resultados señalan que GABA ρ 2 se encuentra principalmente en los somas como pequeños cúmulos estáticos cuyo desplazamiento es inferior a $1 \mu\text{m/s}$.

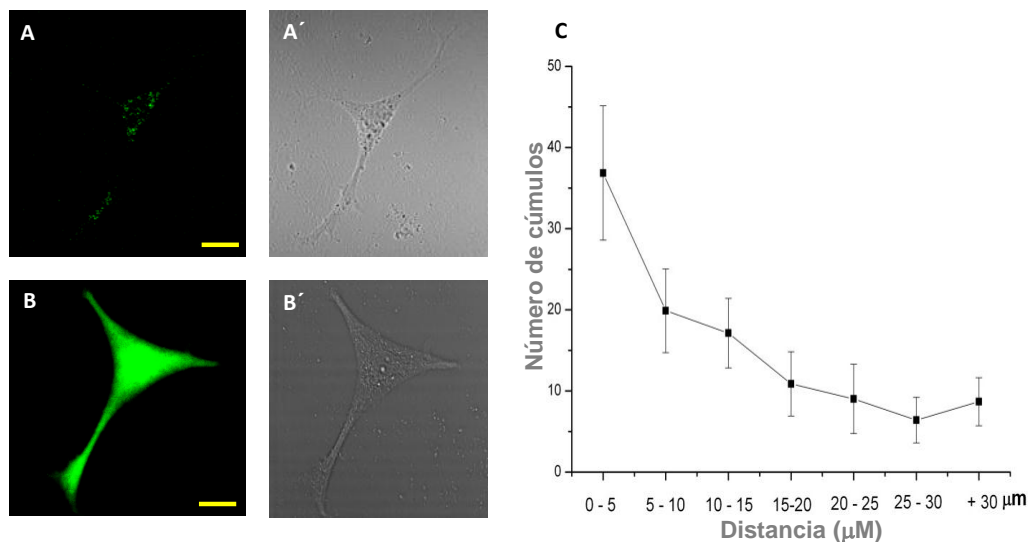


Figura 17S. Distribución de la proteína quimérica GABA ρ 2-GFP en astrocitos en cultivo. A. Expresión de GABA ρ 2-GFP. **B.** Expresión de GFP. **A' y B'.** Imágenes en contraste de interferencia (DIC) de las correspondientes células. **C.** Distribución de los cúmulos de fluorescencia de GABA ρ 2-GFP a lo largo de los procesos astrocíticos (Tomado de Martínez-Delgado et al., 2011).