



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS:

**“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL FENOTIPO
GABAÉRGICO EN RATÓN DURANTE EL
DESARROLLO”**

Para obtener el grado de:
Licenciado en Biotecnología

Presenta:

Tonatiuh Segura Sánchez

Asesores de tesis:

Dr. Arturo Venebra Muñoz
Dr. José Alfredo Méndez Cabañas

Toluca, Edo de México
Julio, 2017.

ÍNDICE

RESUMEN	3
I.- INTRODUCCIÓN	4
<i>GABA</i>	5
<i>Substancia nigra y Área tegmental ventral</i>	10
II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
III.- OBJETIVOS.....	14
<i>Objetivos generales</i>	14
<i>Objetivos Particulares</i>	14
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
<i>Diseño de Primers</i>	15
<i>Obtención de muestras biológicas</i>	15
<i>Selección de las edades</i>	16
<i>Extracción de RNA</i>	17
<i>Retrotranscripción (RT-PCR)</i>	17
<i>Estandarización de PCR Multiplex</i>	18
V.- RESULTADOS	21
VI.- DISCUSIÓN.....	33
VII.- CONCLUSIONES	37
VIII.- BIBLIOGRAFÍA:.....	38

RESUMEN

Las neuronas dopaminérgicas y glutamatérgicas desempeñan un papel importante en la conectividad dentro del mesencéfalo en el cerebro, específicamente las áreas de la sustancia nigra y el área tegmental ventral. Estas áreas están relacionadas con diversos comportamientos en la conducta los cuales mantienen su presencia gracias a la integridad que existe en la red neuronal entre ambos fenotipos. Existe un tercer fenotipo, conformado por neuronas GABAérgicas, que también forman parte de la misma red neuronal las cuales modulan la actividad de los demás fenotipos, sin embargo el sistema GABAérgico ha sido poco caracterizado a diferencia de los otros. Por mucho tiempo se han tomado a las enzimas GAD65 y GAD67 como marcadores esenciales para la identificación de neuronas GABAérgicas, sin tomar en cuenta la participación de otros marcadores necesarios para la caracterización del fenotipo, como el transportador VGAT y la enzima ALDH1a1. Por lo tanto la identificación del fenotipo en este tipo de neuronas permanece incompleta. El principal objetivo del siguiente trabajo es definir el fenotipo GABAérgico completo mediante la expresión de los 4 marcadores neuronales específicos para dicho fenotipo.

I.- INTRODUCCIÓN

El mesencéfalo es un importante centro de integración neuronal que se encuentra dentro del sistema nervioso central (SNC) donde diferentes tipos neuronales controlan diversos aspectos en los procesos de comportamiento, motrices, sensoriales, de motivación y recompensa. En esta área anatómica del cerebro se realizan cada vez más estudios que aportan información sobre la caracterización de las poblaciones y fenotipos neuronales, así como las proyecciones aferentes o eferentes dentro de esa región [1, 2, 3]. Tanto las neuronas dopaminérgicas (que usan dopamina como neurotransmisor) como las glutamatérgicas (que usan glutamato como neurotransmisor) son dos poblaciones neuronales que forman parte de un circuito dentro de la sustancia nigra (SN) y el área tegmental ventral (VTA, por sus siglas en inglés, *Ventral Tegmental Área*), regiones del sistema dopaminérgico del mesencéfalo [4, 5, 6]. Estos dos fenotipos forman parte de una intrincada red de comunicación celular que tiene como finalidad la codificación y decodificación de señales en la actividad eléctrica, implicadas en procesos tales como la motivación, la recompensa, la instrumentación motriz, la predicción de errores, memoria de trabajo, así como con eventos relacionados a la adicción, aversión y depresión [7, 8, 9], por lo que el mesencéfalo es un importante centro de relevo de *inputs* sensoriales y *outputs* motrices. A la fecha existen diversas líneas de investigación que se encuentran caracterizando dichos fenotipos, así como sus implicaciones dentro de la red tanto a nivel de tejido como en células individuales.

GABA

El ácido γ -aminobutírico, mejor conocido como GABA, es el neurotransmisor inhibitorio por excelencia y junto con Glicina, otro neurotransmisor inhibitorio, contribuyen en el balance dentro de la comunicación neuronal entre los estados binarios de inhibición/excitación en las diferentes redes neuronales dentro del sistema nervioso central maduro, donde más de un tercio de las sinapsis utilizan GABA como su neurotransmisor.

GABA actúa sobre un grupo de receptores transmembranales cuya función es la hiperpolarización la cual reduce la excitabilidad neuronal e impide el influjo de iones calcio (Ca^{2+}), disminuyendo así la posibilidad de generar potenciales de acción. Los receptores GABAérgicos pueden encontrarse tanto presinápticos, es decir la neurona que libera el neurotransmisor, como postsinápticos, aquella neurona blanco sobre la cual actúa el neurotransmisor [10].

Los receptores GABAérgicos están divididos en tres subtipos: los receptores GABA_A , y GABA_C localizados en todo el sistema nerviosos, ambos son receptores de tipo ionotrópico y se caracterizan por generar una respuesta rápida ante la unión de GABA, su ligando. Por otro lado los receptores GABA_B son de tipo metabotrópico y se encuentran acoplados a proteínas G, participando en acciones más lentas y prolongadas. Los receptores GABA_A en particular tienen un papel importante en el cerebro, en donde los déficits en su expresión funcional son críticos en enfermedades como la epilepsia, trastornos de ansiedad, déficits cognitivos, esquizofrenia, depresión y abuso de sustancias [11, 12].

La síntesis de GABA se realiza principalmente a partir de la síntesis de glutamato, el cual a su vez se sintetiza por enzimas específicas en el ciclo de Krebs a partir de glucosa, piruvato y glutamina. Mientras la mayoría de los neurotransmisores son sintetizados por una sola enzima, la biosíntesis de GABA a partir de glutamato es catalizada por 2, la glutamato descarboxilasa (GAD) de 65 kDa de peso (GAD65) y la de GAD67 de 67 kDa de peso (GAD67), isoenzimas que son codificadas por 2

genes diferentes, las cuales funcionan de manera sincronizada para producir y regular los niveles fisiológicos de GABA (figura 1). Ambas enzimas comparten una gran similitud e identidad en su secuencia de aminoácidos, pero existen diferencias notables en sus mecanismos de acción [13].

La enzima GAD67 se encuentra mayormente en el citosol de las neuronas GABAérgicas y cataliza la conversión del glutamato en GABA mediante un cofactor derivado de la vitamina B6 llamado piridoxal 5' fosfato o PLP (grupo prostético ligado a ciertas enzimas), que requiere la enzima para su actividad y poder establecer los niveles basales necesarios de GABA.

La enzima GAD65, asociada a la membrana y también abundante en las células β de los islotes pancreáticos, existe principalmente como apoenzima, es decir sin ningún co-factor unido a ella. GAD65 puede ser transformada en su forma activa (holoenzima) mediante la unión del co-factor PLP si las condiciones lo requieren, por ejemplo como una respuesta al estrés. Por lo tanto ambas enzimas presentan cinéticas diferentes para la producción de GABA [14, 15].

Por otro parte, la enzima aldehído deshidrogenasa Aldh1a1, también es capaz de sintetizar el neurotransmisor GABA a partir de una vía conservada encontrada tanto en plantas como en mamíferos (figura 1). Esta vía alterna puede sintetizar GABA a partir de un producto originado de la diamina putrescina (1,4- diamino-butano) denominado butiraldehído, formando así parte del fenotipo GABAérgico [16]. Esta enzima es también abundante en el citosol y es expresada en la parte ventral del mesencéfalo [17].

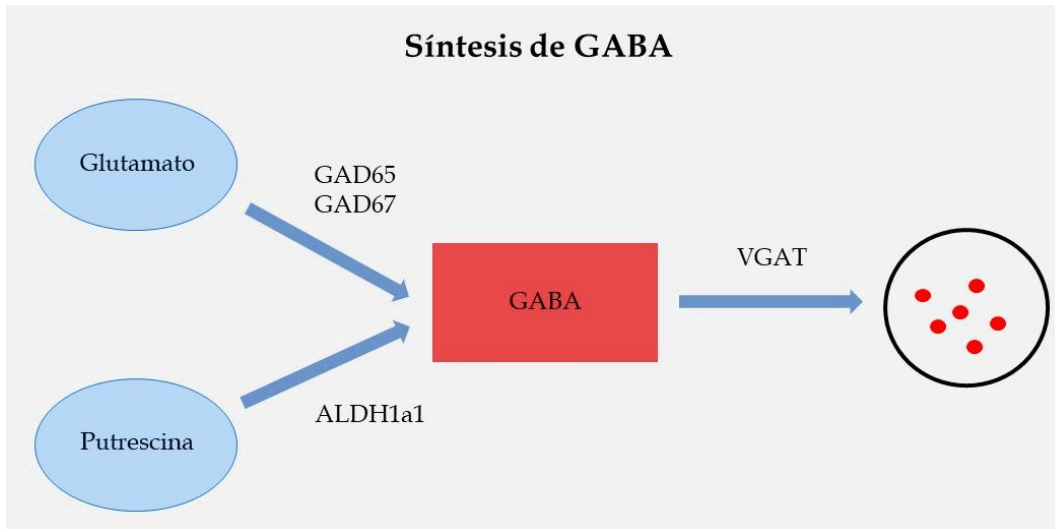


Figura 1. Síntesis de GABA. Diagrama que muestra las 2 vías distintas bajo las que el neurotransmisor GABA puede ser sintetizado y posteriormente empaquetado en vesículas sinápticas.

Adicionalmente las neuronas que liberan dopamina como neurotransmisor también pueden liberar GABA, sintetizándolo *de novo*, por la enzima Aldh1a1 mediante vías biosintéticas diferentes a las convencionales sin requerir de GAD65 y GAD67, por lo que pueden liberar GABA ya sea produciéndolo o capturándolo del medio extracelular a través de los transportadores membranales de GABA.

Una vez que GABA es sintetizado, es empaquetado en vesículas sinápticas a través del transportador vesicular de GABA, conocido como VGAT (por sus siglas en inglés, *Vesicular GABA Transporter*). Este proceso de empaquetamiento es posible gracias a cambios en las concentraciones acídicas de las vesículas, por acción de la bomba vesicular de protones denominada V-ATPasa, componente universal en todas ellas, la cual acidifica el compartimento intracelular y en conjunto con el transportador logran la carga de las vesículas con el neurotransmisor [18]. Finalmente, y como en todos los casos, mediante un proceso dependiente de calcio (Ca^{2+}), se favorecerá la fusión de las vesículas a la membrana pre sináptica y la posterior liberación del neurotransmisor.

Dentro del estriado dorsal y el Núcleo Accumbens (NAc), las neuronas dopaminérgicas, las cuales expresan la enzima TH (tirosina hidroxilasa), pueden liberar GABA mediante el transportador vesicular de monoaminas tipo dos, conocido como VMAT2 (por sus siglas en inglés, *Vesicular Monoamine Transporter*). Este fenotipo en particular carece de la expresión de los marcadores para GAD65, GAD67 y VGAT, por lo tanto se cree que en ausencia de VGAT, GABA puede ser empaquetado en vesículas sinápticas mediante el transportador VMAT2, lo cual significa una coexistencia vesicular de los neurotransmisores GABA y dopamina. A pesar de que en la literatura se encuentra reportado la forma en que GABA puede ser transportado por VMAT2 [19, 20], es químicamente improbable que esto ocurra de acuerdo a otro tipo de estudios, lo cual resulta controversial. Sin embargo es posible que exista un transportador, además de VGAT, que pueda llevar a cabo esta función.

GABA es capturado del medio extracelular por los transportadores de GABA, conocidos como GAT1-4, los cuales pueden estar presentes en la membrana de las terminales axonales dopaminérgicas. A diferencia de VGAT, los GAT's se encuentran alrededor de la membrana celular tanto en las neuronas como en células gliales [21].

Una vez liberado en el espacio sináptico, GABA, actúa sobre cualquiera de sus receptores. Eventualmente la mayoría del neurotransmisor será recapturado tras las sinapsis por transportadores específicos ubicados en la neurona, células gliales y astrocitos [22], el cual posteriormente se convertirá en succinato mediante las enzimas de origen mitocondrial GABA transaminasa y succínico semialdehído deshidrogenasa (SSADH) para finalmente entrar de vuelta al ciclo de Krebs para su metabolización, mediando así la síntesis de ATP.

Las sinapsis GABAérgicas se encuentran en diversas regiones del encéfalo, como lo son el cerebelo, la corteza cerebral, el hipocampo, el tálamo, el bulbo olfatorio, los ganglios basales y la retina. Durante el desarrollo GABA ejerce un papel como

factor trófico a través de la excitación (despolarización) e incremento de las concentraciones intracelulares de calcio, ambas condiciones esenciales para el crecimiento y la plasticidad neuronal [23]. La presencia del neurotransmisor GABA así como los diferentes niveles de expresión son de suma importancia durante el desarrollo embrionario, ya que diversos estudios han demostrado que la falta de GABA o de sus componentes biosintéticos en el cerebro, ocasiona fenotipos aberrantes (paladar hendido, onfalocele, convulsiones y epilepsia) los cuales guardan una relación con respecto a la cantidad ausente del neurotransmisor en el organismo [24, 25], y condiciones patológicas postnatales como la esquizofrenia, alterando el equilibrio entre la excitación-inhibición.

A pesar de que GABA actúa como neurotransmisor inhibitorio en el CNS maduro, en el caso del desarrollo embrionario es diferente. En neuronas inmaduras, NKCC1 moviliza cloro al interior celular utilizando el gradiente de sodio establecido previamente por la ATPasa sodio-potasio. Tras la activación del receptor GABA por su ligando, la salida del cloro a través del canal-receptor favorece la despolarización de la membrana. Durante la vida posnatal, la alta expresión de KCC2 sustituye a la de NKCC1; consecuentemente, la concentración de cloro extracelular es mayor con respecto al interior de la célula. Bajo estas condiciones, la transmisión GABAérgica cambia de excitatoria a inhibitoria [26].

Substancia nigra y área tegmental ventral

La substancia nigra es una estructura de los ganglios basales localizada en el mesencéfalo, bordeada dorsalmente por el *medial lemniscus* y ventralmente por los pedúnculos cerebrales. Está a su vez se divide en dos regiones: la substancia nigra *pars compacta* (SNc) y la substancia nigra *pars reticulata* (SNr). Estas estructuras contienen poblaciones neuronales dopaminérgicas, GABAérgicas y glutamatérgicas. Esta región está relacionada con conductas como: el movimiento fino, búsqueda de recompensas, memoria de trabajo y el aprendizaje, por mencionar las más importantes. [27, 28, 29, 30]. La desaparición de este tipo de neuronas es la causa de la enfermedad de Parkinson.

El VTA por otro lado es una estructura con poblaciones neuronales heterogéneas, conexiones y neurotransmisores, las cuales se encuentran relacionadas a diversos aspectos en la conducta, como: la motivación, la predicción de errores, el refuerzo en la expresión de comportamientos aprendidos, aversión, alta adicción a las drogas y la imprevisibilidad de recompensas adquiridas [9, 31]. El VTA está conectada con áreas como el Núcleo Accumbens (NAc), donde participa como fuente principal de dopamina, así como la amígdala y la habénula lateral, por mencionar algunas. El daño en esta región muestra diferentes desordenes psiquiátricos como la esquizofrenia, el síndrome de Tourette y la depresión. Aunque las neuronas dopaminérgicas son los componentes principales en este tipo de conductas, las neuronas GABAérgicas participan en comportamientos relacionados a la motivación independientemente de las neuronas dopaminérgicas [9].

Los diferentes fenotipos neuronales dentro de una misma área cerebral contienen diversos perfiles en los que varía el contenido de sus neurotransmisores, la conectividad dentro y fuera del circuito, la expresión de sus receptores y la expresión de enzimas necesarias para la síntesis del neurotransmisor. La doctrina de "una neurona, un neurotransmisor" establece que la comunicación sináptica entre dos neuronas se produce mediante la liberación de un solo transmisor químico.

Curiosamente se ha demostrado que en las neuronas ocurre un fenómeno denominado co-liberación, es decir que una neurona puede liberar más de un tipo de neurotransmisor bajo distintos modelos, lo que sugiere que existen diferentes fenotipos neuronales funcionales en el cerebro [32, 33].

Por ejemplo, el sistema mediante el cual los distintos fenotipos neuronales del VTA puede llevar a cabo la liberación de sus respectivos neurotransmisores es diverso y en general se pueden presentar de 3 formas distintas: 1) liberación de dopamina y glutamato de distintos compartimentos dentro del mismo axón, 2) liberación de glutamato y GABA de la misma terminal axonal y 3) la co-liberación de dopamina y GABA por la misma vesícula [34, 35, 36]. Para este último caso, se ha observado que las neuronas caracterizadas como TH-GAD positivas proyectan desde el VTA hacia la habénula lateral (LHb) donde pueden liberar el neurotransmisor GABA sobre neuronas glutamatérgicas. Por lo tanto proporcionan diferentes tipos de señalización, liberación y modulación de la actividad neuronal.

Las neuronas GABAérgicas son piezas clave en el circuito neuronal dentro del mesencéfalo, con una estrecha conexión en la red con neuronas glutamatérgicas y dopaminérgicas que dan forma a múltiples aspectos del comportamiento antes mencionados [9, 37], sin embargo el sistema GABAérgico en el mesencéfalo ha sido poco caracterizado en comparación a sus demás poblaciones neuronales. Por lo tanto las neuronas GABAérgicas no sólo funcionan como interneuronas inhibitoras locales formando parte de la misma red neuronal, sino también como neuronas que proyectan a diversas regiones cerebrales. Ya que el mayor número de neuronas que comprenden las áreas de la SN y el VTA son de tipo GABAérgico, se muestra interesante conocer el momento en el cual emerge dicho fenotipo durante el desarrollo y la implicación que esto podría tener.

II.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Históricamente, los marcadores utilizados en la identificación del fenotipo GABAérgico han sido las enzimas Glutamato Descarboxilasa (GAD) 65 Y GAD67, las cuales solas o en su conjunto son responsables de la síntesis de GABA. Sin embargo el fenotipo neurotransmisor de una neurona no puede ser definido solo en base a la habilidad para producir un neurotransmisor, además de eso se necesita la presencia de un transportador vesicular para su liberación, en el caso del fenotipo GABAérgico es VGAT quien lleva a cabo esa función. Adicionalmente, debido a que GABA también puede ser sintetizado por la enzima Aldh1a1 a partir de una vía alterna evolutivamente conservada en los mamíferos, también forma parte del fenotipo.

Por lo tanto debido a que se requiere la presencia de VGAT para la liberación del neurotransmisor y las solas enzimas involucradas en su síntesis no son indicativo de un fenotipo totalmente funcional, encontrar todos estos marcadores juntos significaría la caracterización completa del fenotipo GABAérgico, particularmente en las zonas de la SN y el VTA. De esta forma el presente trabajo pretende evaluar la expresión de GAD65, GAD67, Aldh1a1 y VGAT, lo cual representa la habilidad de una neurona para sintetizar y liberar el neurotransmisor.

Por otra parte considerando que el mayor porcentaje de neuronas dentro de la SN y el VTA son del tipo GABAérgico, dicho fenotipo debería aparecer durante el desarrollo. La caracterización completa del fenotipo GABAérgico en el mesencéfalo durante el desarrollo es importante porque cada vez es más claro que las neuronas tienen la habilidad de usar más de un neurotransmisor y la caracterización de los fenotipos es esencial para la identificación de fenómenos de co-transmisión y de la fisiología de los núcleos neuronales.

Por lo anterior, el estudio dedicado a poblaciones neuronales en el mesencéfalo como lo son las dopaminérgicas es amplio, en comparación con lo que se sabe hasta ahora de las poblaciones GABAérgicas, por lo tanto el propósito del presente

trabajo es el de determinar el fenotipo GABAérgico a lo largo del desarrollo embrionario y en etapas del crecimiento postnatal en el ratón, mediante la expresión de marcadores específicos para neuronas GABAérgicas, conformados por las isoenzimas glutamato descarboxilasa GAD65 y GAD67, importantes en la biosíntesis del neurotransmisor GABA, el transportador vesicular de GABA (VGAT) y la aldehído deshidrogenasa Aldh1a1.

III.- OBJETIVOS

➤ Objetivos generales

Determinar la existencia del fenotipo GABAérgico completo durante el desarrollo embrionario de la sustancia nigra y el área tegmental ventral en ratón.

➤ Objetivos Particulares

Evaluar la expresión de RNA mensajero a nivel de tejido para las enzimas Glutamato descarboxilasa GAD67 y GAD65 que participan en la biosíntesis del neurotransmisor GABA a partir del aminoácido glutamato.

Evaluar la expresión de RNA mensajero a nivel de tejido para el transportador vesicular de GABA (VGAT), encargado de capturar y empaquetar el neurotransmisor.

Evaluar la expresión de RNA mensajero a nivel de tejido para la enzima aldehído deshidrogenasa Aldh1a1 que participa como vía alterna en la síntesis del neurotransmisor GABA.

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño de Primers

Las secuencias codificantes de RNAm para los genes de β -actina, Gad65, Gad67, VGAT y ALDH1.1a de ratón fueron obtenidas de la base de datos GenBank. Los *primers* se diseñaron en diferentes exones para favorecer su especificidad. Todos los pares de *primers* fueron diseñados mediante Primer 3 y bajo Vector NTI10 Advance 10.3 (Invitrogen) se realizó el análisis de interacción termodinámica para cada primer. Se tomó en cuenta que para cada par de *primers* la amplificación de los productos fuera de distinto tamaño, respetando además una separación de aproximadamente 50pb entre ellos. Los siguientes parámetros fueron usados para el diseño de cada uno de los *primers*:

- 1.- T_M lo más cercana posible a 60°C.
- 2.- Longitud máxima de 25 nt.
- 3.- Autocomplementariedad con un valor de $\Delta G \leq -0.5$ kcal/mol dejando fuera la formación de estructuras secundarias de tipo tallo y burbuja.
- 4.- Interacción entre *primers* con un valor de $\Delta G \leq -1.0$ kcal/mol.

Finalmente se verificó que el producto final de los *primers* coincidiera con la secuencia a amplificar mediante el programa BLAST.

Obtención de muestras biológicas

Para el análisis de expresión en los genes mencionados anteriormente en la sección diseño de *primers*, se utilizaron muestras de mesencéfalo de ratón (BALB/c) tejidos extraídos manualmente mediante cortes coronales, secciones las cuales incluían los núcleos de la sustancia nigra y el área tegmental ventral. Se utilizaron 5 edades diferentes a lo largo del desarrollo embrionario y posnatal del ratón las cuales

constaron de dos edades embrionarias (E14.5 y E17), recién nacido (p0) y dos edades posnatales P7 y P14.

Para el control de las diferentes etapas gestacionales en las cuales serían colectados los tejidos, se estableció como día 0 a partir de la aparición del tapón de moco característico en las hebras recientemente fertilizadas.

Tanto para los ratones nacidos, como para las hembras de las cuales se extrajeron los embriones, así como estos últimos, el sacrificio fue mediante decapitación, previa anestesia con Isofluran (PISA agropecuaria, México).

Para la extracción de los embriones se realizó una incisión ventral en las hembras preñadas. Los embriones fueron colocados inmediatamente en solución de Krebs-Ringer a 4°C (en mM: 140 NaCl, 5 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, 10 glucosa, 6 sacarosa, pH 7.35, y 305 mOsm) así como la disección de cerebros que se obtuvieron posteriormente. Para el caso de los embriones se comparó las edades obtenidas con el *The e-Mouse Atlas* (EMA) para cerciorase de estar trabajando con las edades embrionarias correctas. Finalmente los tejidos fueron almacenados en microtubos a – 20°C hasta su uso.

Las disecciones de los tejidos se realizaron manualmente siguiendo las indicaciones del atlas *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* [38] y el *Atlas of the Developing Mouse Brain* [39] según correspondió a las edad de los ratones [40].

Selección de las edades

Las edades seleccionadas para analizar el perfil de expresión de las neuronas GABAérgicas se basaron en el sistema dopaminérgico como una guía a nuestro sistema. Se utilizaron las edades de E14.5, E17, posnatal 0 (p0), p7 y p14.

La edad E14.5 es útil porque en ese momento, tomando en cuenta el sistema dopaminérgico, todas las neuronas que se desplazarán hacia la región del

mesencéfalo han terminado su migración. E17 se utiliza debido a que para esa etapa las neuronas pertenecientes a la SN y el VTA ya se encuentran establecidas en sus respectivas regiones definitivas. p0 es importante ya que al momento del nacimiento existe una gran expresión de genes que hasta después de ese momento no se presentan. Por último, p14 es relevante ya que para esa edad todas las proyecciones neuronales dopaminérgicas con otras neuronas ya se han establecido. p7 será utilizado solo como una edad intermedia de referencia.

De esta manera y tomando en cuenta los datos anteriores se decidió escoger las diferentes edades a lo largo del desarrollo embrionario y posnatal con el fin de obtener una representación significativa del sistema dopaminérgico.

Extracción de RNA

La extracción de RNA total de todos los tejidos se realizó usando la técnica de Trizol (de Invitrogen) bajo el método sugerido del proveedor, con ligeras modificaciones en la técnica de trituración del tejido. Una vez obtenido el RNA se procedió a cuantificar la relación A260/A280 nm, a fin de obtener la pureza y concentración de la muestra con el equipo NanoDrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer. Todas las muestras presentaron una concentración mayor a .200 ng/ μ l y una pureza superior a 1.8.

Retrotranscripción (RT-PCR)

Para la técnica de síntesis de cDNA se estandarizó a una cantidad de 100 ng de RNA, para un volumen final de 20 μ l. Los reactivos y cantidades usadas por muestra de RNA fueron: 1 μ l de RH, 1 μ l dNTPs con un posterior calentamiento de las muestras a 65 °C por 5 minutos y un enfriamiento en hielo por 5 minutos.

Finalmente se adicionó 4 µl de Buffer 5X, 2 µl de DTT, 1 µl de RNA Out y 1 µl de MMLV por muestra, seguido de un calentamiento en ellas durante una hora a 37°C, más 15 minutos a 70° C. Una vez finalizado, las muestras se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso.

Estandarización de PCR Multiplex

Para la realización de las PCR multiplex se llegó a una estandarización de 40 ciclos (Figura 1), elaborando una curva que permitió encontrar el tiempo de amplificación óptimo en las muestras para la correcta expresión del fenotipo GABAérgico en el tejido. Por otro lado se realizó una curva del 10% (Figura 2), para asegurar la fiabilidad y sensibilidad de la técnica semi-cuantitativa, la cual permitió ver diferencias de hasta el 2% en el índice de expresión, con una $R^2 > 0.98$.

Durante la estandarización se obtuvieron concentraciones específicas para cada par de *primers* (no mostrado) a fin de alcanzar una resolución adecuada en las bandas de expresión para todas las PCR.

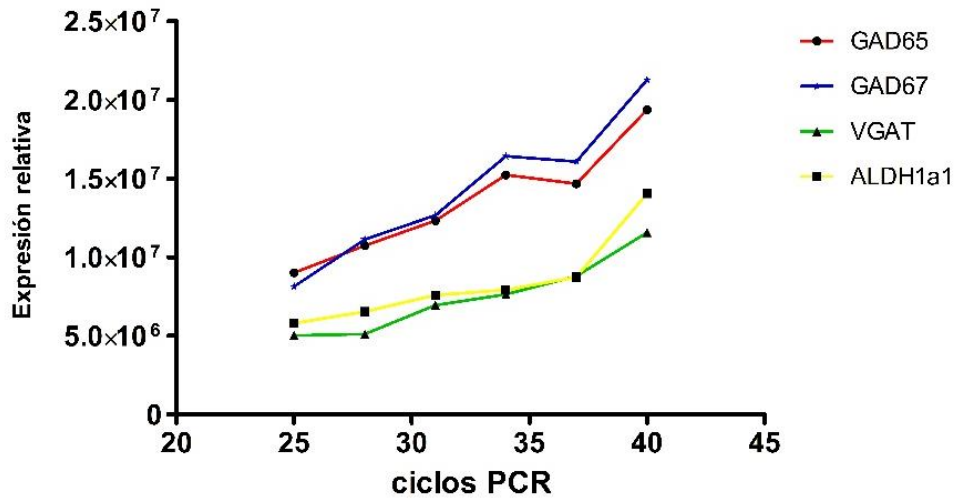


Figura 2. Curva de ciclos. Graficas que muestran el nivel de expresión para cada uno de los marcadores fenotípicos (GAD65, GAD67, VGAT y ALDH) con respecto al número de ciclos, puntos de cada línea, en cada una de las reacciones.

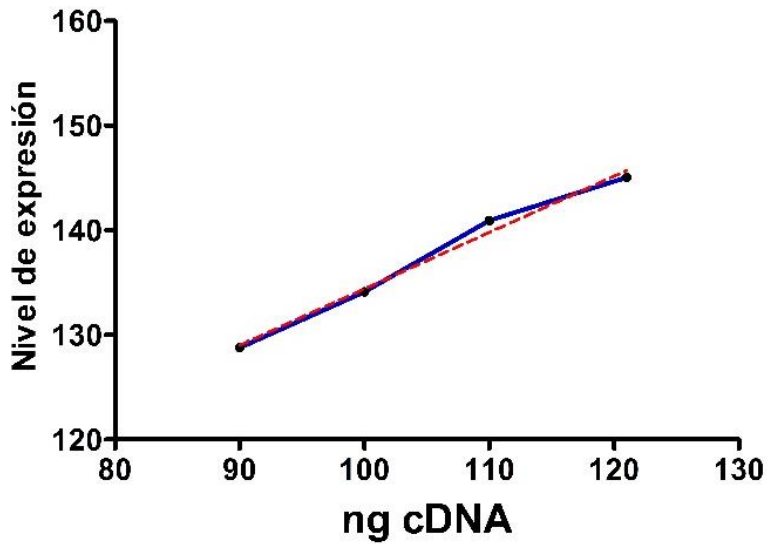


Figura 3. Curva de calibración semicuantitativa. Grafica en la que se muestra el nivel de expresión para un marcador específico de neuronas GABAérgicas con respecto a la cantidad de cDNA presente en cada una de las reacciones de PCR representadas por los puntos. Regresión lineal con un valor de $r^2 > .98$

PCR Multiplex

Tanto para la PCR sencilla como para la multiplex se llevó a cabo el mismo protocolo: 100 ng de cDNA, buffer PCR y Taq platinum (Invitrogen). El programa involucró 40 ciclos con una desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 55 °C por 1 min, y una extensión a 72 °C por 25 s. Los productos de PCR fueron visualizados mediante geles de agarosa al 2 % en buffer TAE 1X (EDTA 0.5 M, Tris base 2 M, ácido acético 5.7%) y teñidos con bromuro de etidio. La electroforesis se realizó a 90 Volts.

V.- RESULTADOS

Para evaluar la existencia de neuronas GABAérgicas en las áreas de la SN y el VTA se buscó la expresión de los genes que hacen posible el fenotipo GABAérgico funcional, es decir, los genes que codifican para las proteínas que llevan a cabo la síntesis de GABA y su empaquetamiento en las vesículas sinápticas para su posterior liberación en la sinapsis mediante exocitosis regulada.

Como marcadores de la síntesis se seleccionaron GAD65 y GAD67 que son las enzimas clásicas en la síntesis de GABA y que se consideran en la literatura como limitantes. Adicionalmente debido a que la síntesis de GABA puede también suceder de manera alternativa por la acción de Aldh1a1, cuya expresión ya ha sido reportada en las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo y les confiere la capacidad de producir GABA *de novo* sin la necesidad de las enzimas GAD's, es que también se incluyó en el análisis.

Como marcador del empaquetamiento vesicular de GABA se tomó el transportador VGAT, el cual transporta tanto GABA como Glicina es conocido por su naturaleza para transportar los neurotransmisores inhibidores GABA y Glicina. Como marcador adicional se utilizó β -actina el cual fue usado como control de carga y como indicador de integridad de las muestras.

Ya que el estriado es una región cerebral conformada por 95% de neuronas GABAérgicas se le utilizó como control con el fin de establecer las condiciones experimentales y asegurar que los marcadores que definen al fenotipo GABAérgico pudieran expresarse y amplificarse sin mayor problema en la técnica de PCR multiplex. Las muestras de estriado fueron extraídas de ratones de 14 días de edad posnatal (P14).

Primero, para asegurar la capacidad de medición de cada uno de los marcadores utilizados en el estudio, se realizaron PCR's individuales para cada marcador

usando su respectivo par de *primers*. De esta forma se verificó que se amplificara el tamaño de producto correcto para los cuales fueron diseñados (Figura 4).

Después como se muestra en la figura 5, se determinaron las condiciones experimentales permiten la detección de la expresión de todos los marcadores fenotípicos mediante una PCR multiplex: GAD65, GAD67, VGAT y ALDH1a para ratones de 14 días posnatal, etapa en que se encuentra totalmente determinado el fenotipo GABAérgico. Debido a lo anterior, en los experimentos subsecuentes se utilizó mesencéfalo de ratones p14 como control de la expresión.

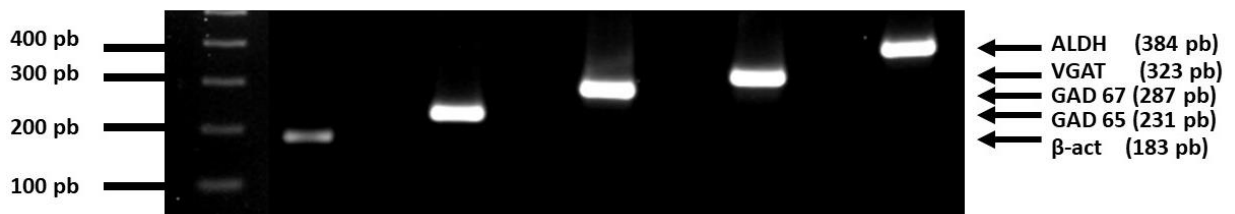


Figura 4. PCRs individuales para cada par de *primers*. Expresión de cada uno de los marcadores fenotípicos GABAérgicos donde se muestra el tamaño de amplicón correcto bajo los cuales se construyeron.

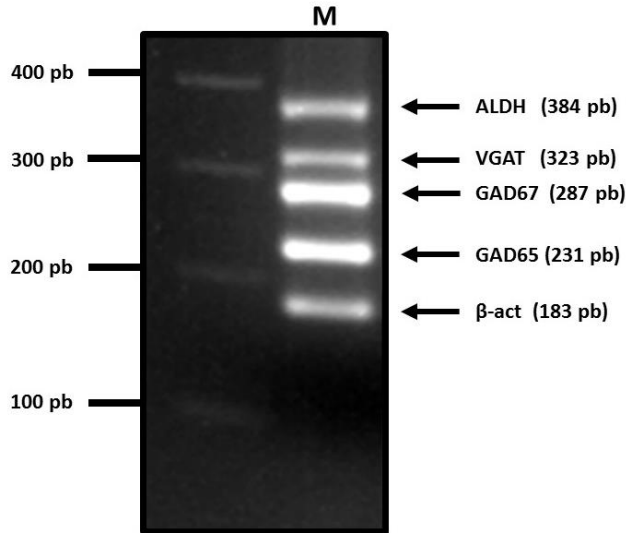


Figura 5. Expresión de los marcadores fenotípicos de neuronas GABAérgicas en mesencéfalo. Sistema de PCR-multiplex en ratón de 14 días de edad (P14) usado como control positivo en las muestras. El marcador β -actina es utilizado como control interno de la reacción.

Una vez que las condiciones experimentales quedaron establecidas se seleccionó las edades tanto embrionarias como posnatales a las cuales se mediría la expresión de los genes seleccionados. Se tomó como referencia el desarrollo secuencial que presentan las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo de ratón.

Entre los días embrionarios E9 y E10 las neuronas que en un futuro adoptarán un fenotipo dopaminérgico comienzan a desplazarse desde la región cerebral denominada istmo romboencefálico. Para el día E11.5 las neuronas en migración comienzan a arribar al mesencéfalo y continúan migrando a su destino, para la edad E14.5 todas las neuronas que debían migrar han llegado a su sitio y ya para E17 se han establecido en sus respectivas posiciones anatómicas dentro de la SN y el VTA. Finalmente para el día 14 postnatal (P14) todas las proyecciones han hecho contacto (sinapsis) con otras neuronas en otras regiones, por lo que el sistema dopaminérgico a esta edad ha completado el primer punto de las dos etapas en su desarrollo [41], caracterizado por una independencia alimentaria por parte del ratón.

El punto final se presenta a la edad de P65 en donde se establece la última conexión del sistema dopaminérgico, la cual se proyecta desde el VTA hacia la corteza.

Por lo anterior, una vez que se logró estandarizar la técnica de PCR-multiplex, se procedió a analizar el perfil de expresión de los marcadores en los días embrionarios 14.5 y 17 (E14.5 y E17, respectivamente) así como en ratones recién nacidos (P0) y de 7 y 14 días de nacidos (P7 y P14), lo que cubre el desarrollo y establecimiento del sistema dopaminérgico.

En la figura 6 se muestra un esquema que representa de manera general la localización y porción del tejido colectado para el analizar la presencia y el nivel de expresión de cada uno de los marcadores A). Esta región incluye los núcleos de la SN (A9) y el VTA (A10) del mesencéfalo. En el caso de las edades embrionarias se muestra en B) un esquema que ejemplifica la posición de los núcleos A9 y A10 los cuales se encuentran en la curvatura de la flexión media cerebral, etapa en la cual ambos núcleos forman un continuo. Por último en C) se muestra una imagen real de un embrión de 17 días (E17) tomada durante la disección del tejido en donde se puede observar la flexión media, sección que es colectada para los experimentos.

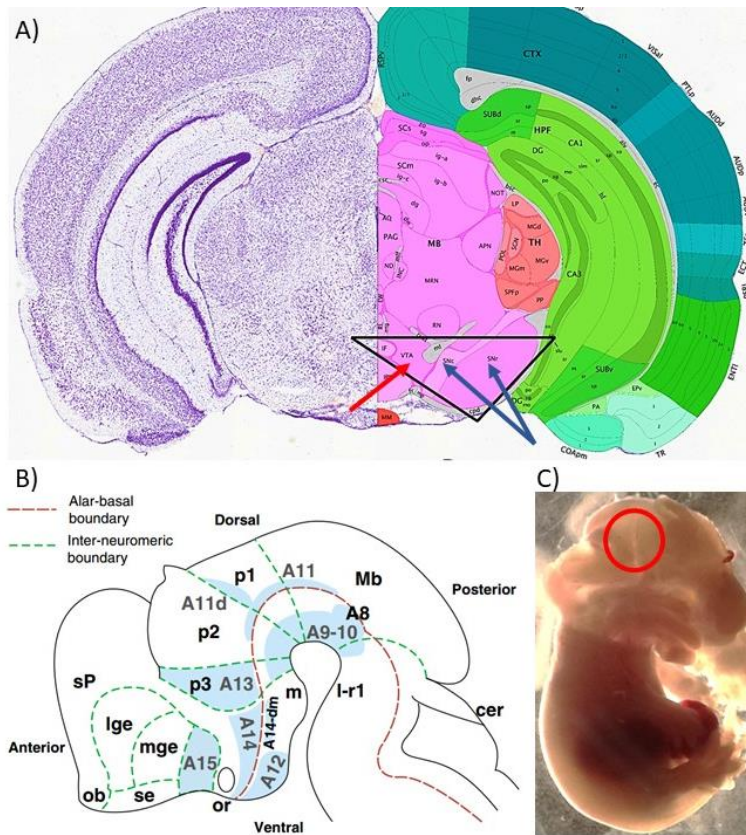


Figura 6. Esquemas de la disección de tejido en el mesencéfalo. En **A)** se muestra una imagen coronal tomada del *allen brain atlas* en donde se muestra la localización de la SN y el VTA señaladas con las flechas azul y roja respectivamente dentro del mesencéfalo. En **B)** se muestra un esquema para las mismas áreas en etapas embrionarias y en **C)** una foto real de un ratón a la edad de E17.

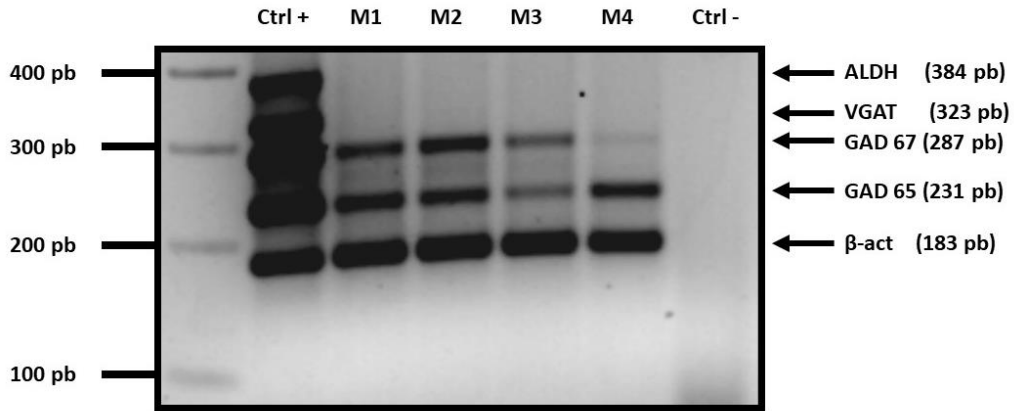


Figura 7. Expresión de los marcadores GABAérgicos en embriones de ratón de 14.5 días. Ctrl+. Mesencéfalo de ratón de 14 días posnatal (P14). M1-M4 muestras de SN y VTA de ratón embrionario E14.5. Ctrl-. Control negativo interno para la reacción. Nótese la ausencia de expresión de VGAT y ALDH.

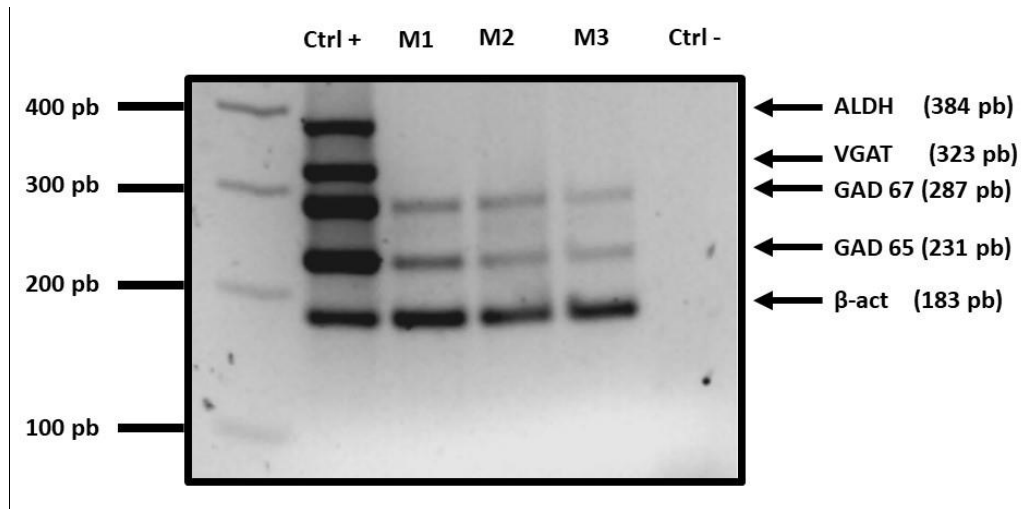


Figura 8. Expresión de GAD 65 y GAD67 en embriones de ratón de 17 días. Ctrl+. Mesencéfalo de ratón de 14 días posnatal (P14). M1-M3 muestras de SN y VTA de ratón embrionario E17. Ctrl-. Control negativo interno para la reacción. Nótese la ausencia de expresión de VGAT y ALDH.

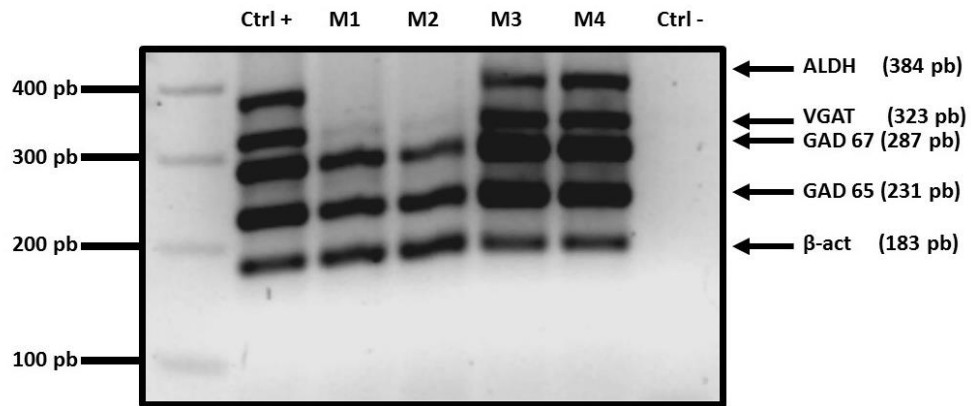


Figura 9. Expresión de GAD 65, GAD67, VGAT y ALDH en ratones recién nacidos. Ctrl+. Mesencéfalo de ratón de 14 días posnatal (P14). M1-M4 muestras de SN y VTA de ratón en edad P0. Ctrl-. Control negativo interno para la reacción.

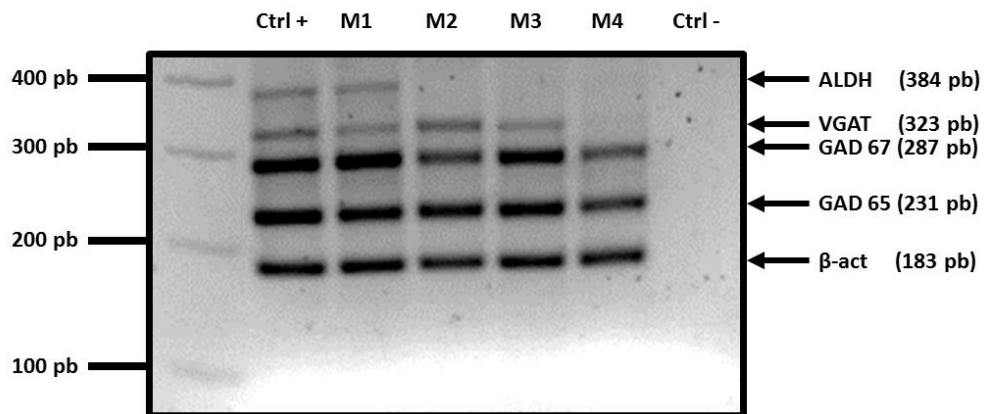


Figura 10. Expresión de GAD 65, GAD67, VGAT y ALDH en ratones de 7 días de nacidos. Ctrl+. Mesencéfalo de ratón de 14 días posnatal (P14). M1-M4 muestras de SN y VTA de ratón en edad P7. Ctrl-. Control negativo interno para la reacción.

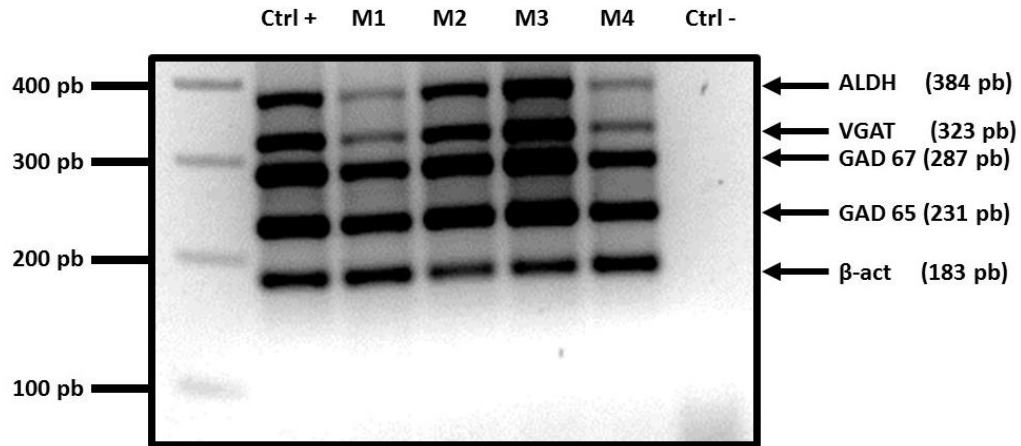


Figura 11. Expresión de GAD 65, GAD67, VGAT y ALDH en ratones de 14 días de nacidos. Ctrl+. Mesencéfalo de ratón de 14 días posnatal (P14). M1-M4 muestras de SN y VTA de ratón en edad P14. Ctrl-. Control negativo interno para la reacción.

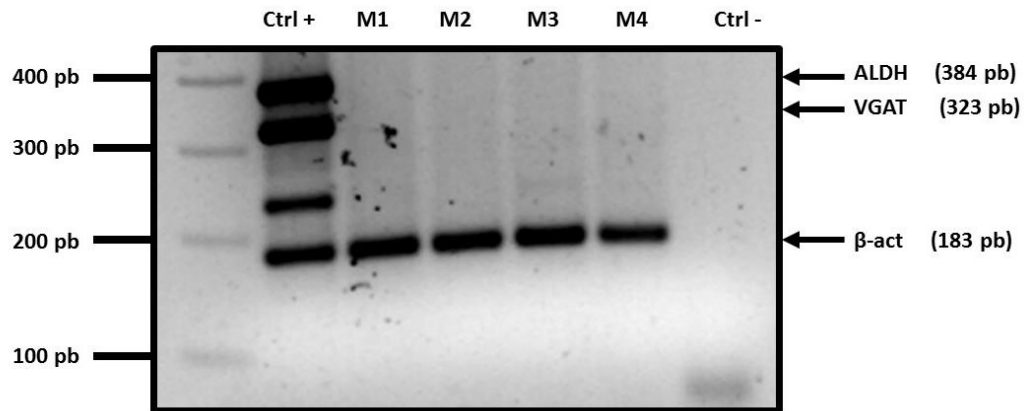


Figura 12. PCR multiplex para los marcadores fenotipicos ALDH y VGAT en embriones de 14.5 días. Ctrl+. Mesencéfalo de ratón de 14 días posnatal (P14). M1-M4 muestras de SN y VTA de ratón en edad E14.5. Ctrl-. Control negativo interno de la reacción.

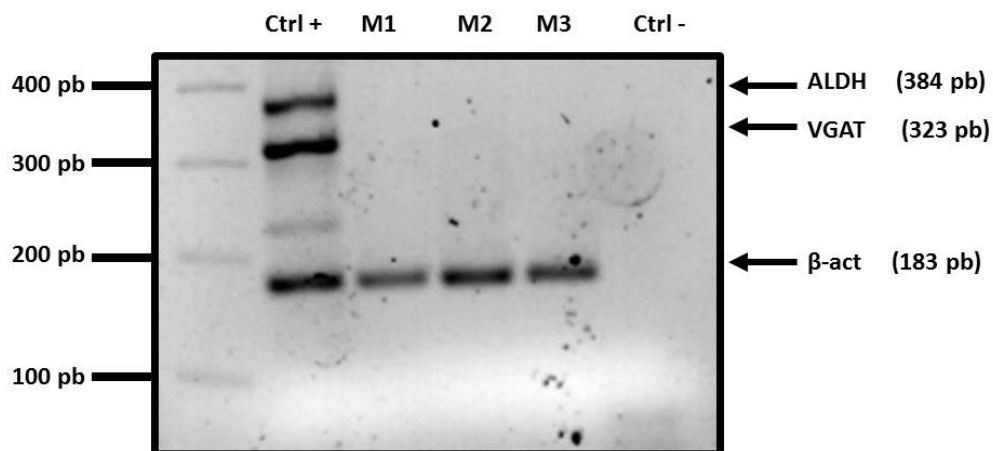


Figura 13. PCR multiplex para los marcadores fenotipicos ALDH y VGAT en embriones de 17 días. Ctrl+. Mesencéfalo de ratón de 14 días posnatal (P14). M1-M4 muestras de SN y VTA de ratón en edad E17. Ctrl-. Control negativo interno de la reacción.

Como se puede observar en las figuras 7 y 8, reacciones pertenecientes a las edades embrionarias E14.5 y E17, se muestra una falta en la expresión para los marcadores ALDH y VGAT lo que sugiere de primera instancia que durante el desarrollo embrionario el fenotipo GABAérgico no se presenta totalmente porque VGAT es responsable del empaquetamiento vesicular del neurotransmisor GABA y por lo tanto indispensable para su posterior liberación mediante exocitosis al espacio sináptico. Ya que hasta hoy no se conoce ninguna otra forma de sinapsis química que prescindiera de estructuras vesiculares para lograr la liberación de un neurotransmisor, es evidente que el fenotipo GABAérgico en las regiones de la SN y el VTA no es funcional durante el desarrollo embrionario.

Aunque la enzima ALDH sintetiza GABA por una vía distinta la cual no requiere del aminoácido Glutamato, tanto GAD65 como GAD67 si se expresan a lo largo del desarrollo embrionario por lo que no se puede decir que la síntesis del

neurotransmisor se vea afectada. Por lo tanto aunque es cierto que la producción de GABA puede llevarse a cabo, su liberación sería inexistente.

En la figura 9 se muestra la expresión de todos los marcadores fenotípicos, momento en el que aparecen por primera vez VGAT y ALDH, siendo hasta el día del nacimiento (P0) la primera vez en que aparece por completo el fenotipo GABAérgico. Esto se debe a que en esta ventana del desarrollo se presenta la expresión de diversos genes que normalmente se encuentran silentes.

Con respecto a las figura 10 y 11, reacciones pertenecientes a las edades posnatales P7 y P14, se puede observar que el patrón de expresión que se presenta a partir de la edad P0 se conserva con el crecimiento. Cabe remarcar que en tres de las 4 muestras analizadas en la edad P7, la expresión del marcador ALDH no se logra distinguir debido quizá a una diferencia de expresión temporal en los ratones. De igual forma para las muestras de P0 en donde dos de ellas presentan la misma situación.

De acuerdo con los resultados obtenidos y con el fin de asegurar que efectivamente los marcadores fenotípicos de VGAT y ALDH no se expresaban durante la etapa embrionaria (E14.5 y E17), se procedió a realizar un sistema de PCR únicamente para estos dos marcadores. De esta forma se puede ver en las figuras 12 y 13 que ninguno de ellos presento una expresión positiva para ninguna de las reacciones.

Una vez obtenidos los datos de todas las reacciones de PCR, se realizó mediante densitometría la cuantificación para cada una de las bandas, resultados con los que se generaron las siguientes gráficas de expresión relativa.

En la figura 14 se puede observar que para las gráficas con incisos **A)** y **B)** la expresión de los marcadores VGAT y ALDH para las edades embrionarias E14.5 y E17 es nula con respecto a las demás. Para la edad de P7 estos marcadores muestran un pico en su nivel de expresión que posteriormente disminuirá durante el crecimiento como se observa en la edad de P14. Cabe mencionar que este aumento

en la expresión es significativamente mayor para la enzima ALDH ya que a pesar de que surge en el momento del nacimiento (P0) su expresión sigue aumentando con respecto a VGAT, el cual también aparece en esta etapa.

Finalmente en las gráficas correspondientes a los incisos **C)** y **D)** se muestra que aunque las enzimas GAD65 y GAD67 se presentan a lo largo de todas las edades, los niveles de expresión para estos marcadores no son homogéneos, siendo P0 el momento en el cual alcanzan su pico máximo. Además de esto se puede ver que para la edad de P14 se vuelve a mostrar un aumento en su expresión aunque de menor intensidad de lo que aparece en P0 sin presentar diferencias significativas.

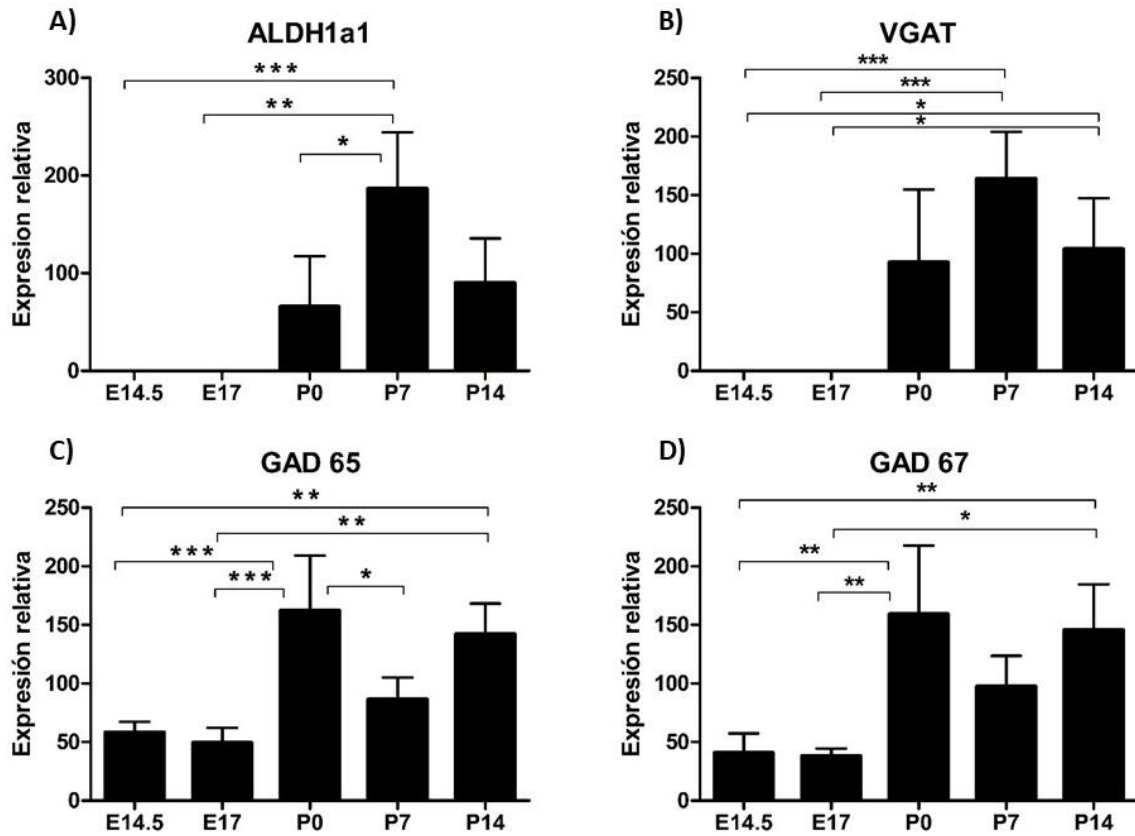


Figura 14. Comparación de los niveles de expresión para cada uno de los marcadores a lo largo del desarrollo embrionario y posnatal.

VI.- DISCUSIÓN

El fenotipo GABAérgico depende de la capacidad de una neurona para utilizar GABA como neurotransmisor. Para ello, la neurona debe por un lado sintetizar el neurotransmisor GABA y por el otro debe ser capaz de empaquetarlo en las vesículas sinápticas para que el neurotransmisor sea liberado por exocitosis regulada mediada por calcio durante la neurotransmisión. Sin embargo, debido a que el fenotipo GABAérgico en las áreas de la SN y el VTA se encuentra incompleto durante el desarrollo embrionario por la falta de expresión de VGAT, el fenotipo GABAérgico no es funcional por lo menos para esa etapa. Por lo tanto considerando que el transportador VGAT no se expresa durante las edades embrionarias aún cuando si existe una síntesis de GABA, queda la duda 1) de si podría haber una forma por la cual el neurotransmisor pudiera ser liberado y 2) que función podría estar cumpliendo si no es liberado.

Existen dos tipos de neurotransmisión, ya sea mediante una sinapsis química o bajo una sinapsis eléctrica formada por *gap junctions* siendo esta última un mecanismo independiente del almacenamiento vesicular y de mayor eficiencia, en términos de velocidad. Aunque se ha encontrado que en etapas adultas las interneuronas GABAérgicas pueden optar bajo ciertas condiciones (circuitos locales) y en determinadas áreas cerebrales (corteza, tálamo, estriado y cerebelo) por el segundo tipo de neurotransmisión [42], en etapas embrionarias no se conocen estudios que puedan descartar la posibilidad de esta modalidad.

Por otro lado existen 4 hipótesis por las cuales un neurotransmisor puede ser liberado al espacio sináptico en una sinapsis química: 1) liberación del neurotransmisor por vesículas a través de un poro en la membrana, la cual se retrae dentro de la neurona una vez liberado 2) fusión total de la vesícula con la membrana y la nueva creación de estas con ayuda de proteínas específicas 3) endocitosis

masiva por la fusión de varias vesículas a la membrana por medio abultamientos que colapsan y crean nuevas vesículas y 4) endocitosis rápida. Cada una de ellas difiere en la cantidad liberada, la velocidad en la recuperación de vesículas una vez fusionadas con la membrana y un estado dependiente o no de clatrina, pero ninguna de ellas descarta la utilización de transportadores vesiculares para su empaquetamiento.

Para el caso del fenotipo GABAérgico es necesario la presencia del transportador VGAT y al no encontrarse presente durante el desarrollo embrionario sugiere que aunque podría haber una producción del neurotransmisor GABA en las neuronas por la acción de las enzimas GAD 65 y GAD 67, su liberación no se presenta al menos para los núcleos de la SN y el VTA en el mesencéfalo. Sin embargo desde hace unos años se ha venido estudiando un mecanismo de liberación no vesicular en neuronas GABAérgicas [43] y existen estudios en los que se ha observado una liberación de GABA bajo este mecanismo en el desarrollo de neuronas CA1 piramidales en el hipocampo [44], proponiendo que existe una actividad de tipo tónica [11, 45, 46] sobre receptores GABA_A en estas neuronas en donde los contactos sinápticos no han sido formados y donde el neurotransmisor es recapturado por medio de los transportadores de GABA (GAT 1-4), semejante a un sistema *buffer*. Lo cual significa que GAT tiene una participación en la liberación de GABA [33].

Aunque existe la teoría de que los transportadores de GABA, específicamente GAT-1, pueden funcionar de forma inversa liberando GABA al medio extracelular en lugar de capturarlos, por una alta concentración de sodio (Na⁺) intracelular [43, 47], hasta ahora no se conocen estudios sobre un mecanismo similar a este en neuronas GABAérgicas en el mesencéfalo de ratón.

Por otra parte hay quienes dicen que GAT-1 no contribuye a la liberación de GABA ya que inhibiendo el transportador, en ratones VGAT *Knockout* (KO) y ratones silvestres (*wild type*), los niveles extracelulares de GABA no decrecen sino de forma

contraria aumentan para ambos fenotipos, indicando que GAT-1 no contribuye a la liberación de GABA. Estudios sobre la liberación no vesicular de GABA para regiones en las que es muy importante la presencia del neurotransmisor durante el desarrollo embrionario, por ejemplo en el prosencéfalo, se encontró que durante esta etapa los niveles de GABA extracelular se mantienen constantes a pesar de no estar presente VGAT. Esto significa que aunque VGAT no se expresa, la liberación de GABA ocurre, y ya que la inhibición del transportador GAT-1 eleva los niveles de GABA, este no tendría un papel importante como alternativa para su liberación en ratones VGAT KO.

Aunque la hipótesis del transporte reverso por los GAT's es controversial, lo cierto es que GAT-1 favorece el incremento de la inhibición tónica para controlar los niveles extracelulares de GABA.

Estudios realizados dentro del mismo grupo de investigación, en donde se realizó este trabajo, han encontrado que similar a las neuronas GABAérgicas, el fenotipo dopaminérgico dentro de la SN y el VTA no se encuentra completo durante el desarrollo embrionario por lo que tampoco participa dentro del circuito neuronal inmaduro en el mesencéfalo sino hasta edades postnatales en donde al igual que el fenotipo GABAérgico forman parte de la red.

Aunque el fenotipo GABAérgico estudiado bajo el perfil de los marcadores seleccionados para el estudio no se presenta en etapas embrionarias, en edades adultas podrían ser diversos en cuanto a la expresión de sus proteínas y receptores, como lo es por ejemplo para el caso de las neuronas dopaminérgicas y glutamatérgicas en donde la distribución y concentración de los diferentes subconjuntos de poblaciones para estos fenotipos, tanto en rata como en ratón, varía de manera específica a lo largo de la región correspondiente al VTA. [3, 4].

Incluso se ha observado, en edades de ratón adultas, que las neuronas que expresan TH y el transportador vesicular de glutamato tipo dos (VGLUT2) tienen la capacidad de sintetizar dopamina, debido a que todas ellas expresan la enzima

DOPA descarboxilasa, pero algunas de estas neuronas carecen de la expresión de VMAT2 o el transportador activo de dopamina (DAT) que son necesarias para el empaquetamiento vesicular y la recaptura, por lo que aunque pueden sintetizar el neurotransmisor su liberación se ve afectada. Esto significa que de poder sintetizarse GABA como neurotransmisor la falta de expresión de su transportador vesicular (VGAT), impide su liberación al espacio sináptico.

Con respecto a que pudiera existir un mecanismo de co-liberación de GABA por medio de neuronas glutamatérgicas, este sería improbable debido a que el transportador VGAT se encuentra totalmente ausente en la etapa embrionaria en SN y VTA, al menos para este estudio a nivel de tejido.

Finalmente ya que un estudio a nivel de tejido no implica que todos los marcadores característicos del fenotipo GABAérgico completo se encuentran en la misma neurona, es que uno de los principales objetivos para un futuro es analizar la expresión de los mismos marcadores a nivel de una sola célula. Esto implicaría que a una escala como esa los fenotipos podrían ser diversos en los diferentes núcleos del mesencéfalo.

VII.- CONCLUSIONES

El fenotipo GABAérgico completo se encuentra ausente durante el desarrollo embrionario dentro de la SN y el VTA. El análisis en el perfil de expresión de los marcadores utilizados varía a lo largo de las diferentes edades en el desarrollo. La expresión del transportador VGAT solo se presenta en edades posnatales y por lo tanto la liberación del neurotransmisor no ocurre durante la etapa embrionaria, siendo un fenotipo no funcional. Además de esto la enzima Aldh1a1, responsable de la síntesis alterna de GABA, tampoco aparece en edades embrionarias.

Cabe mencionar que este tipo de estudios es importante debido a que existe una diversidad de fenotipos neuronales, varios de los cuales aún se desconocen, lo cual quiere decir que el caracterizarlos permite una mayor comprensión en el funcionamiento de los diferentes sistemas abriendo la posibilidad a mejores tratamientos en enfermedades neurodegenerativas o a distintos tipos de trastornos.

VIII.- BIBLIOGRAFÍA

1. Morales, Marisela and B. Margolis, Elyssa. (2017). Ventral tegmental area: Cellular heterogeneity, connectivity and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience*. (2016)
2. Watabe-Uchida, M., Zhu, L., Ogawa, S. K., Vamanrao, A. & Uchida, N. Whole-brain mapping of direct inputs to midbrain dopamine neurons. *Neuron* 74, 858–873 (2012).
3. Yamaguchi, T., Qi, J., Wang, H. L., Zhang, S. & Morales, M. Glutamatergic and dopaminergic neurons in the mouse ventral tegmental area. *Eur. J. Neurosci*. 41, 760–772 (2015).
4. Li, X., Qi, J., Yamaguchi, T., Wang, H. L. & Morales, M. Heterogeneous composition of dopamine neurons of the rat A10 region: molecular evidence for diverse signaling properties. *Brain Struct. Funct*. 218, 1159–1176 (2013).
5. Morales, M. & Root, D. H. Glutamate neurons within the midbrain dopamine regions. *Neuroscience* 282, 60–68 (2014).
6. Root, D. H. et al. Glutamate neurons are intermixed with midbrain dopamine neurons in non human primates and humans. *Sci. Rep*. 6, 30615 (2016).
7. Bromberg-Martin, E. S., Matsumoto, M. & Hikosaka, O. Dopamine in motivational control: rewarding, aversive, and alerting. *Neuron* 68, 815–834 (2010).
8. Fields HL, Hjelmstad GO, Margolis EB, Nicola SM. Ventral tegmental area neurons in learned appetitive behavior and positive reinforcement. *Annu Rev Neurosci* 2007; 30: 289 – 316.
9. Tan, K. R. et al. GABA neurons of the VTA drive conditioned place aversion. *Neuron* 73, 1173–1183 (2012).

10. Wu, C. and Sun, D. GABA receptors in brain development, function, and injury. *Metab Brain Dis* 30(2): 367–379. (2015).
11. Glykys, J. and Mody, I. Activation of GABA_A Receptors: Views from Outside the Synaptic Cleft. *Neuron* 56, 764-770. (2007).
12. Holmes, A. and Chen, A. GABA receptors in a state of fear. *Nature Neuroscience* 18(9), 1194-1196. (2015).
13. Roth, C. and Draguhn, A. GABA Metabolism and Transport: Effects on Synaptic Efficacy. *Neural Plasticity*. (2012).
14. Battaglioli, G., Liu, H., and Martin, D. Kinetic differences between the isoforms of glutamate decarboxylase: implications for the regulation of GABA synthesis. *Journal of Neurochemistry* 86, 879–887. (2003).
15. Fenalti, G. et al. GABA production by glutamic acid decarboxylase is regulated by a dynamic catalytic loop. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 280-286. (2007).
16. Kim, J. I. et al. Aldehyde dehydrogenase 1a1 mediates a GABA synthesis pathway in midbrain dopaminergic neurons. *Science* 350, 102–106 (2015).
17. Allen Brain Atlas, <http://mouse.brain-map.org/gene/show/11455>.
18. Ebihara, S., Obata, K., and Yanagawa, Y. Mouse vesicular GABA transporter gene: genomic organization, transcriptional regulation and chromosomal localization. *Molecular Brain Research* 110, 126–139. (2003).
19. Tritsch, N. X., Granger, A. J. & Sabatini, B. L. Mechanisms and functions of GABA co-release. *Nat. Rev. Neurosci.* 17, 139–145 (2016).
20. Berrios, J. et al. Loss of UBE3A from TH-expressing neurons suppresses GABA co-release and enhances VTA-NAc optical self-stimulation. *Nat. Commun.* 7, 10702 (2016).
21. Jin, X. et al. Localization and function of GABA transporters GAT-1 and GAT-3 in the basal ganglia. *Frontiers in Systems Neuroscience*. (2011).

22. Fabian C. Roth and Andreas Draguhn. GABA Metabolism and Transport: Effects on Synaptic Efficacy. *Neural Plasticity* (2012).
23. Represa, A. and Ben-Ari, Y. Trophic actions of GABA on neuronal development. *TRENDS in Neurosciences* 28, 278-283. (2005).
24. Kakizaki, T., Oriuchi, N., Yanagawa, Y. GAD65/GAD67 double knockout mice exhibit intermediate severity in both cleft palate and omphalocele compared with GAD67 knockout and VGAT knockout mice. *Neuroscience* 288, 86–93. (2015).
25. Saito, K. The physiological roles of vesicular GABA transporter during embryonic development: a study using knockout mice. *Molecular Brain*. (2010).
26. Ben-Ari Y, Gaiarsa J-L, Tyzio R, Khazipov R (2007) GABA: a Pioneer transmitter that excites immature neurons and generates primitive oscillations. *Physiol Rev* 87:1215–1284.
27. Adria K. Martig and Sheri J. Y. Mizumori. Ventral tegmental area and substantia nigra neural correlates of spatial learning. *Learning & Memory* (Cold Spring Harbor, N.Y.). 18: 260-71 (2011).
28. Ilango, A. et al. Similar roles of substantia nigra and ventral tegmental dopamine neurons in reward and aversion. *J. Neurosci.* 34, 817–822 (2014).
29. Robert A McGovern, Andrew K Chan, Charles B Mikell, John P Sheehy, Vincent P Ferrera, and Guy M McKhann. Human substantia nigra neurons encode decision outcome and are modulated by categorization uncertainty in an auditory categorization task. *Physiological Reports* (2015).
30. Zhou FM, Lee CR. Intrinsic and integrative properties of substantia nigra pars reticulata neurons. *Neuroscience.* 198: 69-94 (2011).
31. Lammel, S. et al. Input-specific control of reward and aversion in the ventral tegmental area. *Nature* 491, 212–217 (2012).

32. Mendez, J.A. et al. Developmental and target-dependent regulation of vesicular glutamate transporter expression by dopamine neurons. *J Neurosci*, 6309-18 (2008).
33. Wu, Y. et al. Nonvesicular Inhibitory Neurotransmission via Reversal of the GABA Transporter GAT-1. *Neuron* 56, 851-865. (2007).
34. Zander, JF. et al. Synaptic and Vesicular Coexistence of VGLUT and VGAT in Selected Excitatory and Inhibitory Synapses. *The Journal of Neuroscience*, 30(22):7634 –7645. (2010).
35. Zhang, S. et al. Dopaminergic and glutamatergic microdomains in a subset of rodent mesoaccumbens axons. *Nat. Neurosci.* 18, 386–392 (2015).
36. Root, D. H. et al. Single rodent mesohabenular axons release glutamate and GABA. *Nat. Neurosci.* 17, 1543–1551 (2014).
37. Olson, V. G. & Nestler, E. J. Topographical organization of GABAergic neurons within the ventral tegmental area of the rat. *Synapse* 61, 87–95 (2007).
38. Keith B.J. Franklin & George Paxinos. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier. Third Edition. (2007).
39. Paxinos, Halliday, Watson, Koutcherov, Wang. *Atlas of the Developing Mouse Brain at E17.5, P0, and P6*. Elsevier. First Edition. (2007).
40. *Anatomy Atlas of Mouse Development*, <https://www.emouseatlas.org/emap/ema/home.php>
41. N. Prakash and W.Wurst. Development of dopaminergic neurons in the mammalian brain. *Cell. Mol. Life Sci.* 63: 187–206 (2006).
42. Galarreta, M. and Hestrin, S. Electrical synapses between GABA-releasing interneurons. *Nat Rev Neurosci* 2, 425-433. (2001).
43. Attwell D, Barbour B, Szatkowski M. Nonvesicular Release of Neurotransmitter. *Neuron* 11, 401-407. (1993).

44. Demarque, M et al. Paracrine Intercellular Communication by a Ca^{2+} - and SNARE-Independent Release of GABA and Glutamate Prior to Synapse Formation. *Neuron* 36, 1051-1061. (2002).
45. Cherubini, E. and Conti, F. Generating diversity at GABAergic synapses. *TRENDS in Neurosciences* 24, 155-162. (2001).
46. Farrant, M. and Nusser, Z. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA_A receptors. *Nat Rev Neurosci* 6, 215-229. (2005).
47. Kanner, B. Structure and Function of Sodium-coupled GABA and Glutamate Transporters. *Membrane Biol.* 213, 89–100. (2006).