



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM, CAMPUS JURQUILLA

EXPRESIÓN HETERÓLOGA FUNCIONAL DE SUBUNIDADES GABA_A CLONADAS DE OLIGODENDROCITOS DEL NERVIO ÓPTICO DE RATA (*Rattus norvegicus*)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Lic. RAINALD PABLO ORDAZ RAMOS

TUTORES:

DR. ROGELIO ARELLANO OSTOA
DRA. TERESA EDITH GARAY ROJAS

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES
DR. MANUEL AGUILAR RAMÍREZ

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Querétaro, agosto de 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurofisiología Celular, perteneciente al Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Rogelio Arellano Ostoa y la Dra. Teresa Edith Garay Rojas. Becario CONACyT No. 700811. Además, contó con los financiamientos CONACyT No. 291212 y No. 252121; del PAPIIT-DGAPA-UNAM con el proyecto No. IN205615; PAEP y CONCyTEQ.

RESUMEN

El ácido γ -aminobutírico (GABA) es uno de los principales neurotransmisores en el sistema nervioso central, actuando principalmente a través de la activación de receptores-canal pentaméricos permeables a iones Cl^- llamados receptores tipo GABA_A . En el linaje oligodendroglial, la expresión de los receptores GABA_A es regulada por varios factores. Entre ellos, está su interacción con las neuronas, por lo que se ha propuesto un papel en el proceso de mielinización, idea que es apoyada por evidencias que muestran que este importante proceso, es deficiente, cuando el sistema de señalización gabaérgico es disminuido. Los estudios funcionales y farmacológicos en oligodendrocitos (OLs) del nervio óptico, indican que el receptor GABA_A tiene una estequiometría específica de este linaje celular, ya que sus características los distingue de los reportados tanto en neuronas como en otras células gliales. Una diferencia importante está relacionada con el efecto de la β -carbolina butil- β -carbolina-3-carboxilato (β -CCB). La β -CCB es una sustancia endógena, que se describió como agonista inverso del principal receptor GABA_A neuronal, actuando sobre el sitio de unión a benzodiazepinas (BZDs); sin embargo, ha sido mostrado que tiene un robusto efecto potenciador sobre la respuesta a GABA en los OLs. La información previa, sugiere que el receptor GABA_A oligodendroglial, contiene las subunidades $\alpha 3$, $\beta 2$ ó $\beta 3$, $\gamma 1$ ó $\gamma 3$. Aquí, co-expresamos en ovocitos de *Xenopus laevis* el cRNA de estas subunidades, clonadas a partir del mRNA de los OLs del nervio óptico de rata, y realizamos el análisis funcional de las seis combinaciones posibles. Los resultados muestran que la combinación $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ reproduce en buena medida el perfil funcional y farmacológico del receptor oligodendroglial, y muestra que la β -CCB actúa como un modulador alostérico positivo del receptor. Este efecto no fue antagonizado por flumazenil, un potente antagonista sobre el sitio clásico de las BZDs, lo que indica que la β -CCB actúa sobre un sitio de unión diferente en este receptor GABA_A . Nuestros resultados apoyan la idea de que el receptor oligodendroglial está compuesto de una combinación de las subunidades propuestas.

SUMMARY

The γ -aminobutyric acid (GABA) is a major neurotransmitter in the central nervous system, that acts mainly through activation of pentameric receptor-channels permeable to Cl^- ions named GABA_A receptors. In oligodendrocytes (OLs), GABA_A receptor expression is controlled by several factors. Among them, is their interaction with neurons, strongly suggesting a role of gabaergic signaling during the myelination process, this is also supported by evidence showing that the process is deficient when gabaergic communication is decreased. Functional and pharmacological characteristics, of the GABA_A receptor expressed in OLs from the optic nerve, strongly suggested that it has a novel and specific subunit combination, different to that of receptors expressed in other neural cells. An important difference is related to the effect of butyl-carboline-3-carboxylate (β -CCB), an endogenous β -carboline. β -CCB has an effect of inverse agonist on the main neuronal GABA_A receptor, acting on the benzodiazepines (BZDs) binding site; however, it has been shown that β -CCB strongly potentiates the GABA response in OLs. Previous studies indicated that precursor cells and OLs express a GABA_A receptor containing a combination of the following subunits: $\alpha 3$, $\beta 2$ or $\beta 3$, $\gamma 1$ or $\gamma 3$. In here, these GABA_A subunits cloned from OLs, were combined and heterologously expressed in *Xenopus laevis* oocytes, and their characteristics analyzed electrophysiologically. Our results showed, that $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ subunit co-expression, mimicked in good measure the functional and pharmacological pattern described for the endogenous receptor expressed in OLs and precursor cells, and confirmed that β -CCB acted as a positive allosteric modulator. This effect was not antagonized by flumazenil, a potent antagonist of the classic BZDs binding site, thus, indicating that β -CCB acted through a different binding site on this GABA_A receptor. In addition, it maintained its action as an inverse agonist of the classic benzodiazepines binding site. Our results support the idea that the oligodendroglial receptor is composed by a combination of the proposed subunits.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (Becario No: 700811), así como a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM (cuenta No: 516490139) por el apoyo económico otorgado durante la realización de este proyecto.

Así mismo, agradezco al Dr. Rogelio Arellano Ostoa y a la Dra. Teresa Edith Garay Rojas, mis magníficos tutores, por la gran labor de dirección académica que ambos realizaron y que hizo posible esta investigación. Además, por haber confiado en mí desde el primer día, por los sabios consejos y conocimientos brindados y por la claridad de mente y de acción de ambos.

Agradezco además al Dr. Ataúlfo Martínez Torres y al Dr. Manuel Benigno Aguilar Ramírez miembros del Comité Tutorial, por su tiempo, sus críticas, sus valiosos comentarios y por ser piezas claves durante el desarrollo del proyecto.

A los miembros del jurado de examen de grado: el Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera, la Dra. Laura Cristina Berumen Segura, el Dr. Ataúlfo Martínez Torres y la Dra. Maricela Luna Muñoz, por servirse a leer y comentar este escrito y a sus atinadas observaciones al mismo.

Además, agradezco a mis compañeros del laboratorio D-13: Leticia Robles Martínez, “Lupita” Martell Gallegos, Juan Pablo Moctezuma Hernández y Abraham Cisneros Mejorado por sus enseñanzas y por los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio. También, a mis compañeros de la generación 2016-1 de la maestría en Neurobiología por el tiempo que hemos compartido en la materialización de este sueño.

Agradezco por los conocimientos brindados y los recursos puestos a mi disposición, a los colectivos del Laboratorio de Neurobiología del Departamento de Neurociencias de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad del País Vasco y del Achucarro Basque Center for Neuroscience.

Un agradecimiento muy especial a la M. en C. Leonor Casanova Rico y a la Unidad de Enseñanza y Estudios de Posgrado, que ella dirige, pues sin su invaluable labor no hubiera sido posible comenzar a soñar en este proyecto personal.

Por último, agradezco al Instituto de Neurobiología (INB) y a sus investigadores, a la gloriosa Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a esta tierra tan linda y tan querida que es **MÉXICO**, por acogerme como un hijo más, darme la posibilidad de recibir una educación y preparación de primer nivel, que son fundamentales para mi formación y crecimiento profesional.

DEDICATORIAS

A mis padres Cecilia y Pedro Pablo

... por enseñarme que nada en la vida se logra sino es con sacrificio y dedicación.

A Inés e Ibrahim

... por ser mis guías y ejemplos a seguir.

A mis hermanas Anaicelys y Aiderelys

... por su amor y apoyo incondicionales.

A mis sobrinos Yocelin y Alian

... para los que espero ser un ejemplo.

A Osvaldo Victor y su familia

... por sus consejos oportunos y su amistad sincera.

A mi familia

... por todo el apoyo y el amor que me han brindado.

A mis amigos mexicanos: Aline, Juan Pablo, Rebe, Arturo y Chema

... por su amistad y por hacerme sentir como de esta tierra, desde el primer día.

A Edith

... por compartir conmigo parte de este camino y hacerlo una experiencia muy especial.

A Cuba y su Revolución

... pues sin ella nada hubiera sido posible.

Revolución es sentido del momento histórico; es cambiar todo lo que debe ser cambiado; es igualdad y libertad plenas; es ser tratado y tratar a los demás como seres humanos; es emanciparnos por nosotros mismos y con nuestros propios esfuerzos; es desafiar poderosas fuerzas dominantes dentro y fuera del ámbito social y nacional; es defender valores en los que se cree al precio de cualquier sacrificio; es modestia, desinterés, altruismo, solidaridad y heroísmo; es no mentir jamás ni violar principios éticos; es convicción profunda de que no existe fuerza en el mundo capaz de aplastar la fuerza de la verdad y las ideas.

Revolución es unidad, es independencia, es luchar por nuestros sueños de justicia para Cuba y para el mundo, que es la base de nuestro patriotismo, nuestro socialismo y nuestro internacionalismo.

Fidel Castro Ruz

Plaza de la Revolución "José Martí"
1^o de mayo de 2000
La Habana, Cuba

ÍNDICE

RESUMEN	iii
SUMMARY	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIAS	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Los oligodendrocitos	3
2.2 Mielina	6
2.3 Mielinización	9
2.4 GABA y Oligodendrocitos	12
2.5 Receptores GABA _A (GABA _A R)	16
2.6 Moduladores alostéricos de los Receptores GABA _A	20
2.7 Estructura y Función de los Receptores GABA _A	24
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVO GENERAL	28
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
6. MATERIALES Y MÉTODOS	30
6.1 Obtención de folículos	31
6.2 Microinyección de folículos con cRNA de subunidades GABA _A	32
6.3 Defoliculación de los ovocitos inyectados	33

6.4	Técnica de control del voltaje	33
6.5	Análisis Estadístico	35
7.	RESULTADOS	37
7.1	Respuesta a GABA de combinaciones del receptor GABA _A , expresadas en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	37
7.2	Sensibilidad a Zn ²⁺ de combinaciones del receptor GABA _A , expresadas en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	40
7.3	Patrón funcional y farmacológico de la combinación de subunidades α3β2γ1 del receptor GABA _A expresadas en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	45
7.4	Efecto de flumazenil sobre la potenciación de β-CCB en el receptor α3β2γ1	48
7.5	Subunidad γ del GABA _A R y el efecto potenciador de β-CCB	52
8.	DISCUSIÓN	54
8.1	La combinación α3β2γ1; el posible receptor oligodendroglial	54
8.2	Efecto potenciador de la β-CCB	58
9.	CONCLUSIONES	61
10.	LITERATURA CITADA	62
11.	ÍNDICE DE FIGURAS	78
12.	LISTA DE ABREVIATURAS	79

1. Introducción

Los oligodendrocitos (OLs) son las células mielinizantes del sistema nervioso central (SNC). Estas células gliales, envuelven las proyecciones axónicas de las neuronas formando una vaina, que se interrumpe en intervalos regulares, conocidos como nodos de Ranvier. La composición y estructura de la vaina de mielina, tiene para las neuronas, como una de las principales consecuencias, el aumento de la velocidad de conducción del potencial de acción (Kettenmann & Ransom, 2013).

El proceso de mielinización tiene lugar en un entorno de estrecha comunicación entre ambos tipos celulares. Una evidencia de esto último, es que el programa de mielinización es inducido y modulado por la actividad eléctrica de las neuronas (Demerens *et al.*, 1996). Entre las moléculas mediadoras de la intercomunicación neurona-OLs se han propuesto al ATP, el glutamato (Ishibashi *et al.*, 2006; Wake *et al.*, 2011) y el GABA (Williamson *et al.*, 1998; Vélez-Fort *et al.*, 2012; Zonouzi *et al.*, 2015 y Arellano *et al.*, 2016). Por ejemplo, recientemente se ha demostrado que hay una comunicación bidireccional entre neuronas y células oligodendrogiales, las primeras liberan neurotransmisores que encuentran sus blancos en las membranas de los OLs y por su parte los OLs liberan nanovesículas (exosomas) ricas en proteínas, factores metabólicos, mRNA, miRNA que son endocitadas y utilizadas por las neuronas y la microglía (Frühbeis *et al.*, 2013).

Es bien conocido que el linaje oligodendrogial expresa diversos tipos de canales iónicos, que presumiblemente son reguladores de varios procesos fisiológicos tales como, la proliferación, la migración, la diferenciación y, por supuesto, la mielinización. Entre las moléculas estudiadas se encuentran los receptores-canal del tipo GABA_A (Vélez-Fort *et al.*, 2012).

Existen al menos cuatro trabajos previos sobre las características del receptor a GABA (GABA_AR) en diferentes preparaciones de células precursoras de oligodendrocitos (OPCs) y OLs (von Blankenfeld *et al.*, 1991; Williamson *et al.*, 1998; Bronstein *et al.*, 1998; Arellano *et al.*, 2016). Pero no existe en la literatura información suficiente que permita definir sin ambigüedades la composición de este receptor en el linaje oligodendrogial. Sin embargo, la información parece ser clara

en el sentido de que este representa un nuevo receptor tipo GABA_A (Olsen & Sieghart, 2008) de estequiometría inédita (Arellano *et al.*, 2016).

La determinación de los elementos moleculares que lo componen y la identificación de sustancias que permitan modular de manera específica estos receptores, permitirá obtener herramientas moleculares para su manipulación experimental, así como de su control genético. Esto hará posible, la exploración de sus funciones durante la diferenciación de los OLs y la importante etapa de mielinización.

En el presente proyecto estudiamos la posibilidad de que el receptor GABA_A expresado en oligodendrocitos es un nuevo subtipo formado por una combinación de las subunidades $\alpha 3 / \beta 2$ ó $\beta 3 / \gamma 1$ ó $\gamma 3$, como ha sido sugerido por nuestro grupo de trabajo (Arellano *et al.*, 2016), utilizando para ello la expresión heteróloga de las subunidades clonadas a partir del mRNA de OLs del nervio óptico de rata, y realizando un detallado análisis funcional por electrofisiología y farmacología.

2. Antecedentes

El sistema nervioso está conformado por varios tipos de células, de las cuales, las más estudiadas son las neuronas. Sin embargo, las funciones neuronales, no serían eficientes sin la participación de las células gliales, a tal grado que la evolución de los sistemas nerviosos complejos no hubiera ocurrido tal y como los conocemos, sin las funciones que lleva a cabo la neuroglía. Las células gliales intervienen activamente en el procesamiento de la información nerviosa, controlan la composición iónica del microambiente celular y los niveles de neurotransmisores; también son importantes en el establecimiento de las redes neuronales, mantienen la homeostasis y las funciones metabólicas del tejido nervioso, a la vez que lo protegen de posibles agentes patógenos. Estas funciones tienen lugar y se regulan en un entorno de estrecha comunicación neurona-neuroglía.

2.1 Los oligodendrocitos

Las células gliales mielinizantes en el SNC se denominan oligodendrocitos (OLs), estos son generados en el desarrollo a partir de células madres del ectodermo neuronal periventricular, las cuales se dividen asimétricamente y dan lugar a las células progenitoras de oligodendrocitos (OPCs).

Este tipo de células han sido objeto de gran interés desde su descubrimiento (del Río Hortega, 1921; Raff *et al.*, 1983), debido a que el conocimiento de sus características es básico para comprender aspectos tales como el control de la generación de mielina. Así como de los procesos de reparación de los daños en el SNC, por ejemplo, el producido en enfermedades que provocan desmielinización.

Los OLs antes de ser maduros o mielinizantes pasan por diferentes estadios de diferenciación, cada uno de estos expresan marcadores moleculares específicos, definiendo el linaje oligodendroglial. Del Río Hortega (1921) clasificó a los OLs en cuatro tipos (I, II, III y IV) y se basó, fundamentalmente, en sus características morfológicas, como son el número y la orientación de los procesos celulares, la forma y el tamaño del soma, el calibre de los axones con que se asocian

y la distribución en el SNC. Los oligodendrocitos con fenotipo I y II tienen un soma pequeño y redondeado (entre 10 y 12 μm), del que se proyectan entre cuatro y cinco procesos primarios cuyas ramificaciones mielinizan entre 10 y 30 axones de pequeño calibre (menos de 2 μm). Estos fenotipos han sido los más estudiados hasta la fecha, y conforman la mayor población en la sustancia blanca, donde se encuentran axones de pequeño calibre. A pesar de estas semejanzas ambos fenotipos se pueden distinguir por la orientación de los axones que mielinizan. Los de tipo I, se asocian a axones que se orientan en diferentes direcciones y con una distribución aleatoria, mientras que los de tipo II mielinizan axones que se orientan de forma paralela y se ubican muy cercanos al soma del OLs (Butt *et al.*, 1998). En el ratón, los OLs de tipo I se han localizado en la corteza frontal y el hipocampo, la distancia internodal en estas regiones es de entre 10 a 50 μm . Mientras que los de tipo II se han encontrado en la corteza, nervio óptico, cerebelo y médula espinal y la distancia internodal está comprendida entre 50 a 350 μm .

Por su parte los OLs de tipo III se localizan en áreas donde los axones tienen un diámetro superior a 4 μm como son la médula espinal, los pedúnculos cerebrales y cerebelares y la médula oblonga. Estas células tienen forma ovoide y alargada con un diámetro entre 12 y 15 μm y mielinizan axones con un calibre entre 4 y 15 μm , con una distancia internodal aproximada de 400 μm . Finalmente, los oligodendrocitos de tipo IV se encuentran asociados a tractos con axones con un calibre superior a 10 μm . Su soma no tiene procesos y generalmente mielinizan a un solo axón, con una distancia internodal superior a 1000 μm (Butt, 2013).

Recientemente, fue realizado un estudio del transcriptoma en 5072 células que expresaban marcadores del linaje oligodendrogliol. Las células fueron aisladas de diez regiones diferentes del SNC de ratones de diferentes edades. En este trabajo se identificaron 13 poblaciones de células que representan un continuo en el proceso de maduración de los OPCs a OLs maduros. Además, plantean que la diferenciación inicial de los OLs es semejante en todo el SNC, mientras que la maduración de los diferentes subtipos de OLs ocurre en las etapas postnatales y de manera sitio-específica. De manera particular encontraron que los oligodendrocitos

que expresan el marcador ITPR2, están implicados en la mielinización rápida, por lo que pueden ser relevantes en procesos de remielinización (Marques *et al.*, 2016).

Una alta proporción de las células llamadas NG2⁺, que expresan en su superficie el proteoglicano NG2, corresponden con OPCs. Estas células progenitoras pueden ser identificadas por técnicas de inmunohistoquímica o por hibridación *in situ*, a través de diferentes marcadores como son NG2 y el receptor α del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR α). La expresión de ambos es rápidamente regulada a la baja, cuando las OPCs se diferencian hacia OLs. Además de estos, se emplean como marcadores los factores de transcripción Olig2 y Sox10, aunque se sabe que estos se mantienen expresados en los OLs maduros (Bergles & Richardson, 2015).

Las células progenitoras de oligodendrocitos son Olig2⁺ y NG2⁺. Una forma de identificar células NG2⁺ en proliferación es la expresión del marcador de ciclo celular Ki67 (Ki67⁺), mientras que los oligodendrocitos maduros no proliferantes expresan CC1 (células CC1⁺) (Zonouzi *et al.*, 2015).

La enzima CNPasa (2',3'-nucleótidos cíclicos-3'-fosfodiesterasa) es expresada en el SNC por los OLs y se localiza inmunohistoquímicamente en el cuerpo celular y más en los procesos que hacia las zonas de mielina compacta (Lappe-Siefke *et al.*, 2003)

Las OPCs tienen una morfología bipolar, son proliferativas, y en el desarrollo pueden migrar grandes distancias, hasta alcanzar su ubicación final en la sustancia blanca. Tanto en el prosencéfalo como en la médula espinal las OPCs tienen un origen ventral inicialmente, más tarde, aunque en menor cantidad, se derivan de zonas dorsales. El desarrollo de OLs en otras partes del cerebro, como son el diencéfalo y el cerebelo está aún en discusión. Una población de OPCs, persiste en el cerebro adulto, donde constituyen el principal tipo celular proliferativo que da lugar a oligodendrocitos mielinizantes, por ejemplo, ante daños patológicos ocasionados a la mielina. Se ha propuesto que además de ser células precursoras de OLs, estos OPCs en el cerebro adulto son progenitoras multipotentes con la capacidad de dar lugar a neuronas y a astrocitos (Nishiyama *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2010).

Además, se plantea que el mantenimiento de dicha población celular en el SNC en adultos, permite monitorear de forma local el estado de la mielinización y responder de manera inmediata ante daños desmielinizantes o ante demandas fisiológicas de mielina. La diferenciación a OLs maduros es regulada por varios factores tales como hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores, péptidos, factores humorales, así como la actividad eléctrica axonal. En este sentido, la mielina es un inhibidor de la extensión axonal, de modo que la mielinización parece iniciarse solo después que el circuito neuronal esté establecido (Bergles & Richardson, 2015).

2.2 Mielina

Una de las interacciones neurona-glia más importantes en extensión y consecuencias funcionales es la existencia de células gliales que envuelven, con membrana, los procesos neuronales de los vertebrados. Esta envoltura es conocida como vaina de mielina, nombre que fue acuñado por el investigador alemán Rudolf Virchow (1854).

El refinamiento de las técnicas de microscopía electrónica (ME) y los estudios bioquímicos, así como el empleo de modelos animales transgénicos, dio la posibilidad de conocer la arquitectura molecular de la vaina de mielina (Simons & Nave, 2015). Los primeros estudios sobre la ultraestructura de la mielina, empleaban ME de tejidos deshidratados y fijados con glutaraldehído, con la desventaja de que este procedimiento colapsa los espacios intracelulares. Sin embargo, en la actualidad se emplea la ME fría de alta presión. Esto preserva la arquitectura de los tejidos analizados, y ha permitido detallar los espacios citoplasmáticos oligodendrogiales en las áreas mielinizadas (Mobius *et al.*, 2008).

La mielina es un grupo de capas de membrana, con un arreglo periódico, en el que se alternan zonas electrodensas con zonas que no lo son, y se disponen envolviendo a los axones a modo de vaina. Esta vaina se interrumpe en intervalos regulares, formando los denominados nodos de Ranvier, que son zonas axonales desprovistas de mielina, y ricas en canales de Na⁺ y K⁺ dependientes de voltaje

(Figura 1). La mielina permite que la velocidad de conducción del impulso nervioso a través del axón, sea varias veces más rápida que la de los axones de igual diámetro desprovistos de ella. Esto se debe a dos efectos fundamentales: la disminución de la capacitancia de la membrana y al aumento de la resistencia de membrana. Esto hace que la constante de espacio de la fibra axonal que recubren, se incremente.

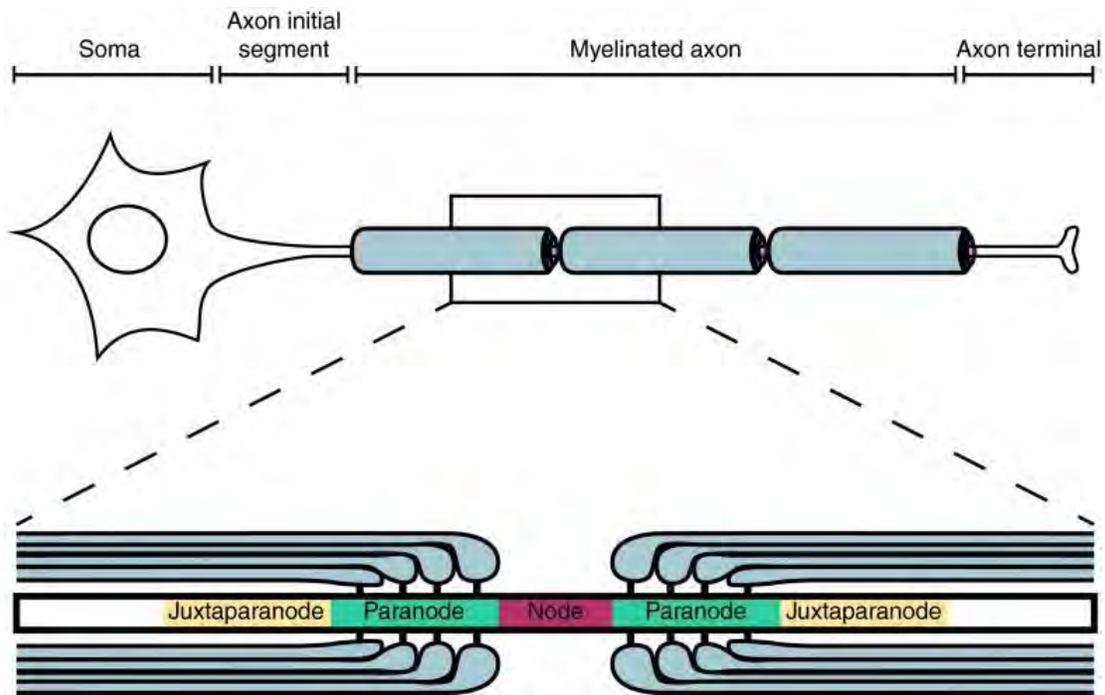


Figura 1. Nodo de Ranvier.

En la figura se muestran los segmentos neuronales principales y se amplifica la región de un nodo de Ranvier en el axón mielinizado. Se identifican tres zonas principales de esta estructura señaladas con los colores rojo, verde y amarillo. Este esquema fue modificado de Arancibia-Carcamo & Attwell (2014).

Así el potencial de acción se propaga en “saltos” de un nodo a otro (Kandel *et al.*, 2013). Existen varios estudios que demuestran que el grosor de la mielina, así como la distancia internodal, son formas de modular la velocidad de conducción del potencial de acción en los axones mielinizados (Ullén, 2009). También, utilizando varios paradigmas experimentales, se ha mostrado que el grado de mielinización correlaciona con la actividad neural. Por ejemplo, ha sido observado en ratas que

son entrenadas a atrapar alimento, que el aumento en la sustancia blanca visualizado con imágenes de resonancia magnética, correlaciona con el aumento en la expresión de proteínas de la mielina (Sampaio-Baptista *et al.*, 2013). También, McKenzie y colaboradores (2014) mostraron que es necesaria la producción de nueva mielina en el SNC de ratones, para favorecer la adquisición de habilidades para correr en un paradigma de rueda.

La estructura molecular de la mielina se caracteriza por tener poca hidratación (40 %). Está compuesta de lípidos (70 %), con altas concentraciones de colesterol y fosfolípidos, y proteínas (30 %). De estas últimas, la mayoría son constituyentes específicos de la mielina y se usan para la identificación de OLs por inmunohistoquímica. Los lípidos de la mielina en el SNC son ricos en el glicoesfingolípidido galactocerebrósido (GalC) y el derivado sulfatado que es reconocido por el anticuerpo O4. Ambos son marcadores de oligodendrocitos (Sommer & Schachner, 1981).

En el SNC, la conforman dos proteínas principales, la proteína básica de la mielina (MBP) y la proteína proteolipídica (PLP). La primera, es pequeña con carga positiva y se encuentra en la superficie citoplasmática y constituye el 30 % del total de proteínas presentes en la mielina. La PLP es una proteína integral de membrana y es la proteína más abundante en la mielina (50 %). Aunque su expresión (relativa a la expresión de MBP) varía en función del diámetro de los axones. Las fibras mielinizadas más finas presentan más altos niveles de esta proteína que los mielinizados de mayor calibre. Presumiblemente, ambas proporcionan estabilidad estructural a la vaina (Butt, 2013).

La glicoproteína mielínica de oligodendrocitos (MOG) y la glicoproteína asociada a la mielina (MAG) también se encuentra formando parte de la mielina y también se emplean para la identificación de OLs. MAG se expresa tanto en el SNC como en el sistema nervioso periférico (SNP) mientras que MOG es específica del SNC y es el autoantígeno diana en la desmielinización primaria en la Esclerosis Múltiple (EM) (Clements *et al.*, 2003). La MAG presenta dos isoformas la pequeña (S-MAG) y la grande (L-MAG). Los estudios hasta el momento indican que la isoforma S es esencial en la mielinización normal en el SNP, mientras que la L es

funcionalmente importante en el SNC (Schachner & Bartsch, 2000). Butt (2013) ha mostrado que existen diferencias bioquímicas entre los diferentes fenotipos de OLs, ya que los fenotipos I y II expresan la isoforma II de la anhidrasa carbónica (CAII) y no expresan S-MAG (CAII⁺/S-MAG⁻), mientras que los fenotipos III y IV son CAII⁻/S-MAG⁺.

Otra peculiaridad de la mielina es su estabilidad metabólica, el tiempo de vida media de sus componentes estructurales está en el orden de semanas o meses (Toyama *et al.*, 2013). Además, la mielina se encuentra no solo compartimentalizada estructuralmente, sino también bioquímicamente en diferentes dominios. La mayoría de los OLs generan simultáneamente de entre 20 a 60 procesos de mielinización con una distancia internodal de entre 20 a 200 μm y con aproximadamente 100 vueltas de membrana con lo que se logra cubrir un área de entre 5 a 50 x 10³ μm^2 . En el cuerpo humano no existe ningún otro tipo celular que pueda cubrir estas dimensiones (Simons & Nave, 2015).

2.3 Mielinización

La mielinización es una compleja secuencia de eventos que tienen como finalidad el establecimiento de la estrecha relación entre los oligodendrocitos y los axones de las neuronas, a través de la vaina de mielina. Para su mejor comprensión y estudio se ha dividido en los siguientes eventos: (1) la proliferación y migración de OPCs hacia y en los tractos de sustancia blanca; (2) la identificación de los axones blanco y la consecuente señalización axón-glía; (3) la diferenciación de las OPCs a oligodendrocitos mielinizantes; (4) el crecimiento de la membrana de los OLs y el enrollado de los axones; (5) el aumento del tráfico de componentes de la membrana; (6) la compactación de la mielina y (7) la formación de nodos (Emery, 2010; Freeman & Rowitch, 2013).

Las OPCs proliferan y migran desde las zonas periventriculares y subventriculares del cerebro, donde se encuentra la sustancia blanca en desarrollo. En peces cebra y ratones se ha observado que durante este proceso migratorio las OPCs constantemente emiten y retraen proyecciones de su membrana hasta llegar

a su ubicación final (Hughes *et al.*, 2013). Un elemento importante en este paso, es el control del número de oligodendrocitos. Un mecanismo que se ha propuesto para este control, es el establecimiento de una competencia por las cantidades limitantes de factores neurotróficos y de crecimiento. Entre estos se encuentran el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-A), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF-2), el factor de crecimiento tipo insulina (IGF-1), la neurotrofina NT-3, y el factor neurotrófico ciliar (CNTF) (Barres & Raff, 1994; Miller, 2002). También la activación de mecanismos de apoptosis controla la población resultante de oligodendrocitos formadores de mielina (Simons & Nave, 2015).

Las OPCs en su maduración pasan por diferentes estadios de diferenciación morfológica y funcional. En cada uno se expresan marcadores biomoleculares lipídicos o proteicos, así como factores de transcripción específicos. Con el fenotipo molecular y la morfología se pueden agrupar de manera secuencial las diferentes células que conforman el linaje oligodendroglial: OPC, oligodendrocito premielinizante inmaduro y oligodendrocito mielinizante maduro (Baumann & Pham-Dinh, 2001; Ono & Ikenara, 2013).

Una vez iniciada la mielinización, los OLs tardan entre cinco y diez horas en generar las vainas de mielina en sus axones blanco. La secuencia de eventos de diferenciación de los OLs está en coordinación con el programa de desarrollo neuronal. Por esta razón como consenso general se acepta que señales neuronales controlan la transformación de las OPCs en oligodendrocitos formadores de mielina. Hasta el momento no se conoce la molécula que dispara el inicio de la mielinización en el SNC, a diferencia del sistema nervioso periférico donde se ha identificado que la neuregulina-1 presente en la membrana de los axones es la molécula que controla la mielinización mediada por las células de Schwann (Simons & Nave, 2015).

Además, se sabe poco sobre qué es lo que determina que los OLs seleccionen los axones blanco de mielinización. Algunos investigadores plantean que se da por el reconocimiento, por parte de los OLs, de moléculas de adhesión específicas expresadas sobre la membrana de los axones (Simons & Lyons, 2013). Pero otros apuntan a que las dimensiones del axón son suficientes para determinar este

proceso. Un ejemplo de esto último son los resultados de los experimentos donde se cultivaron OPCs, en contacto con fibras sintéticas. Las fibras con un calibre mayor a 400 nm fueron mielinizadas por las células cultivadas, sugiriendo que no son necesarias las moléculas de adhesión ni factores de crecimiento para iniciar la formación de mielina (Lee *et al.*, 2012); en estos experimentos el calibre de 400 nm de las fibras es muy cercano al umbral en el que los OLs mielinizan a los axones.

La mielinización diferencial de fibras axónicas ha sido estudiada en otros modelos, tal es el caso de las neuronas del núcleo coclear que forman parte del circuito que interviene en la detección de la fuente del sonido. De estas neuronas, parte un único axón que se bifurca en una rama ipsilateral y una contralateral. Los estudios demuestran que existe una propagación diferencial del impulso nervioso en cada rama, lo que hace posible que la información que viaja por cada una, coincida en el tiempo y pueda ser integrada. Esta modulación de la velocidad de propagación en cada una de las ramas, se debe al menos en parte, a cambios en las características de la mielina promovidos por la interacción local de los segmentos axonales y los oligodendrocitos (Seidl *et al.*, 2014).

Las evidencias experimentales indican que las neuronas eléctricamente activas estimulan la proliferación de las OPCs, e inducen de manera selectiva la mielinización de los circuitos neuronales activos (Demerens *et al.*, 1996; Gibson *et al.*, 2014). Entre las moléculas mediadoras de este proceso, se han propuesto al ATP y el glutamato, contenido en las vesículas liberadas por los axones (Ishibashi *et al.*, 2006; Wake *et al.*, 2011).

Otros hallazgos evidencian que la interacción, entre las neuronas y los OLs, no solo es esencial en la mielinización, sino que puede determinar la supervivencia de las neuronas. Griffiths y colaboradores (1998) demostraron que la pérdida de la mielina, inducida por la ausencia de proteínas mielínicas específicas, provocaba degradación axonal y muerte neuronal. Esto evidencia la función de apoyo metabólico de los OLs a los axones.

Recientemente se demostró la liberación de exosomas (nanovesículas de 40 a 120 nm de diámetro) desde los OLs a los axones. Los exosomas, contienen distintas moléculas, tales como diversas enzimas, proteínas de membrana, así

como mRNA y miRNA. Al ser liberados los exosomas oligodendrogiales, estos son endocitados por las neuronas y la microglía, y su contenido es utilizado por estas células. En estos estudios, fue demostrado también, que las nanovesículas pueden ser liberadas por la activación de receptores ionotrópicos glutamatérgicos tipo AMPA y NMDA oligodendrogiales, por un mecanismo dependiente del influjo de Ca^{2+} extracelular; previamente, había sido demostrado que la actividad eléctrica neuronal provoca la liberación de ácido glutámico desde el axoplasma (Frühbeis *et al.*, 2013).

La mielinización dista de ser un proceso estático, ya que es un fenómeno que muestra una alta plasticidad, modulada por la interacción dinámica, en tiempo y espacio, de las neuronas y las células oligodendrogiales. Se han obtenido mapas de alta resolución de la distribución de la mielina en axones individuales de la corteza cerebral (Tomassy *et al.*, 2014), estos muestran patrones en los que zonas mielinizadas están separadas por extensas zonas sin mielina. El patrón de mielinización que presenta cada neurona, le confiere identidad, las observaciones sugieren que es una estrategia para modular la comunicación a distancia entre grupos o circuitos neuronales.

El mal funcionamiento del proceso de mielinización en el humano tiene graves consecuencias para el sistema nervioso. Entre las enfermedades desmielinizantes encontramos las leucodistrofias, las secuelas producidas por isquemia durante accidentes cerebrovasculares y la esclerosis múltiple. Esta última tiene una prevalencia de 1:1000 habitantes, entre la población de adultos jóvenes en el mundo occidental (Bradl & Lassmann, 2013).

2.4 GABA y Oligodendrocitos

Existen varios estudios, en los que se proponen moléculas y neurotransmisores que actúan en diferentes etapas del proceso de maduración del linaje oligodendrogial, y se sugiere que son protagonistas en la estrecha comunicación neurona-oligodendrocito.

Las OPCs expresan receptores a diferentes neurotransmisores entre los que se encuentran los de AMPA y NMDA para glutamato, así como receptores al GABA y la acetilcolina (Barres *et al.*, 1990; Cahoy *et al.*, 2008). Estos descubrimientos refuerzan la idea de que a través de estos receptores y sus neurotransmisores se puede modular la fisiología de los OLs en respuesta a las demandas del ambiente neuronal que los rodea. Las OPCs también expresan canales iónicos dependientes de voltaje, estos pueden ser de Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ (Bergles, 2012).

En los últimos años varios trabajos indican que las OPCs forman sinapsis directas con neuronas glutamatérgicas o gabaérgicas en diferentes zonas del cerebro como son el hipocampo, el cerebelo, la corteza, el tallo cerebral, en tractos de la sustancia blanca así como en la sustancia gris (Bergles *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2009; Vélez-Fort *et al.*, 2010). Se sabe además que la expresión de los receptores, y de las sinapsis con neuronas, pueden cambiar a lo largo del linaje oligodendroglial.

En el caso de los receptores AMPA y NMDA disminuye rápidamente su expresión en las OPCs y las sinapsis desaparecen cuando estos comienzan a diferenciarse (De Biase *et al.*, 2010; Kukley *et al.*, 2010). Paez y colaboradores (2009) estudiaron la regulación de la homeostasia del Ca²⁺ en OPCs y demostraron que la migración de estas células desde los sitios de proliferación hasta su ubicación final en el cerebro, estaría determinada por la entrada de este ion estimulada por la activación de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje.

Estudios recientes muestran que las células gliales expresan receptores metabotrópicos e ionotrópicos a GABA (ácido gamma-amino butírico) así como su posible importancia en la interacción neurona-glía, en procesos fundamentales en el sistema nervioso como la actividad neuronal, diferenciación, neuroprotección y la mielinización (Vélez-Fort *et al.*, 2012; Yoon & Lee, 2014; Arellano *et al.*, 2016).

El GABA es el neurotransmisor inhibitorio de más amplia expresión en el sistema nervioso (Olsen & Sieghart, 2008; Olsen, 2015). Las moléculas que intervienen en la señalización que rige la diferenciación, y las capacidades mielinizantes de los OLs no han sido del todo esclarecidas, sin embargo, existen algunas evidencias que el GABA participa en este fenómeno.

Tanto los OPCs como los OLs maduros expresan receptores tipo GABA_B (GABA_BR). Estos son receptores metabotrópicos acoplados a proteína G y son los encargados de mediar los efectos relativamente lentos que tiene GABA en el SNC. De los GABA_BR se han descrito dos isoformas: la GABA_{B1} y la GABA_{B2} y las variantes alternativas resultado de “splicing” GABA_{B1(a-g)}. Los estudios indican que cuando estos receptores tienen ubicación presináptica regulan a la baja la liberación de neurotransmisores a través de la inhibición de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje. En la postsinapsis, la activación de los GABA_BR provoca la inhibición de la adenilato ciclasa (AC), lo que induce la activación de los canales de potasio tipo Kir3, y de esta manera hiperpolariza la membrana postsináptica (Bettler *et al.*, 2004).

Luyt y colaboradores (2007) demostraron, mediante inmunofluorescencia, la presencia de proteínas del GABA_BR en las OPCs aisladas de la sustancia blanca periventricular de ratones neonatos (P4). Además, encontraron que la activación de estos receptores con baclofen (agonista selectivo de GABA_BR) incrementa tanto la migración como la proliferación de las OPCs. Lo que sugiere que este tipo de receptores puede tener un papel importante en el proceso de maduración de los OLs.

También, receptores GABA_A funcionales tanto en OPCs como en oligodendrocitos, fueron descritos por primera vez en explantes cultivados y en cultivos primarios de médula espinal y regiones cerebrales embrionarias, respectivamente (Gilbert *et al.*, 1984; Hoppe & Kettenmann, 1989; von Blankenfeld *et al.*, 1991). La corriente neta que se observa, posterior a la activación del receptor muestra un potencial de inversión cercano al potencial de equilibrio del Cl⁻. En neuronas maduras este movimiento de cargas tiene un efecto hiperpolarizante mientras que en las OPCs tiene un efecto despolarizante. Esto se debe a dos aspectos, primero a que estas células mantienen una alta concentración intracelular de este ion, gracias a la acumulación de Cl⁻ a través de transportadores. Y segundo a que la despolarización generada, induce la activación de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje lo que incrementa la despolarización (Kirchoff & Kettenmann, 1992; Lin & Bergles, 2004; Tanaka *et al.*, 2009).

Según Vélez-Fort y colaboradores (2012) uno de los descubrimientos más importantes de los últimos 10 años, en el estudio de la interacción neurona-glia fue el realizado por Bergles y colaboradores (2000), donde demuestran la existencia de sinapsis funcionales entre neuronas y OPCs. En este sentido las primeras sinapsis gabaérgicas en OPCs fueron estudiadas en rebanadas de hipocampo de ratas juveniles (Lin & Bergles, 2004).

Es importante resaltar, que la entrada sináptica gabaérgica puede controlar la actividad de las OPCs, y de este modo actuar sobre la oligodendrogénesis y la mielinización. Existen evidencias que apoyan esta idea como son, la alta frecuencia de los eventos espontáneos en las sinapsis gabaérgica en las OPCs corticales, durante la segunda semana postnatal (Vélez-Fort *et al.*, 2010), momento en el que la producción de oligodendrocitos premielinizantes alcanza un pico máximo (Baracska *et al.*, 2002).

Estudios recientes muestran cómo la señalización gabaérgica regula la proliferación y diferenciación *in vivo* de las OPC que expresan NG2 en la sustancia blanca cerebelar (Zonouzi *et al.*, 2015). En un modelo de leucomalacia inducida por hipoxia, los autores detectaron que esta manipulación provoca una pérdida significativa de los receptores GABA_A en estas células, a la vez que aumenta su proliferación y no son capaces de diferenciarse en OLs mielinizantes, dando paso a una hipomielinización. En estas circunstancias, después del tratamiento hipóxico, animales que fueron tratados con tiagabina (inhibidor selectivo del transportador de GABA, GAT-1) y con vigabatrin (inhibidor de la transaminasa de GABA), drogas que aumentan la disponibilidad de GABA en el espacio sináptico, tuvo como resultado la disminución de la proliferación de las células NG2⁺, y el aumento del número de oligodendrocitos mielinizantes, revirtiendo los efectos producidos por la hipoxia. Esto abre la posibilidad de desarrollar terapias que promuevan la repoblación de los OLs mielinizantes en zonas cerebrales dañadas manipulando la señalización gabaérgica neurona-oligodendrocito.

A estos hallazgos mediados por la inhibición de GAT-1, Zonouzi y colaboradores (2015) los interpretaron como que existe en este modelo un problema en la señalización gabaérgica entre las interneuronas de la sustancia blanca y las

células NG2⁺. Dicha conclusión está basada en que en la literatura solo se reportaba la presencia de este transportador en las terminales axónicas y en los procesos de los astrocitos. Sin embargo, Fattorini y colaboradores (2017) con el empleo de métodos y técnicas de inmunocitoquímica lograron demostrar que el GAT-1 se expresa tanto en oligodendrocitos inmaduros como maduros, presentes en la sustancia blanca subcortical. Este importante descubrimiento, sugiere la participación de los OLs en varias enfermedades en las que están implicados los transportadores GAT-1, como son la epilepsia y la esquizofrenia.

Hamilton y colaboradores (2017), a través del estudio de cultivos organotípicos de la corteza cerebral de ratones, en los que los OLs Sox10⁺ fueron marcados con proteína verde fluorescente (GFP), encontraron que el GABA liberado de forma endógena, actúa sobre receptores GABA_A y reduce el número de células del linaje oligodendroglial. De manera particular, demostraron que esta reducción está correlacionada con el aumento de la distancia internodal. Este parámetro se había planteado que solo dependía del diámetro de los axones (Rushton, 1951) o que era una propiedad intrínseca de los oligodendrocitos mielinizantes (Bechler *et al.*, 2015).

Otra evidencia de la intervención del GABA en el reconocimiento entre los axones y los OLs, es el hecho de que la expresión de los receptores GABA_A, en la membrana de los OLs, depende de su interacción con los axones, mientras que cuando no tienen dicho contacto los OLs pierden la expresión del receptor (Arellano *et al.*, 2016). Además, en este estudio fue demostrado que los receptores GABA_A oligodendrogliales tienen características funcionales y farmacológicas que los distinguen de los presentes en neuronas, en astrocitos, y probablemente de los expresados por OPCs en el cerebro de individuos adultos (Arellano *et al.*, 2016).

2.5 Receptores GABA_A (GABA_AR)

Los receptores-canal GABA_A permiten el flujo de iones Cl⁻ a través de la membrana, pertenecen a la superfamilia de receptores activados por ligando, junto con los receptores acetilcolina nicotínicos, el receptor de glicina, los receptores 5-

HT₃ y los canales iónicos activados por Zn²⁺; los cuales presentan un asa Cys en su dominio extracelular (Hevers & Lüddens, 1998).

Están formados por cinco subunidades proteicas, que atraviesan la membrana celular, y se disponen de manera concéntrica rodeando el poro conductor. Desde una vista perpendicular al plano de la membrana, el receptor es un cilindro de aproximadamente 80 Å de diámetro y 110 Å de largo, aproximadamente 65 Å sobresalen de la membrana en el lado extracelular. Desde este dominio y visto en el plano de la membrana, este tiene la apariencia de un toroide y en él se encuentran varios sitios de unión para agonistas y otras moléculas moduladoras (Figura 2).

Cada subunidad tiene un extremo amino extracelular, hidrofílico y largo, seguido de cuatro α-hélices transmembranales (TM1-TM4) que están conectados por asas. El asa entre los dominios TM3 y TM4 es más largo que los demás, se ubica en el lado citosólico y presenta sitios de fosforilación; por su parte el extremo carboxilo se ubica extracelularmente y es relativamente corto. Los TM2 forman el revestimiento del canal del receptor (Olsen & Sieghart, 2008).

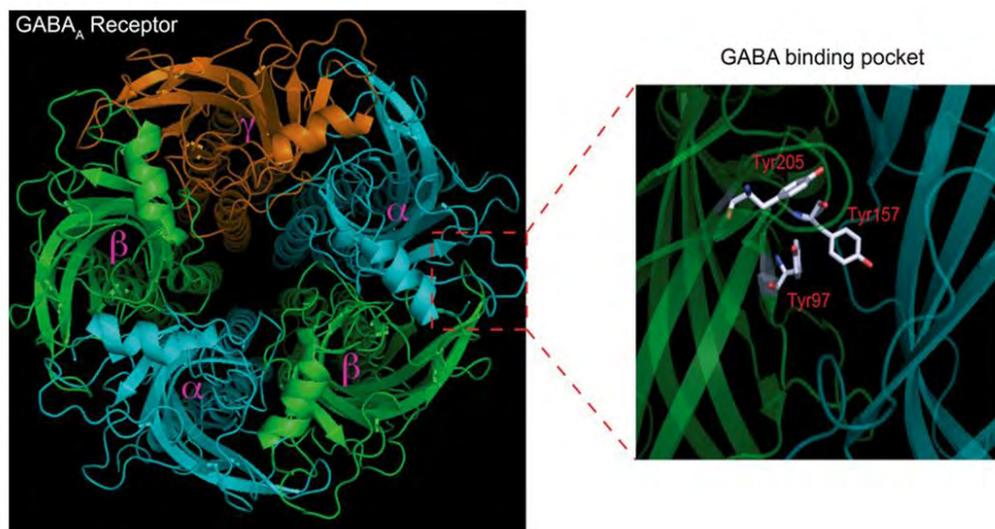


Figura 2. Receptor GABA_A.

En la figura se indica el nombre de las cinco subunidades que componen a este receptor. Además, aparece aumentado el sitio de unión a GABA. Este esquema fue tomado de Miller & Aricescu (2014).

Actualmente se conocen 19 genes que codifican para distintas subunidades llamadas: α (1-6), β (1-3), γ (1-3), ρ (1-3), δ , ϵ , θ y π (Barnard *et al.*, 1998; Simon *et al.*, 2004), las diferentes combinaciones, tanto homoméricas como heteroméricas, poseen características farmacológicas y funcionales distintivas. Además, la expresión de los diferentes subtipos y las propiedades funcionales de cada uno varían entre las regiones cerebrales. Esto hace pensar que intervienen en múltiples procesos esenciales en la fisiología del sistema nervioso central (Krall *et al.*, 2014).

Los GABA_AR están distribuidos de manera ubicua en el Sistema Nervioso Central, sugiriendo su importante participación en el procesamiento de la información. Además, existen varias drogas psicoactivas que ejercen sus efectos moduladores a través de este tipo de receptores. De este modo, se usan en el tratamiento de enfermedades psiquiátricas como son: la ansiedad, el alcoholismo, el insomnio, el pánico, y varias más (Hevers & Lüddens, 1998).

Entre estas drogas moduladoras se encuentran las benzodiazepinas (BZDs), los neuroesteroides, los barbitúricos y cationes de interés fisiológico como el Zn²⁺. Algunos de los sitios de unión para estas sustancias se han estudiado en GABA_AR de diferentes composiciones y varios de los hallazgos han sido confirmados estructuralmente mediante estudios de cristalografía (Miller & Aricescu, 2014). Los sitios de unión a GABA son dos (Figura 3) y se encuentran conformados con la participación de la interfase de subunidades α -/ β + vecinas en el pentámero, también se ha demostrado que las BZDs se unen a un sitio específico, homólogo a los de GABA, en la interfase de las subunidades α +/ γ - (Figura 3). Las interfases que no conforman los sitios clásicos de reconocimiento para estas sustancias, también presentan sitios de unión homólogos y se han propuestos como nuevos blancos moleculares del receptor (Sieghart *et al.*, 2012) lo que aumenta su potencial farmacológico.

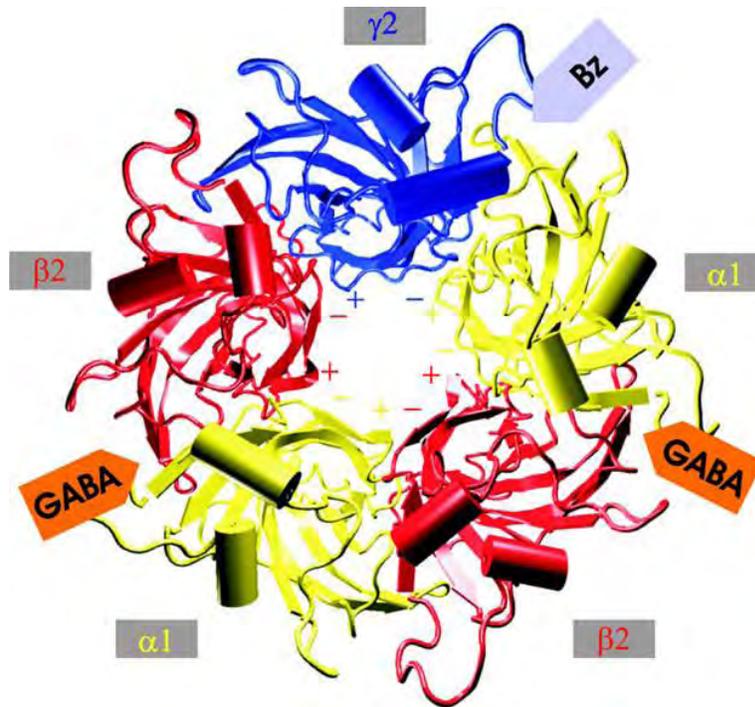


Figura 3. Sitios de GABA y de unión a Benzodiazepinas en el receptor GABA_A.

En la figura se indica la ubicación de los sitios de unión a GABA y a Benzodiazepinas sobre este tipo de receptores. Las diferentes subunidades están indicadas en colores: las dos $\alpha 1$ en color amarillo, las dos subunidades $\beta 2$ en color rojo y la subunidad $\gamma 2$ en azul. Este esquema fue tomado de Sarto-Jackson & Sieghart (2008).

Es claro que las propiedades de los sitios de unión dependen del tipo de subunidades que participan en él, las diferentes combinaciones posibles entre las 19 subunidades conocidas resultan en una cantidad de cientos de receptores diferentes (Olsen & Sieghart, 2008), pero muchas de estas combinaciones son inviables. Las reglas que determinan este proceso son desconocidas. Actualmente se han confirmado 11 subtipos del receptor expresados fisiológicamente, entre los que las combinaciones $\alpha\beta\gamma 2$, $\alpha\beta\delta$, y los homómeros de ρ son las principales. También se han identificado 6 subtipos probables del receptor, entre los que sobresalen los conformados por subunidades $\alpha\beta$ y los que contienen dos subunidades α distintas, la $\alpha 1$ y $\alpha 6$ asociadas con $\beta\delta$ o $\beta\gamma$ (Olsen & Sieghart, 2008).

La composición del receptor en los OLs permanece desconocida, de hecho, existían reportes controversiales en aspectos importantes de su farmacología y en

otras características funcionales básicas, que dependen de la estequiometría del pentámero, sin embargo, ahora es claro que su composición es única, y representa un nuevo receptor a GABA tipo A, específico del linaje oligodendroglial (Vélez-Fort *et al.*, 2012; Arellano *et al.*, 2016).

2.6 Moduladores alostéricos de los Receptores GABA_A

La composición pentamérica de los GABA_ARs hace que tengan una complejidad estructural relativamente alta, con respecto a otros receptores membranales. Hasta la fecha, se han identificado cientos de compuestos de diferentes características químicas que modulan, activan o inhiben a este tipo de receptores. La mayoría de estas sustancias interactúan con más de un sitio de este complejo molecular.

La identificación de muchos de estos sitios ha sido posible mediante el uso de técnicas como la mutagénesis, la sustitución de cisteínas, la cristalografía de rayos X, el modelaje molecular, el fotomarcado y el acoplamiento molecular (Sieghart, 2014). La existencia de todos ellos en un mismo receptor tiene como consecuencia una elevada complejidad farmacológica. Además, es de gran importancia determinar su ubicación en el receptor ya que, esto puede acelerar el diseño y uso de drogas selectivas con uso terapéutico (Figura 4).

Pero antes de entrar en el análisis de algunas de las drogas que tienen como blanco a los GABA_ARs, fundamentalmente de aquellas que se emplean en este trabajo, debemos definir qué es un modulador alostérico.

Las sustancias que, al unirse al receptor, lo activan, cambian su conformación y provocan su apertura, se denominan agonistas. El sitio al que se une el agonista se denomina ortostérico y al resto de los sitios se les denomina alostéricos. En contraste, los antagonistas al unirse al receptor, no permiten que el agonista actúe por lo que su activación es inhibida. Estos efectos pueden ser mediados tanto por la unión del antagonista al sitio ortostérico como por la unión a sitios alostéricos. Además, existen los llamados agonistas inversos, que son sustancias que se unen

al mismo sitio que un agonista, pero inducen una respuesta farmacológica opuesta a la que este provoca (Lees *et al.*, 2004).

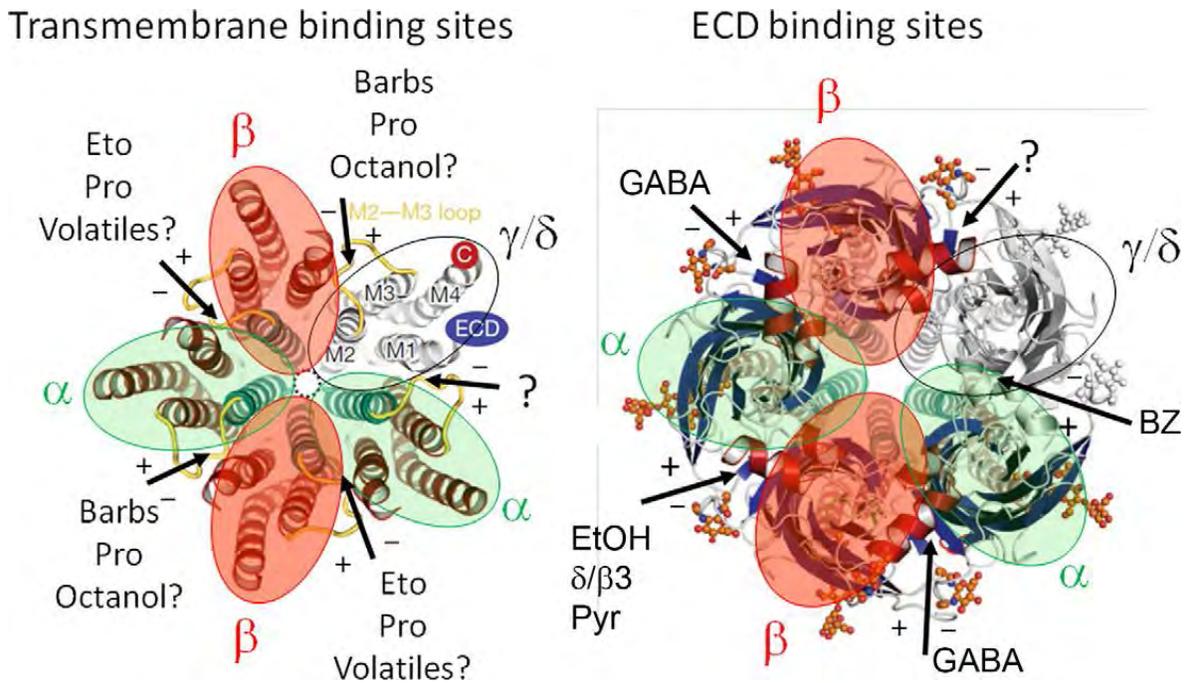


Figura 4. Sitios de unión a diferentes ligandos en el receptor GABA_A.

El panel de la izquierda muestra los sitios transmembranales, el de la derecha muestra los sitios ubicados en el dominio extracelular. En ambos casos, el receptor es observado desde la cara extracelular y de forma perpendicular a la membrana plasmática. Las diferentes subunidades están indicadas en colores: las dos α en color verde, las dos subunidades β en color anaranjado y la subunidad δ/γ en blanco. Como ejemplo se simbolizan los dominios transmembranales de una subunidad como M1-M4. En color azul se muestra el extremo N-terminal de cada subunidad y en rojo el extremo C-terminal ("C" de color blanco en un círculo rojo). Los sitios de unión son señalizados con una flecha negra. BZ (benzodiazepina); GABA (ácido γ -aminobutírico); EtOH (etanol); Pro (propofol); Pyr (pirazoloquinolinas); Eto (etomidato); Barbs (barbitúricos). El signo de interrogación significa que no se ha demostrado la unión de esa sustancia a ese sitio, pero que se une con alta probabilidad. Este esquema fue tomado de Olsen (2015).

Los moduladores alostéricos regulan el efecto de un agonista al unirse a un sitio alostérico sobre el receptor. Esto provoca que su unión al receptor en ausencia de agonista no afecta su actividad. Si el efecto del agonista sobre la actividad del receptor es incrementado alostéricamente, este se le denomina modulador

alostérico positivo (PAM), mientras que un modulador alostérico negativo (NAM) la disminuye (Monod *et al.*, 1965).

El sitio ortostérico de GABA fue descrito a través de uso de mutaciones sitio específicas y el empleo de varios ligandos de este receptor (Smith & Olsen, 1995). Teniendo en cuenta que la mayoría de los GABA_ARs contienen dos subunidades α y dos β , así como la ubicación del sitio de unión a GABA, hoy se sabe que existen dos sitios de unión de esta molécula en el receptor. Sin embargo, Karim y colaboradores (2013) sugieren que los receptores conteniendo una subunidad δ presentan, con una alta probabilidad, un tercer sitio de unión a GABA. Ya que la combinación $\alpha 4\beta 1\delta 3$ presenta afinidad a GABA tanto en el orden micromolar como nanomolar.

Un sitio que ha sido muy bien caracterizado en este tipo de receptores es el sitio de unión de benzodiazepinas (BZDs) (Figura 5), el cual se ubica en la vecindad de las subunidades α y γ . Las BZDs, comenzaron a ser usadas clínicamente en los años 60 del pasado siglo, debido a sus propiedades ansiolíticas, sedativas, anticonvulsivas y de relajación muscular. Rápidamente se convirtieron en las drogas de más uso terapéutico (Sieghart, 2014).

Entre estas sustancias se encuentra el diazepam, la benzodiazepina clásica, que actúa como agonista sobre el sitio de benzodiazepinas y tiene un efecto potenciador de la respuesta a GABA de este tipo de receptores. Walters y colaboradores (2000), encontraron que en el receptor $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ a bajas concentraciones de GABA produce una potenciación bifásica de la respuesta del receptor, con diferentes componentes una en el rango nanomolar y otra en el micromolar de concentración.

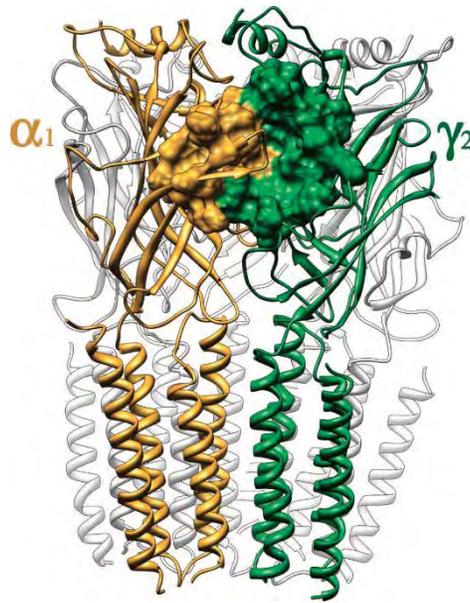


Figura 5. Sitio de unión de benzodiazepina en el receptor GABA_A.

En la figura se indica en color amarillo dorado la subunidad α_1 y en color verde la subunidad γ_2 entre las que se ubica el sitio de benzodiazepinas en el receptor GABA_A neuronal. Este esquema fue tomado de Taliani y colaboradores (2009).

Existen diferentes drogas que ejercen sus efectos a través de la unión al sitio de BDZ, tal es el caso del indiplon. Esta sustancia es una pirazolopirimidina y actúa como modulador alostérico positivo de GABA_ARs al unirse a este sitio, cuando está formado por la subunidad γ_2 (Petroski *et al.*, 2006). Las β -carbolinas son otro grupo de sustancias que han sido descritas como agonistas inversos sobre el sitio de BDZ. Estas tienen propiedades ansiogénicas y proconvulsivas entre estas encontramos a la butil- β -carbolina-3-carboxilato (β -CCB) (Peña *et al.*, 1986; Rigo *et al.*, 1994).

Los GABA_ARs también son sensibles a algunos iones, específicamente cationes como el Zn^{2+} . Este metal de transición se encuentra en el sistema nervioso concentrado en determinadas neuronas y se piensa que está involucrado en la modulación de la sensibilidad de los receptores a GABA y a glutamato de sus respectivos ligandos (Frederickson & Bush, 2001). Los iones de zinc inhiben a los receptores GABA de tipo A, a través de un mecanismo alostérico que es dependiente de la composición estequiométrica del receptor. Cuando está presente la subunidad γ la sensibilidad a este catión es menor que cuando solo están

presentes subunidades $\alpha\beta$. Además, se sabe que esta inhibición es mediada por la unión a tres sitios diferentes en el receptor, uno ubicado dentro del canal iónico del receptor y los otros dos están en la cara externa del receptor en la interfase de las subunidades α y β . De modo particular, la nula o baja sensibilidad a Zn^{2+} que presentan los receptores en cuya estructura presentan la subunidad $\gamma 2$ se debe a que esta subunidad elimina dos de los tres sitios de unión de zinc, después que se ensambla el receptor (Hosie *et al.*, 2003).

2.7 Estructura y Función de los Receptores GABA_A

La particular composición de subunidades de cada receptor a GABA determina sus propiedades funcionales y farmacológicas, por ejemplo, define el efecto que tienen sobre él, moduladores alostéricos tales como las BZDs, los barbitúricos, los esteroides, y los cationes polivalentes, así como algunas sustancias pro-convulsivas y el etanol.

A través de estudios en los que se emplean técnicas como la co-localización, tanto en el cerebro (Pirker *et al.*, 2000) como en células (Klausberger *et al.*, 2002), los resultados de experimentos de co-inmunoprecipitación (Pörtl *et al.*, 2003) y otras evidencias farmacológicas se sabe que la combinación de subunidades que presenta el principal receptor de GABA neuronal es la: $\alpha 1\beta 2\gamma 2$. En el caso de los astrocitos, Whiting y colaboradores (2000) encontraron evidencias que apuntan a que en ellos el GABA_AR tiene la combinación de subunidades, $\alpha 2\beta 1\gamma 1$, y estos son potenciados por la β -carbolina llamada ácido carboxílico metil ester 4-etil-6,7-dimetoxi-9H-pirido[3,4- b]indol-3 (DMCM).

Existen al menos cuatro trabajos previos sobre las características del GABA_AR en diferentes preparaciones de OPCs. En el primero, von Blankenfeld y colaboradores (1991) señalan algunas de las diferencias entre estos receptores y los observados en neuronas y astrocitos, principalmente por el efecto de la β -carbolina DMCM un agonista inverso y que en astrocitos potencia la respuesta, mientras que en OLs la inhibe. La diferencia con el GABA_AR neuronal radica en las

propiedades de unión del GABA, al ser su pendiente de Hill menos pronunciada. En este estudio se establece que los receptores presentan sensibilidad a BZD potenciando su respuesta lo que sugirió la presencia de la subunidad $\gamma 2$.

En un segundo estudio, Williamson y colaboradores (1998) encontraron que en las OPCs los receptores son insensibles a BZDs y a DMCM, y que el EC_{50} para GABA es de 100 μM . Además, en un análisis de la expresión de secuencias por RT-PCR se mostró la amplificación de los mensajeros que codifican para las subunidades α (2, 3, 4 y 5), γ (2 y 3) pero no de $\alpha 1$, $\alpha 6$ y δ .

Un tercer estudio fue el realizado por Bronstein y colaboradores (1998) en células CIMO que son una línea celular inmortalizada del linaje oligodendroglial. Estas expresan $GABA_A R$ insensibles a diazepam, son bloqueados por Zn^{2+} y provocan un aumento del Ca^{2+} intracelular al ser activados. La determinación de las subunidades GABA expresadas por PCR muestra la amplificación de $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\beta 1$ y δ . Las subunidades α (1, 3, 5 y 6) así como las γ (1-3) no fueron detectadas.

Por último, un trabajo electrofisiológico realizado recientemente por Arellano y colaboradores (2016) en cultivos primarios de OLs, obtenidos de dos fuentes, OLs del nervio óptico y OPCs del prosencéfalo de ratas diferenciados hacia OLs en cultivo, demuestran la participación de $\beta 2$ ó $\beta 3$ pero no de las subunidades $\gamma 2$ y δ , puesto que las drogas THIP (agonista sobre receptores que contienen la subunidad δ) e indiplon (agonista del sitio de benzodiazepinas) no tuvieron los efectos esperados, mientras que el Zn^{2+} constituyó un potente inhibidor, indicando claramente la ausencia de la subunidad $\gamma 2$.

Sin embargo, la expresión de subunidades γ fue evidenciado por el hecho de que diazepam, una BZD clásica, provocó potenciación del receptor, por lo que la participación de subunidades $\gamma 1$ ó $\gamma 3$ son necesarias, esto también está reforzado por la observación de que las β -carbolinas ejercen efectos moduladores sobre el receptor oligodendroglial.

Finalmente, debido a que se confirmó la baja afinidad del sitio a GABA, se sugiere que la subunidad $\alpha 3$ podría estar involucrada en su conformación (Gingrich *et al.*, 1995; Karim *et al.*, 2013; Hartiadi *et al.*, 2016). Esta distribución de subunidades también se ve apoyada por diversos estudios que muestran la

expresión de las mismas en el linaje oligodendroglial, con una abundancia relativamente alta de las subunidades α (1 y 3), β (2 y 3) y γ (1 y 3) (Cahoy *et al.*, 2008). Apoyados en esta evidencia, en este estudio hemos analizado las características funcionales y electrofisiológicas de receptores GABA_A conteniendo las subunidades propuestas, y hemos comparado el patrón obtenido con aquel que exhiben los receptores endógenos en los OLs; con la finalidad de apoyar, o no, la idea de que el receptor oligodendroglial está conformado por una combinación de las subunidades mencionadas.

3. Hipótesis

Una combinación de las subunidades $\alpha 3$ - $\beta 2/\beta 3$ - $\gamma 1/\gamma 3$ reproduce las características funcionales y farmacológicas que caracterizan a los receptores endógenos tipo GABA_A expresados en los oligodendrocitos del nervio óptico de rata.

4. Objetivo General

La caracterización funcional y farmacológica de los GABA_AR expresados heterológamente como combinaciones de las subunidades $\alpha 3$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 1$ y $\gamma 3$ clonadas a partir del mRNA de oligodendrocitos del nervio óptico de rata.

5. Objetivos Específicos

I. Expresar de manera heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis* los genes clonados que codifican para subunidades del receptor GABA_A en oligodendrocitos del nervio óptico en las siguientes combinaciones: $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 2\gamma 1$, $\alpha 3\beta 2\gamma 3$, $\alpha 3\beta 3$, $\alpha 3\beta 3\gamma 1$ y $\alpha 3\beta 3\gamma 3$.

II. Analizar el efecto de GABA y moduladores alostéricos en cada receptor clonado, y comparar el patrón funcional y farmacológico, con el observado en el receptor GABA_A de oligodendrocitos del nervio óptico de rata.

III. Analizar la posible acción de la β -CCB sobre el sitio clásico de unión a benzodiazepinas.

6. Materiales y Métodos

Todos los procedimientos y el manejo de los animales se llevaron a cabo de acuerdo al Manual de Usuarios del Bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, campus Juriquilla, emitido por el Comité de Bioética de dicha institución; el cual está basado en la “Normal Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”, y en la “Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio”.

En este trabajo utilizamos ovocitos de la rana africana *Xenopus laevis*. Este es un anuro acuático de la familia Pipidae, que habita en los humedales, estanques y lagos de África Subsahariana. Cabe resaltar, que esta especie fue introducida en América y Europa y se considera en algunos países, una amenaza para la fauna local debido a sus hábitos alimenticios y su alta adaptabilidad.

Ha sido empleada con múltiples propósitos en todo el mundo, desde alimento hasta su uso como bioindicadores de embarazo en humanos. A finales de los años 50 del siglo pasado, se propuso el uso de los ovocitos de este animal para manipulación experimental. Desde los años 80's, han sido empleadas con éxito como sistema de expresión heteróloga. De este modo, se llevó a cabo el estudio de la funcionalidad de proteínas exógenas expresadas en su membrana plasmática (Kusano *et al.*, 1982; Miledi, 1982; Miledi & Woodward, 1989; Matute *et al.*, 1992).

Entre las ventajas del uso de los ovocitos de *X. laevis* encontramos que son células de gran tamaño (>1mm) lo que permite su fácil manipulación, además, de un mismo individuo se pueden obtener miles de células. Su gran tamaño permite microinyectar ácidos nucleicos u otras biomoléculas y realizar registros electrofisiológicos, sin que sufran daño. Presentan una gran actividad transcripcional y de síntesis de proteínas. Para su mantenimiento en condiciones *in vitro* no se requieren condiciones estrictas de esterilidad, como tampoco de medios de cultivo con características especiales, lo que facilita mucho el trabajo con esta preparación biológica.

Se han reportado, algunas desventajas en su uso, entre ellas encontramos que existe una variación estacional en la calidad de los ovocitos (Delpire *et al.*, 2011). Otra desventaja, es que el ovocito y las células foliculares (que se encuentran acopladas al gameto), expresan de forma endógena, transportadores, canales iónicos y receptores que pudiera generar distorsiones en el análisis de las proteínas expresadas heterológamente (Arellano *et al.*, 1995; Weber, 1999). Se debe tener en cuenta por lo tanto que las moléculas a ser expresadas no se expresen de forma endógena.

No obstante, el empleo de este modelo animal en los estudios de biología básica ha permitido comprender mejor, aspectos de biología celular, fisiología, bioquímica celular, además de investigar los mecanismos moleculares de varias enfermedades incluyendo el cáncer (Goldin, 2006).

6.1 Obtención de folículos

Ranas hembra de la especie *Xenopus laevis* fueron obtenidas de Xenopus I (Ann Arbor, Michigan, USA) y de Aquanimals (Querétaro, México). Para la cirugía en la que se les extraen entre 3 a 4 lóbulos ováricos, las ranas fueron previamente inmovilizadas por hipotermia.

A continuación, se describe cómo se realiza este procedimiento. Se realizó una incisión abdominal de 0.5 cm, tanto en la dermis como en el músculo (Figura 6) para obtener acceso a la cavidad abdominal y el ovario, una vez extraídos de 3 a 4 lóbulos del ovario, estos fueron colocados en una caja de Petri con solución de Barth normal (conteniendo en mM: 88 NaCl, 1 KCl, 2.4 NaHCO₃, 0.33 Ca(NO₃)₂, 0.41 CaCl₂, 0.82 MgSO₄, 5 HEPES y 0.07 mg/mL de gentamicina, suplementada con 0.2 % de suero fetal bovino (SBF), y ajustada a pH 7.4 con NaOH), por último la rana fue suturada y colocada en un estanque donde su recuperación fue supervisada por dos semanas.

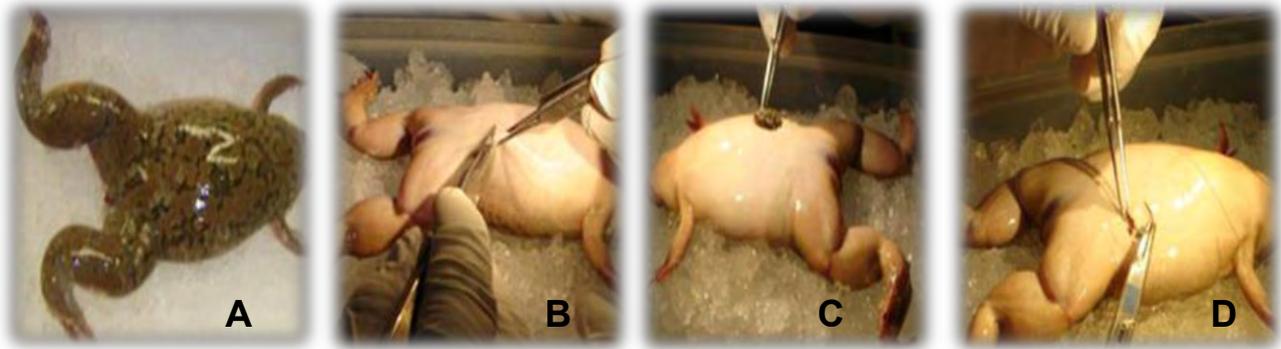


Figura 6. Cirugía de *Xenopus laevis*.

(A) Rana hembra de *Xenopus laevis* (B) Incisión abdominal (C) Extracción de lóbulos ováricos (D) Sutura.

Posteriormente, con la ayuda de un microscopio estereoscópico y de unas pinzas finas, fueron disecados folículos de los lóbulos ováricos en el estado VI de desarrollo según la clasificación de Dumont (1972) (Figura 7). Una vez separados, los folículos fueron colocados en una placa Petri con solución de Barth, a una temperatura de 16-18 °C.

6.2 Microinyección de folículos con cRNA de subunidades GABA_A

Los folículos fueron extraídos e incubados 24 horas, posteriormente se microinyectaron con cRNA de subunidades GABA_A. Previamente en nuestro laboratorio, las secuencias codificantes de dichas subunidades fueron amplificadas por RT-PCR, a partir de RNA total de un cultivo primario de oligodendrocitos del nervio óptico de ratas Sprague-Dawley 12 días postnatal y clonadas en un vector que tiene el promotor T7 RNA polimerasa. Posteriormente, estos plásmidos fueron linealizados con una enzima de restricción apropiada y usados como molde para sintetizar cRNA *in vitro*.

Cada folículo se le inyectó un volumen aproximado de 50 nl (50 pg) de cRNA de la combinación de subunidades de este receptor-canal, que se deseaba estudiar. Todos los mensajeros de la combinación a microinyectar estaban en la misma

proporción (1:1:1).

Para este proceso se mantuvo a los ácidos nucleicos a baja temperatura para evitar su degradación, y una pipeta (WPI, FI, USA) de microinyección fue cargada con 1 μ l del cRNA y colocada en un microinyector (G8, Drummond Scientific Company, PA, USA) posicionado con la ayuda de un micromanipulador bajo un microscopio estereoscópico.

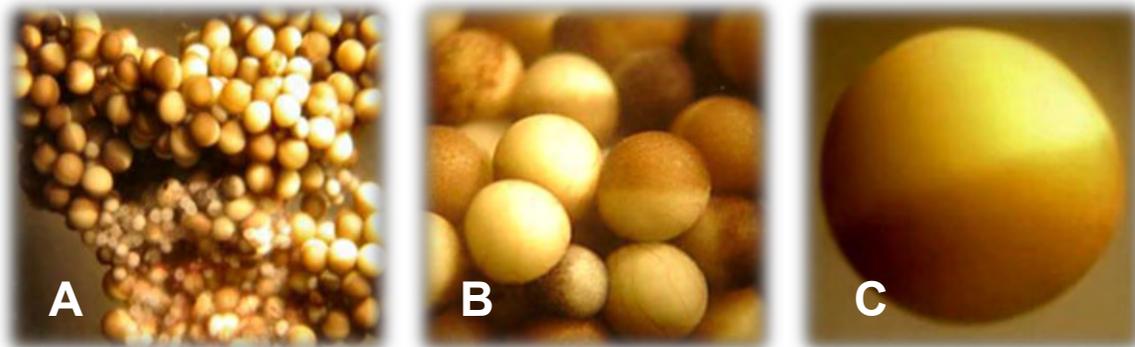


Figura 7. Aislamiento de folículos de *Xenopus laevis*.

(A) Lóbulo ovárico (B) Folículos unidos al epitelio ovárico (C) Folículo aislado.

6.3 Defoliculación de los ovocitos inyectados

Los folículos microinyectados, fueron mantenidos en una placa Petri con solución de Barth normal a una temperatura de 18 °C. Después de 24 horas de inyectados los ovocitos fueron defoliculados. Para esto, los ovocitos fueron tratados enzimáticamente, con 0.5 mg/ml de colagenasa (C0130-1G) por 45 min a temperatura ambiente (Arellano & Miledi, 1993; Matute *et al.*, 1992). Después con ayuda de pinzas finas y un microscopio estereoscópico, fueron removidas las capas celulares que envuelven al folículo conservando la capa vitelina. Los ovocitos desnudos fueron mantenidos en solución de Barth a una temperatura de 18 °C.

6.4 Técnica de control de voltaje

Las respuestas eléctricas de los ovocitos fueron registradas utilizando la técnica de control de voltaje con dos electrodos (Miledi, 1982; Arellano & Miledi, 1993) (Figura 8). La técnica de control de voltaje (*voltaje-clamp*) fue ideada por Kenneth Stewart Cole y George Marmont en el año 1947. Esta es una técnica ampliamente utilizada para el estudio de las corrientes transmembranales que fluyen a través de canales iónicos. Con esta técnica se controla a un valor predeterminado el potencial de membrana de la célula bajo estudio, de tal forma que se pueda medir la corriente transmembranal que fluye a ese potencial. Con el voltaje transmembranal de la célula bajo control, la corriente que fluye a través de la membrana es proporcional a su conductancia y esta se encuentra determinada por la apertura y cierre de los canales iónicos (Hille, 2001).

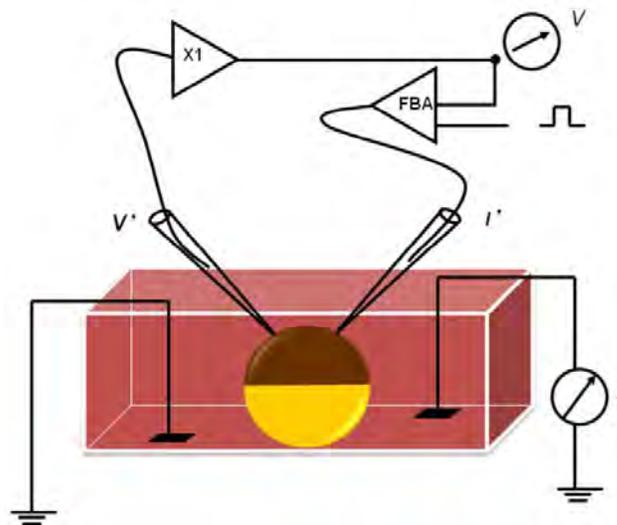


Figura 8. Esquema de la técnica de control de voltaje con dos electrodos.

(V') electrodo de voltaje, ($X1$) amplificador, (V) voltaje de mantenimiento, (FBA) amplificador de retroalimentación negativa, (I') electrodo intracelular de corriente, (I) amperímetro que se encuentra en el baño y censa la corriente transmembranal (modificada de Hille, 2001).

El sistema es un circuito cerrado (Figura 8) constituido por dos microelectrodos intracelulares, uno de los cuales registra el voltaje (V') y otro inyecta corriente (I') a la célula. Debido a que el orden de magnitud de los voltajes registrados es muy pequeño, el electrodo de voltaje se conecta a un amplificador.

La señal se compara con un voltaje comando o de mantenimiento (**V**) que es el valor de voltaje al que se desea controlar la membrana, la diferencia entre ellos es compensada por una inyección de corriente, a través del electrodo (**I'**) cuya magnitud es determinada a través de un circuito de retroalimentación negativo (**FBA**). En el baño se encuentra un tercer electrodo que mide, a través de un amperímetro, la corriente (**I**) que cruza la membrana de la célula.

Los electrodos intracelulares **V'** e **I'** utilizados fueron elaborados con capilares de vidrio de borosilicato con un diámetro interno y externo de 1.2 y 2 mm respectivamente (WPI, FI, EUA). Los electrodos fueron llenados con solución 3 M KCl y tuvieron una resistencia de 1-2 M Ω .

El amplificador de control de voltaje empleado fue el GeneClamp 500B (Axon Inst., CA, EUA). La señal de corriente transmembranal fue registrada utilizando un osciloscopio marca Gould (D50-602), también la señal fue almacenada digitalmente utilizando el convertidor A/D Digidata 1200A y el programa pClamp 9 (Axon Inst., EUA). Un generador de pulsos GRASS (Astro-Med Inc, EUA) fue utilizado para cambiar periódicamente el voltaje de mantenimiento con pulsos breves (1 a 2 s).

El registro electrofisiológico de los ovocitos se realizó dentro de un periodo de 48 hasta 72 h después de su microinyección. Las respuestas electrofisiológicas, fueron monitoreadas, bajo un protocolo de registro que consistió en el control de voltaje de los ovocitos a un potencial de -60 mV, para los estudios de activación de las corrientes provocadas por GABA. Los folículos bajo registro fueron mantenidos en una cámara, donde se perfundieron continuamente (10 ml/min) con una solución de Ringer normal (RN) que contenía en mM: 115 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 5 HEPES, ajustada a pH 7.4 con NaOH, a una temperatura ambiente entre 22-25°C. Las drogas fueron disueltas en RN, a partir de alícuotas concentradas de cada uno de los fármacos, y aplicadas a través de la perfusión.

Después de un registro de las condiciones eléctricas basales se procedió a perfundir la preparación por 40 s con GABA o algunas de las drogas estudiadas, ya sea en aplicaciones simples de las drogas o en diferentes combinaciones. La mayoría de las drogas utilizadas en este estudio fueron adquiridas de Tocris Biosciences (Bristol, UK) y tanto el GABA como las sales fueron de Sigma-Aldrich

(San Luis, Misuri, USA).

6.5 Análisis Estadístico

Para cada grupo experimental se determinó su media y su dispersión en términos del error estándar de la media. Para verificar las diferencias entre las muestras analizadas ($p < 0.05$), si estas cumplieron con los supuestos paramétricos: normalidad de los datos (se verificó con la prueba de normalidad Shapiro-Wilk), homogeneidad de varianza e independencia de errores de los datos, se realizó una prueba de t-Student, si eran solo dos grupos independientes, mientras que si eran muestras pareadas se realizó una prueba de t-Student para este tipo de datos. En el caso en que se compararon varios grupos se realizó un análisis de varianza completamente aleatorizado (one-way ANOVA).

En el caso de que las muestras no cumplieran con los supuestos paramétricos se procedió a realizar la prueba de U de Mann Whitney para comparar dos muestras (si las muestras eran pareadas se realizó una prueba de signos de Wilcoxon) o una prueba de Kruskal-Wallis si eran más de dos muestras. En cada caso, que existieran diferencias estadísticamente significativas, se realizó una prueba *post hoc* de Tukey para determinar entre qué grupos existían las diferencias encontradas.

Para realizar estas pruebas estadísticas se emplearon los programas R (versión 3.2.3), RStudio (Free Software Foundation, Inc. 51 Franklin St, Fifth Floor, Boston, MA 02110-1301, USA) y GraphPad Prism (version 6.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla, California, USA).

7. Resultados

7.1 Respuesta a GABA de combinaciones del receptor GABA_A, expresadas en ovocitos de *Xenopus laevis*

La composición en subunidades que tiene cada receptor a GABA, como hemos mencionado, determina sus características funcionales. Después de los hallazgos mostrados por Arellano y colaboradores (2016), se conocen algunas características farmacológicas del receptor expresado en los oligodendrocitos aislados del nervio óptico de rata. De este perfil se sugirió la composición de subunidades exploradas funcionalmente en el presente trabajo en el modelo de ovocitos de *Xenopus*.

Primero, estudiamos las relaciones dosis-respuesta para GABA de las seis combinaciones conformadas por las siguientes subunidades: $\alpha 3$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\gamma 1$, y $\gamma 3$. En cada caso analizado (entre 10 y 14 ovocitos por combinación) se midió la respuesta a diferentes concentraciones de GABA (0.1, 1, 10, 30, 100 ó 1000 μM).

Antes de comenzar las aplicaciones de las diferentes concentraciones de la droga, se verificó que los ovocitos tuvieran respuesta a 100 μM de GABA, los que no presentaron expresión fueron desechados. Cada aplicación del agonista tuvo una duración de 40 s y se comenzó por la de menor concentración de GABA. Entre una aplicación y la siguiente los ovocitos fueron lavados (100 s) con solución RN.

Como se muestra en los trazos ilustrados en la Figura 9A, entre las seis combinaciones hubo diferencias notables tanto en la amplitud de la respuesta como en la cinética de las mismas a cada concentración de GABA. Así, encontramos que la combinación $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ en las diferentes concentraciones es la que genera mayor amplitud de corriente comparada con las demás. Además, las combinaciones que presentan la subunidad $\gamma 3$, tuvieron menor amplitud como respuesta a la máxima concentración de GABA, comparadas con las generadas por receptores conteniendo la subunidad $\gamma 1$. Por su parte, entre las que no presentan subunidad γ , existen también diferencias en la amplitud de la respuesta a las diferentes

concentraciones de GABA. De esta manera, la combinación $\alpha 3\beta 2$ exhibe una amplitud mayor en su respuesta, que la combinación $\alpha 3\beta 3$. Desde el punto de vista cinético, se muestra que todas las combinaciones presentan desensibilización de la respuesta a concentraciones mayores de 30 μM de GABA. Sin embargo, a 10 μM de GABA, solo pareció haber desensibilización de la respuesta en las combinaciones que no presentan subunidad γ . Además, los receptores que presentan la subunidad $\beta 2$ muestran mayor amplitud de la respuesta, a las diferentes dosis de GABA, que sus homólogas con $\beta 3$.

Para cada uno de los receptores, las respuestas fueron normalizadas con respecto a la respuesta máxima (I_{max}), obtenida a 1000 μM de GABA, mediante la fórmula: $I \% = (I/I_{max}) \times 100$ donde I es el valor de corriente del pico de la respuesta en las diferentes concentraciones de GABA. Después de la normalización de la respuesta en cada concentración de GABA, se procedió a la construcción de la curva dosis-respuesta de cada combinación (Figura 9B), dichas curvas fueron ajustadas por el método de mínimos cuadrados ordinarios, a la siguiente ecuación logística:

$$y = I_{mín} + \frac{(I_{máx} - I_{mín})}{1 + 10^{(\log EC_{50} - x)}}$$

Donde $I_{mín}$ es la mínima amplitud de corriente relativa obtenida para cada experimento; $I_{máx}$ es la máxima amplitud de corriente relativa obtenida para cada experimento; x son los valores logarítmicos de la concentración dada de GABA; EC_{50} es la concentración que se requiere de GABA para obtener el 50 % de la respuesta de activación y y es la respuesta normalizada que se obtiene para cada concentración de GABA.

Estas combinaciones pueden ser separadas en dos grupos en función a su sensibilidad a GABA, estimada a través del valor de EC_{50} . En el primer grupo se encuentran cuatro combinaciones: $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 3$, $\alpha 3\beta 2\gamma 3$ y $\alpha 3\beta 3\gamma 3$ que tienen valores de EC_{50} muy cercanas entre si e inferiores a 25 μM . Mientras que, en el segundo grupo están las combinaciones que contienen a la subunidad $\gamma 1$: $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ y $\alpha 3\beta 3\gamma 1$, que muestran valores de EC_{50} de $53 \pm 3 \mu\text{M}$ y $66 \pm 1.2 \mu\text{M}$, respectivamente. Este

resultado indica que las combinaciones antes mencionadas, son las de menor afinidad a GABA y que en esta característica es importante la expresión de la subunidad $\gamma 1$.

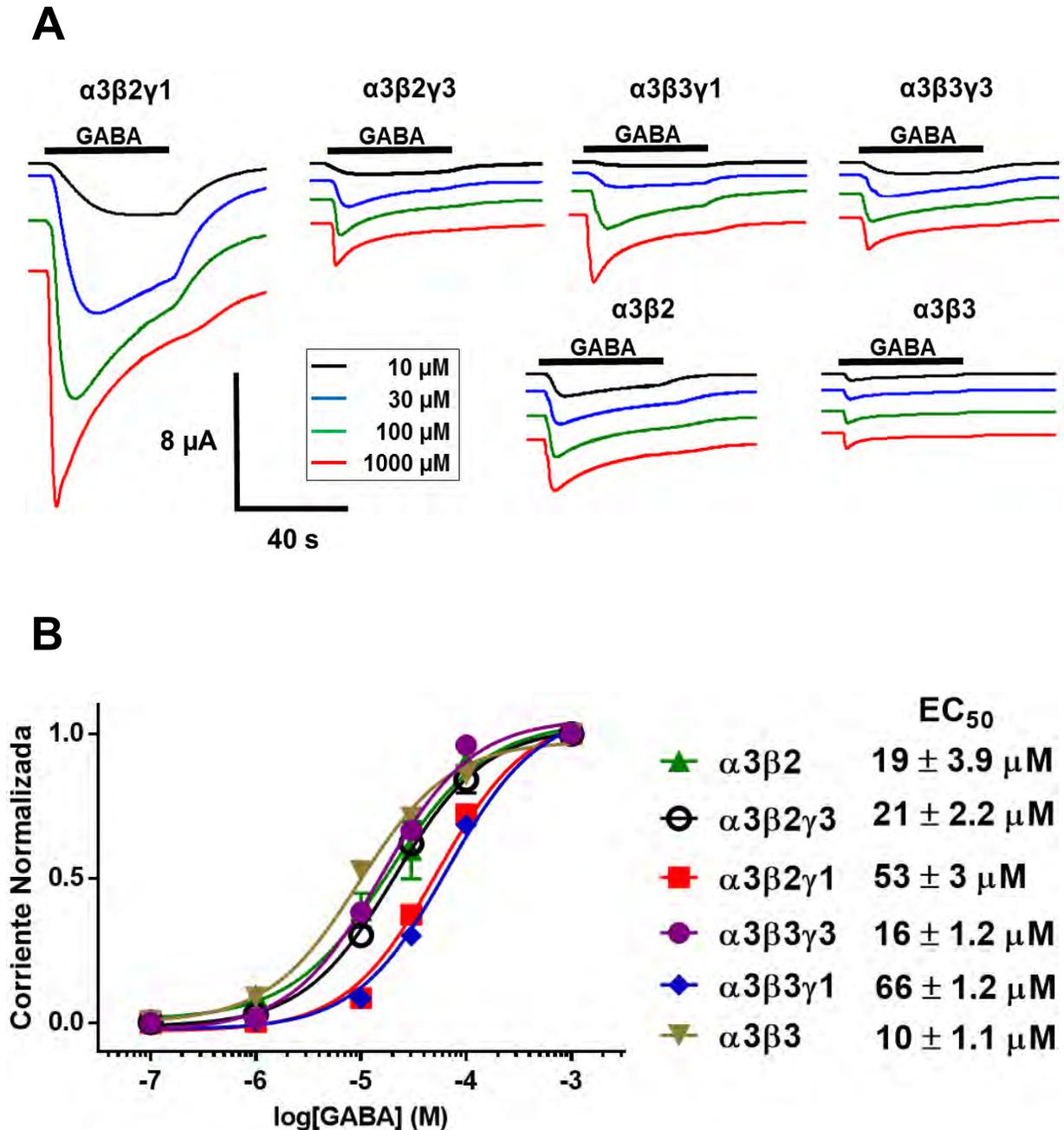


Figura 9. Curvas dosis-respuesta a GABA de seis combinaciones del receptor $GABA_A$ expresados de forma heteróloga en ovocitos de en de *Xenopus laevis*.

(A) Trazos de las respuestas a diferentes concentraciones de GABA (10 μM (negro), 30 μM (azul), 100 μM (verde) y 1000 μM (rojo)), de seis combinaciones de

subunidades del receptor GABA_A, expresadas de forma heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis*. La barra de color negro, encima de cada registro indica el momento y la duración de la aplicación de GABA. (B) Curva dosis-respuesta a GABA de las seis combinaciones. Los puntos representan el promedio de la corriente normalizada para esa concentración de GABA y las barras representan el error estándar de la media. Se indica el valor de EC₅₀ (calculada para cada receptor) ± SEM (error estándar de la media) calculado para cada combinación.

7.2 Sensibilidad a Zn²⁺ de combinaciones del receptor GABA_A expresadas en ovocitos de *Xenopus laevis*

El Zn²⁺ es un catión de gran importancia en la fisiología del SNC, entre sus funciones está, el modular la sensibilidad de los receptores de glutamato y de GABA, a sus respectivos agonistas (Hosie *et al.*, 2003). Además, se sabe que el receptor oligodendroglial a GABA de tipo A es sensible a Zn²⁺, de tal forma que en una concentración de 10 μM, inhibe más del 50 % de la respuesta a 30 μM GABA en estas células (Arellano *et al.*, 2016).

Dado que la sensibilidad a este catión está determinada por las subunidades que componen el receptor, a continuación, aquí estudiamos la sensibilidad a Zn²⁺ de las seis combinaciones analizadas en el experimento anterior. En cada caso analizado (entre 8 y 10 ovocitos por combinación), primero fue monitoreada la corriente provocada por la aplicación de 100 μM de GABA. Esta se tomó como amplitud control. Los que no tenían respuesta a esta concentración de GABA fueron desechados. Después, los ovocitos fueron lavados por 80-100 s con solución externa de Ringer, una segunda aplicación incluyó una breve preincubación de las células perfundiendo 100 μM Zn²⁺ por 5 s, e inmediatamente fue perfundida la combinación de Zn²⁺ coaplicado con GABA en las mismas concentraciones durante 40 s (Figura 10A).

En todas las combinaciones el zinc tiene un efecto inhibitorio sobre la respuesta de estas células a 100 μM de GABA (Figura 10A). Sin embargo, la magnitud de este efecto es diferente entre las combinaciones. Como se observa en la cuantificación del efecto de este ion, en estas condiciones experimentales (Figura

10B), pueden ser distinguidos con claridad tres grupos de receptores, que presentaron diferentes sensibilidades a Zn^{2+} : en el primero, se agrupan las combinaciones que no presentan subunidad γ , y son las que más sensibilidad mostraron a este ion. Sobre la respuesta a GABA de las combinaciones $\alpha 3\beta 2$ y $\alpha 3\beta 3$, el zinc tiene un efecto inhibitorio de $84.2 \pm 7 \%$ y $67 \pm 2 \%$, respectivamente.

En el caso del segundo grupo, que está conformado por las combinaciones que presentan en su estructura a la subunidad $\gamma 3$, la sensibilidad a Zn^{2+} es relativamente baja. Al cuantificar el efecto inhibitorio de este metal en la respuesta a GABA de los ovocitos que expresaban las combinaciones $\alpha 3\beta 2\gamma 3$ y $\alpha 3\beta 3\gamma 3$, encontramos alcanza el $31.5 \pm 7 \%$ y el $19.2 \pm 4 \%$ del total de la respuesta, respectivamente.

Por último, se puede identificar un grupo con sensibilidad a Zn^{2+} intermedia, entre los dos grupos anteriores. En este, encontramos a las combinaciones que presentan a la subunidad $\gamma 1$. Sobre la respuesta a GABA de los receptores $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ y $\alpha 3\beta 3\gamma 1$, el zinc tiene un efecto inhibitorio que alcanza valores de $47.6 \pm 3 \%$ y $39.8 \pm 1 \%$, respectivamente.

Hay que resaltar que, el efecto inhibitorio que tiene ese catión en la respuesta a GABA de las combinaciones, presenta diferencia estadísticamente significativa dentro de los diferentes grupos (Figura 10B). Así, la combinación $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ exhibe mayor sensibilidad a Zn^{2+} que la combinación $\alpha 3\beta 3\gamma 1$. Además, en los tres grupos, las combinaciones que en su estructura presentan a la subunidad $\beta 2$ tienen mayores valores de inhibición de su respuesta a GABA por zinc, comparada con los que contienen la subunidad $\beta 3$.

La combinación $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ presentó el patrón inhibitorio por Zn^{2+} de mayor semejanza al presentado por el GABA_AR oligodendroglial, por lo que a continuación, fueron construidas las relaciones dosis-respuesta para la inhibición por Zn^{2+} de las combinaciones $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ y $\alpha 3\beta 3\gamma 1$ aplicando diferentes concentraciones de Zn^{2+} en μM (0.1, 1, 10, 30, 100 y 1000) y activando el receptor de GABA correspondiente con una concentración de 10 μM .

Antes de comenzar las aplicaciones, se verificó que los ovocitos tuvieran respuesta a 100 μM de GABA en nuestro rango alto de expresión superior a 1 μA de corriente. Fue entonces medida la respuesta aplicando 10 μM de GABA, esta constituyó la respuesta control. Después, los ovocitos fueron lavados de 80-100 s con solución Ringer, una segunda aplicación consistió de una breve preincubación (5 s) de las células perfundiendo la menor concentración de Zn^{2+} que se empleó en este experimento, e inmediatamente fue perfundida la combinación de Zn^{2+} (a la misma concentración que la preincubación) coaplicado con 10 μM GABA durante 40 s. Este protocolo se repitió de forma sucesiva para las restantes cinco concentraciones de zinc, que se utilizaron en este experimento (Figura 11A).

Entre los receptores analizados se apreciaron diferencias, no solo en la amplitud de la respuesta a esta concentración de GABA; confirmando lo descrito en el primer experimento (ver Figura 9), sino también en la sensibilidad a zinc (Figura 11B).

En cada una, las respuestas fueron normalizadas con respecto a la respuesta máxima a GABA (I_{max}), obtenida en ausencia de Zn^{2+} , mediante la siguiente fórmula:

$$I_{\%} = \frac{I}{I_{m\acute{a}x}} 100$$

donde I es el valor del pico de corriente en las diferentes co-aplicaciones de 10 μM GABA en las diferentes concentraciones de zinc. Después de obtener la respuesta normalizada, se procedió a la construcción de la curva dosis-respuesta de cada combinación (Figura 11B), dichas curvas fueron ajustadas a una ecuación logística:

$$y = I_{m\acute{i}n} + \frac{(I_{m\acute{a}x} - I_{m\acute{i}n})}{1 + 10^{(\log IC_{50} - x)HS}}$$

Donde I_{min} es la mínima amplitud de corriente relativa obtenida; I_{max} es la máxima amplitud de corriente relativa obtenida; x son los valores logarítmicos de la concentración dada de Zn^{2+} ; HS es el coeficiente de la pendiente de Hill; IC_{50} es la

concentración que se requiere, de esta sustancia, para inhibir el 50 % de la respuesta de activación y es la respuesta que se obtiene dependiendo de la concentración de Zn^{2+} .

Para las combinaciones $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ y $\alpha 3\beta 3\gamma 1$, los valores de IC_{50} de Zn^{2+} fueron de $26 \pm 1 \mu M$ y $80 \pm 1 \mu M$, respectivamente. Por lo que la combinación con la subunidad $\beta 2$ es más sensible a este catión que su homóloga con $\beta 3$ (Figura 11).

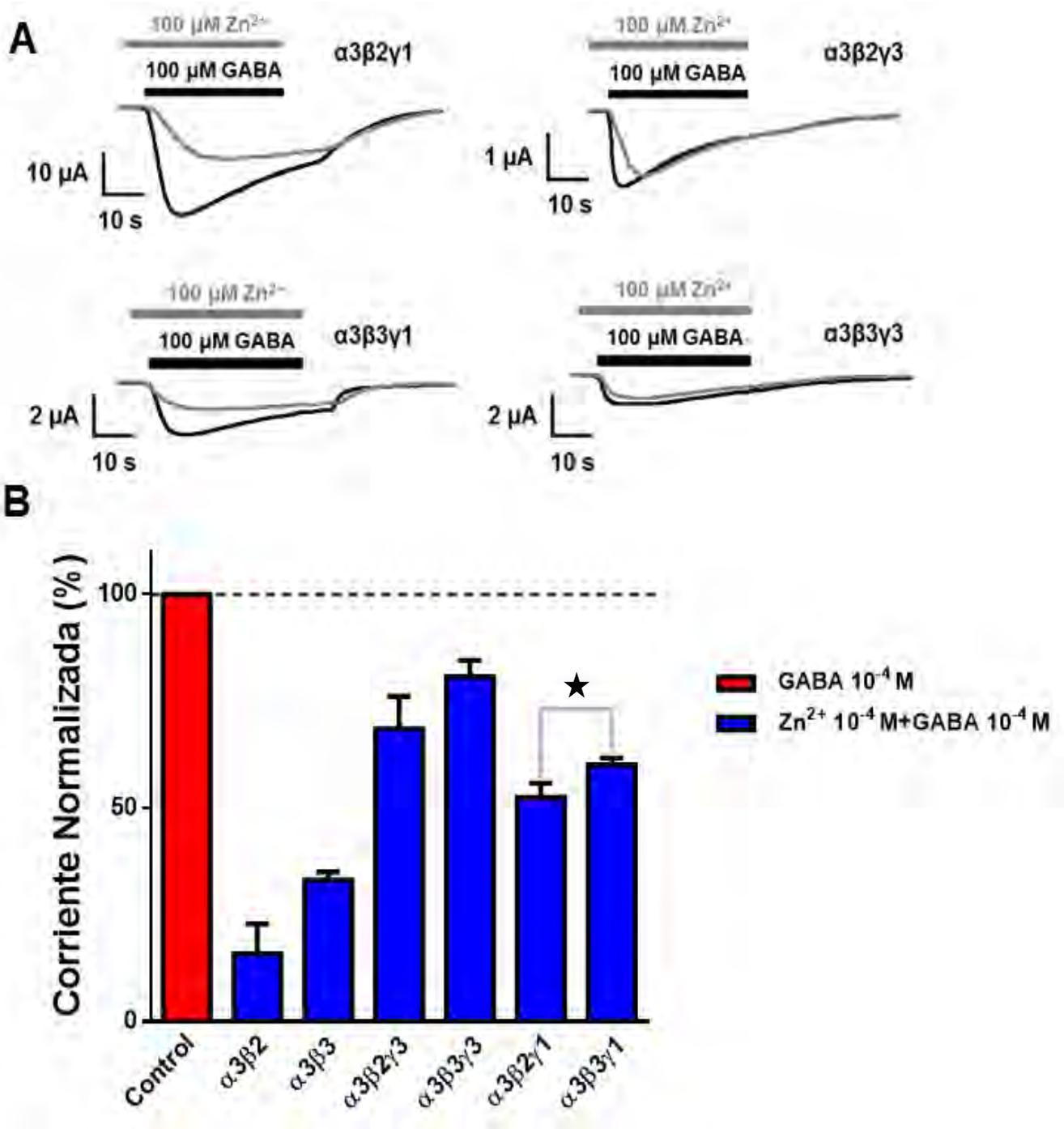


Figura 10. Sensibilidad a Zn^{2+} de seis combinaciones del receptor $GABA_A$ expresados de forma heteróloga en ovocitos de en de *Xenopus laevis*.

(A) Trazos de las respuestas a 100 μM GABA (negro) de cuatro combinaciones de subunidades del receptor $GABA_A$, además se muestra la respuesta a la coaplicación de 100 μM GABA con 100 μM Zn^{2+} (gris). La barra de color negro, encima de cada registro indica el momento y la duración de la aplicación de GABA y la de color gris indica la misma información, pero referida a Zn^{2+} . (B) Efecto de Zn^{2+} sobre la respuesta a 100 μM GABA de las seis combinaciones estudiadas. Todos los efectos fueron normalizados contra la respuesta medida a 100 μM GABA. La prueba t de Student muestra que los efectos comparados, son estadísticamente diferentes, la estrella de color negro indica: $t_{(9)} = 2.29$; $p < 0.05$). Las barras representan el error estándar de la media.

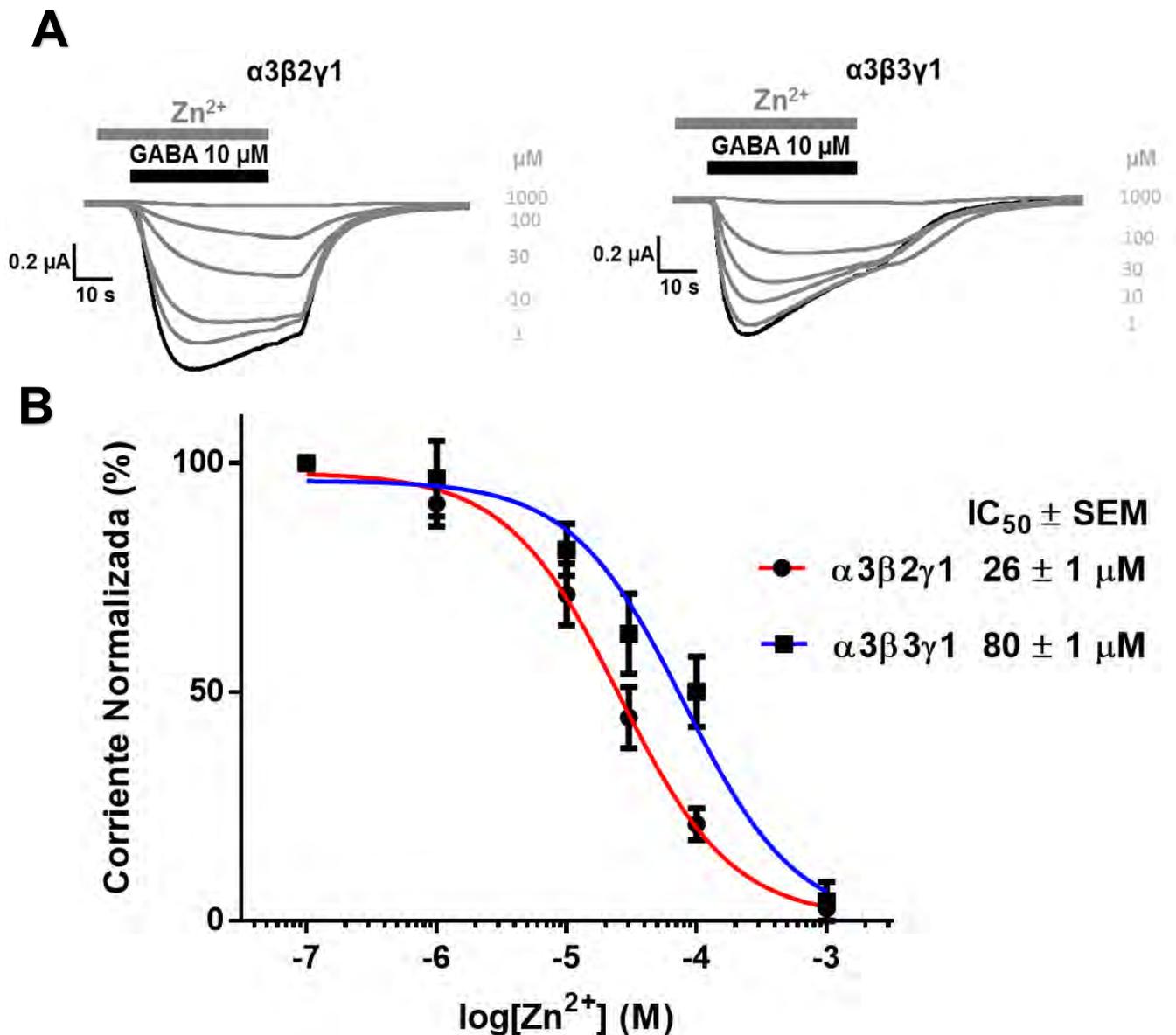


Figura 11. Curvas dosis-respuesta a Zn^{2+} de combinaciones de subunidades de $GABA_A$ R expresada en folículos de *Xenopus laevis*.

(A) Comparación entre registros representativos obtenidos con la técnica de control de voltaje con dos electrodos. Estos fueron realizados en combinaciones de subunidades del receptor $GABA_A$ que fueron expresadas de forma heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis*. Las barras superiores en cada trazo indican la duración de la aplicación de las drogas estudiadas. (B) La curva de inhibición de la respuesta a GABA provocada por Zn^{2+} se realizó mediante la aplicación simultánea de diferentes concentraciones de Zn^{2+} con 10 μ M of GABA, y la corriente medida en cada caso fue normalizada a la obtenida en presencia de Zn^{2+} a una concentración de 0.1 μ M (cinco ovocitos para cada combinación). Los puntos representan el promedio de la corriente normalizada para cada concentración de Zn^{2+} y las barras representan el error estándar de la media.

Los resultados muestran que la combinación de subunidades $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ cumplió de manera más cercana con las características farmacológicas del receptor oligodendroglial. Por ejemplo, esta combinación además de ser una de las dos que mostraron baja afinidad a GABA, con una $EC_{50} = 53 \pm 3 \mu$ M, presentó también una sensibilidad a Zn^{2+} con características cercanas a las que tiene el receptor endógeno (ver discusión). Por esta razón, a continuación, analizamos con mayor detalle este receptor estudiando cómo es afectado la respuesta a GABA, en la presencia de diferentes moduladores alostéricos.

7.3 Patrón funcional y farmacológico de la combinación de subunidades $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ del receptor $GABA_A$ expresadas en ovocitos de *Xenopus laevis*

Existen varios moduladores alostéricos que actúan sobre los receptores $GABA_A$, y en función de la composición en subunidades que tenga el receptor, el efecto de cada uno podría ser diferente. El patrón farmacológico para algunos de estos moduladores del receptor nativo oligodendroglial fue reportado recientemente (Arellano *et al.*, 2016).

A continuación, estudiamos el efecto que tienen tres moduladores alostéricos, sobre la respuesta a GABA del receptor $\alpha 3\beta 2\gamma 1$. Estos moduladores son: 1) el indiplon, que es un modulador alostérico positivo sobre el sitio de benzodiazepinas cuando está presente la subunidad $\gamma 2$; 2) la benzodiazepina clásica diazepam, que

es un potenciador de la respuesta de GABA y, por último; 3) la β -carbolina, β -CCB, que se ha descrito que actúa como agonista inverso sobre el sitio a benzodiazepinas.

Utilizamos ovocitos expresando heterológamente la combinación $\alpha 3\beta 2\gamma 1$. Antes de comenzar las aplicaciones, se verificó que los ovocitos tuvieran una amplitud de respuesta a 100 μ M de GABA en el rango esperado. Fue entonces medida la amplitud de respuesta a 10 μ M de GABA, esta constituyó la respuesta control. Después, los ovocitos fueron lavados de 80 a 100 s con solución externa de Ringer, en una segunda aplicación, fue realizada una breve (5 s) preincubación con el modulador (10 μ M), e inmediatamente fue perfundida la combinación del modulador (a la misma concentración que la preincubación) co-aplicado con 10 μ M GABA durante 40 s (Figura 12). Este protocolo fue utilizado para estudiar el efecto de todos los moduladores.

Cada respuesta monitoreada en presencia del modulador, fue normalizada con respecto a la respuesta control (10 μ M GABA), tal y como fue hecho en los experimentos anteriores.

Como puede ser observado en la Figura 9, la combinación analizada mostró una baja o nula sensibilidad a indiplon (110.6 ± 3.4 %). Sin embargo, su respuesta a GABA fue potenciada tanto por la benzodiazepina clásica (198.1 ± 27.1 %), como también por la β -carbolina (236.4 ± 23.2 %).

En resumen, con respecto a los efectos provocados por los moduladores alostéricos, el receptor $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ presentó características farmacológicas y funcionales semejantes a las reportadas para el receptor endógeno oligodendroglial. En especial, la β -carbolina β -CCB, tiene un efecto potenciador de la respuesta a GABA, a diferencia de lo que ocurre en otros receptores como el neuronal en donde este tipo de moléculas ha sido reportado como agonista inverso. A continuación, fue analizado el papel del sitio de unión clásico de benzodiazepinas en el efecto de β -CCB sobre los receptores expresados.

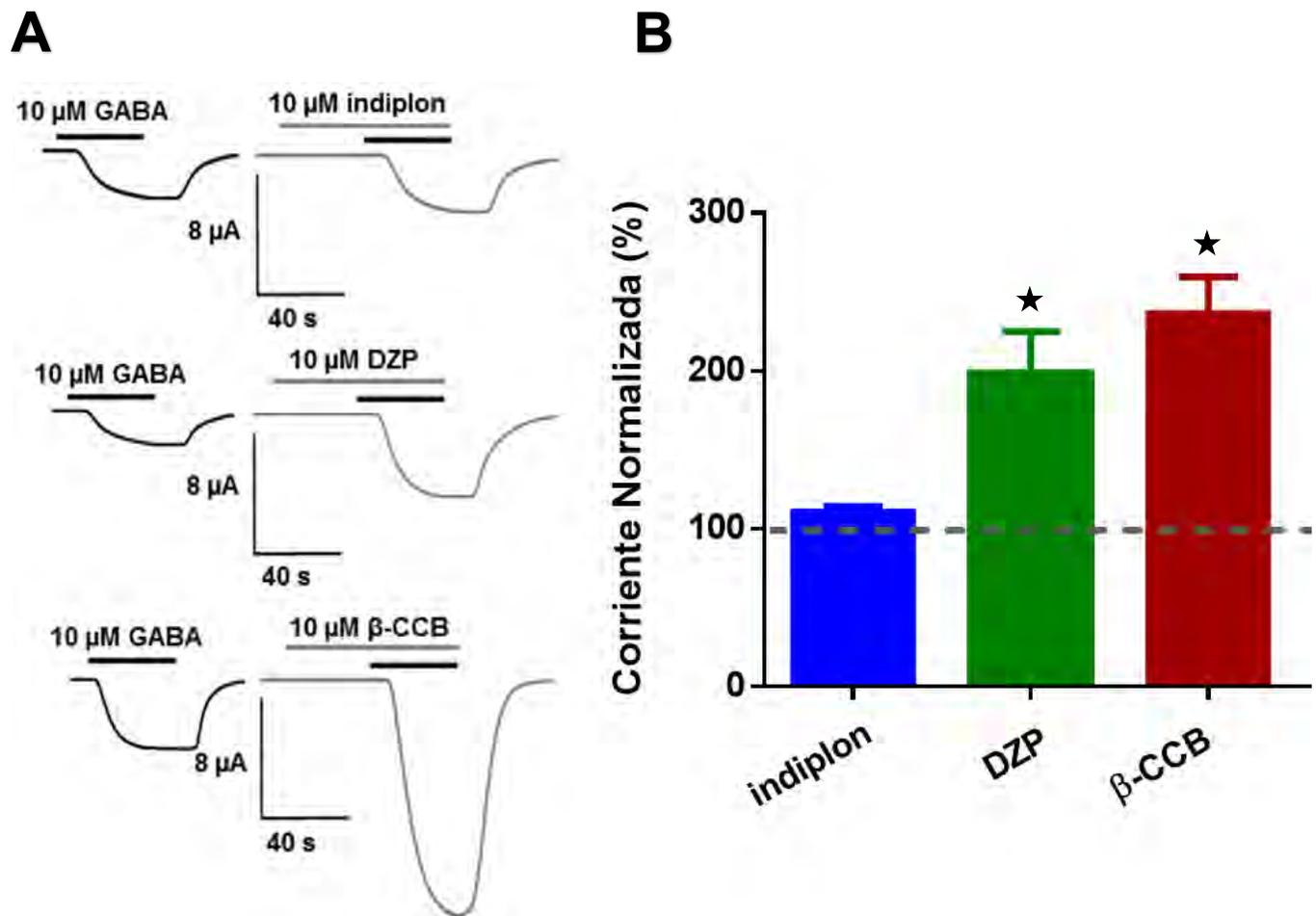


Figura 12. Patrón funcional y farmacológico de la combinación de subunidades $\alpha 3\beta 2\gamma 1$.

(A) Los trazos indican el efecto provocado en la respuesta del receptor cuando se aplican de forma simultánea GABA y diferentes moduladores alostéricos de su receptor de tipo A. Para cada modulador ($n = 10$ ovocitos por modulador) se muestra la respuesta control inducida por GABA y el efecto de la aplicación simultánea. El intervalo de lavado entre aplicaciones está entre 80 s y 100 s. Las barras encima de los trazos indican el momento y la duración de la aplicación de las drogas estudiadas: GABA (barra de color negro) y moduladores alostéricos (barra de color gris). (B) Este gráfico muestra la cuantificación del efecto en la respuesta a GABA de la aplicación simultánea de cada una de las drogas estudiadas. Cada efecto fue normalizado con su correspondiente respuesta de GABA control (10 ovocitos por cada modulador alostérico). La prueba t de Student para datos pareados muestra que los efectos analizados, menos el provocado por indiplon, son estadísticamente diferentes (estrella de color negro) a su correspondiente respuesta control de GABA: $t_{DZP(9)} = 3.61$; $p < 0.05$ y $t_{\beta-CCB(9)} = 5.86$; $p < 0.05$.

7.4 Efecto de flumazenil sobre la potenciación de β -CCB en el receptor $\alpha 3\beta 2\gamma 1$

Las β -carbolinas son un extenso grupo de sustancias, algunas sintetizadas en el sistema nervioso, que fueron descritas como agonistas inversos sobre el sitio de benzodiazepinas. Como mencionamos antes, la β -CCB es una de estas moléculas, sin embargo, en la respuesta endógena oligodendroglial tiene un efecto potenciador sobre la respuesta a GABA (Arellano *et al.*, 2016); aquí, nuestros datos muestran que también provoca potenciación del receptor GABA_A $\alpha 3\beta 2\gamma 1$.

Ha sido descrito que esta sustancia lleva a cabo su efecto inhibitorio sobre la respuesta a GABA de receptores GABA_A neuronales (Peña *et al.*, 1986; Rigo *et al.*, 1994; Thomet *et al.*, 1999), lo más probable actuando a través de su unión al sitio de benzodiazepinas. Por esta razón, aquí analizamos, si el efecto potenciador que ejerce sobre la probable combinación oligodendroglial está mediado a través de este sitio clásico.

Para esto, utilizamos un bloqueador específico del sitio de benzodiazepinas llamado flumazenil (FMZ) (Polc *et al.*, 1981). Antes de comenzar el experimento, exploramos el efecto de este bloqueador en la respuesta a GABA del receptor $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ expresado en ovocitos de *Xenopus*. Para este estudio se emplearon 8 ovocitos a los que, primero, se midió la amplitud de la respuesta que tenían a 10 μ M GABA. Después, los ovocitos fueron lavados de 80 a 100 s con solución externa de Ringer, una segunda aplicación consistió en preincubación de las células con 10 μ M FMZ, por 15 s, e inmediatamente fue perfundida la combinación de FMZ (a la misma concentración que la preincubación) co-aplicado con 10 μ M GABA durante 40 s (Figura 13). En todos los casos FMZ no tuvo efecto alguno sobre la respuesta a GABA medida en estos ovocitos, como se ilustra en los trazos de la Figura 13.

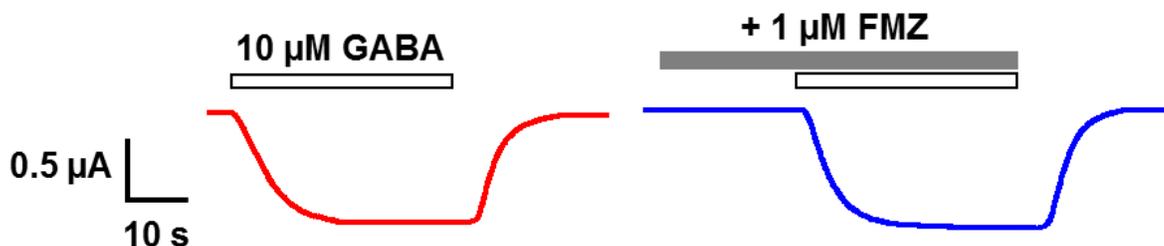


Figura 13. Efecto de flumazenil en la respuesta a GABA del GABA_AR α 3 β 2 γ 1.

Los trazos indican el efecto provocado en la respuesta del receptor cuando se aplican de forma simultánea GABA y FMZ. En color rojo se indica la respuesta control inducida por 10 μ M GABA y en color azul el efecto de la aplicación simultánea de 10 μ M GABA y 1 μ M FMZ. El intervalo de lavado entre aplicaciones está entre 80 s y 100 s. Las barras arriba de cada trazo indican el momento y la duración de la aplicación de las drogas estudiadas: GABA (barra de bordes color negro) y FMZ (barra gris).

Después de demostrar que el FMZ no tiene efectos sobre la respuesta a GABA de este receptor, realizamos el experimento del efecto sobre β -CCB. En cada caso analizado (10 ovocitos), primero fue monitoreada la corriente provocada por la aplicación de 10 μ M GABA, como registro de la amplitud control (100% de la respuesta). Después, los ovocitos fueron lavados de 80 a 100 s con solución externa normal, en una segunda aplicación las células fueron preincubadas perfundiendo 30 μ M β -CCB por 15 s, e inmediatamente fue perfundida la combinación de β -CCB coaplicada con GABA en las mismas concentraciones, similar a lo observado en los experimentos anteriores este tratamiento potenció la respuesta de GABA por 324 ± 30 % (trazos y barra en verde Figura 14). Finalmente, después de un segundo lavado por 100 s, cada ovocito fue pretratado perfundiendo por 15 s la combinación de 30 μ M β -CCB con 1 μ M FMZ, esta coaplicación no provocó respuesta en ninguno de los ovocitos estudiados, sin embargo, al perfundir a continuación la combinación junto con GABA, la respuesta fue potenciada por 447 ± 66 %, es decir, la respuesta fue aún mayor a la observada en la combinación GABA+ β -CCB (gráfica en Figura 14).

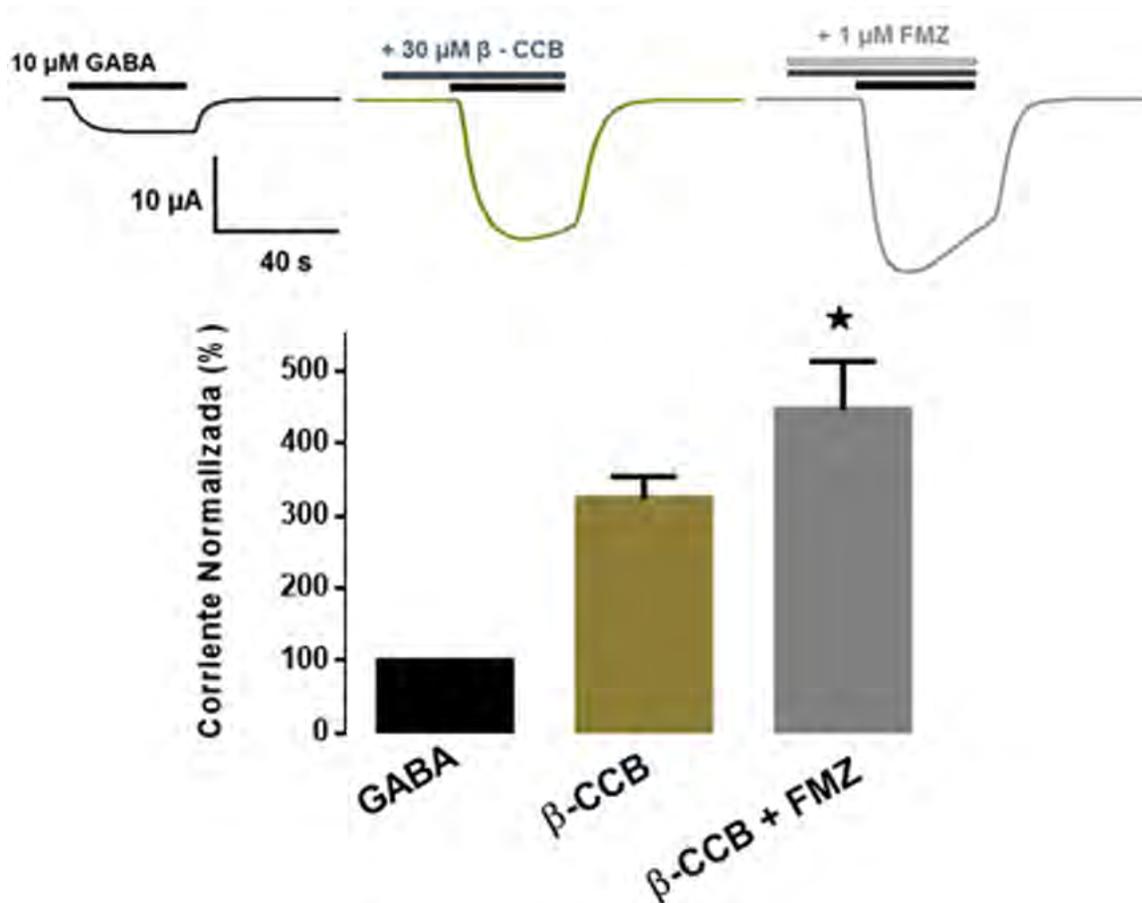


Figura 14. Bloqueo del sitio de benzodiazepinas en el receptor $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ y su efecto sobre la potenciación de β -CCB.

Los trazos muestran, la respuesta control a 10 μ M GABA (negro), el efecto de la aplicación simultánea de β -CCB (30 μ M) con GABA (trazo verde olivo) y la aplicación de estas drogas más 1 μ M de flumazenil (FMZ), bloqueador específico del sitio de BZDs (trazo gris). Las barras encima de los trazos indican el momento y el tiempo de duración de la aplicación de cada sustancia en el experimento: GABA (negro), β -CCB (azul), FMZ (gris). Los intervalos de lavado entre aplicaciones fueron de 80-100 s. En cada condición experimental la corriente obtenida fue normalizada a la obtenida en la condición control donde se aplicó solo GABA (10 ovocitos en cada caso). La gráfica muestra la cuantificación en cada condición experimental. La estrella negra indica que hay diferencia estadísticamente significativa entre las condiciones ($p < 0.05$), encontradas con la prueba de t de Student para muestras pareadas.

A continuación, utilizando el protocolo de co-aplicación anterior, fueron realizadas las curvas dosis-respuesta para β -CCB (de 100 nM a 60 μ M), tanto en la ausencia como en la presencia de FMZ. En la máxima concentración de β -CCB su

efecto potenciador parece no saturar inclusive en la presencia de FMZ, sin embargo, en ambos casos la dosis media aparente fue cercana a $10 \mu\text{M}$ de la droga (Figura 15). Además, se debe hacer notar que, en todos los puntos de la curva dosis-respuesta analizados en el experimento, FMZ siempre aumenta el efecto de $\beta\text{-CCB}$.

Este hecho, nos sugiere que esta sustancia también provocó un efecto inhibitorio de la respuesta a GABA, pero de menor magnitud que el efecto potenciador. Si se calcula la diferencia entre las respuestas medidas entre cada punto correspondiente de las curvas de la Figura 15, se puede observar que el efecto inhibitorio tuvo una dependencia de la dosis semejante a la de la potenciación (Figura 16)

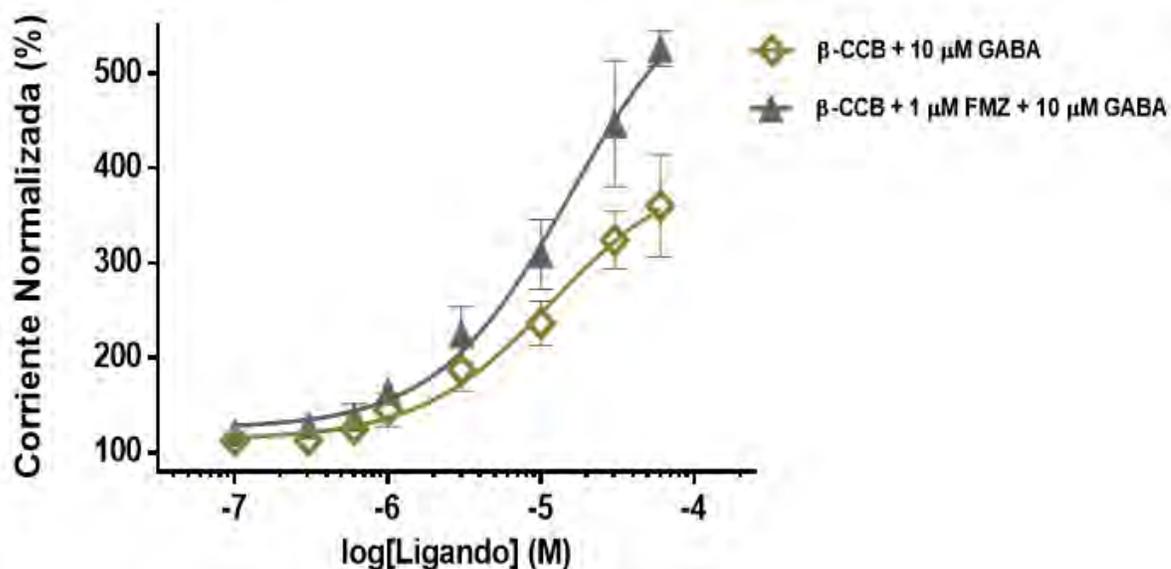


Figura 15. Curva dosis-respuesta del efecto potenciador de $\beta\text{-CCB}$.

El efecto alostérico positivo se midió al aplicar a la vez distintas concentraciones de $\beta\text{-CCB}$ con GABA en presencia ($EC_{50} = 15 \pm 1 \mu\text{M}$, $n = 10$ ovocitos) o no de FMZ ($1 \mu\text{M}$), como se muestra. En cada concentración la corriente medida fue normalizada a la obtenida al aplicar solo $10 \mu\text{M}$ de GABA. Los puntos representan el promedio de la corriente normalizada para cada concentración de $\beta\text{-CCB}$ y las barras indican el error estándar de la media.

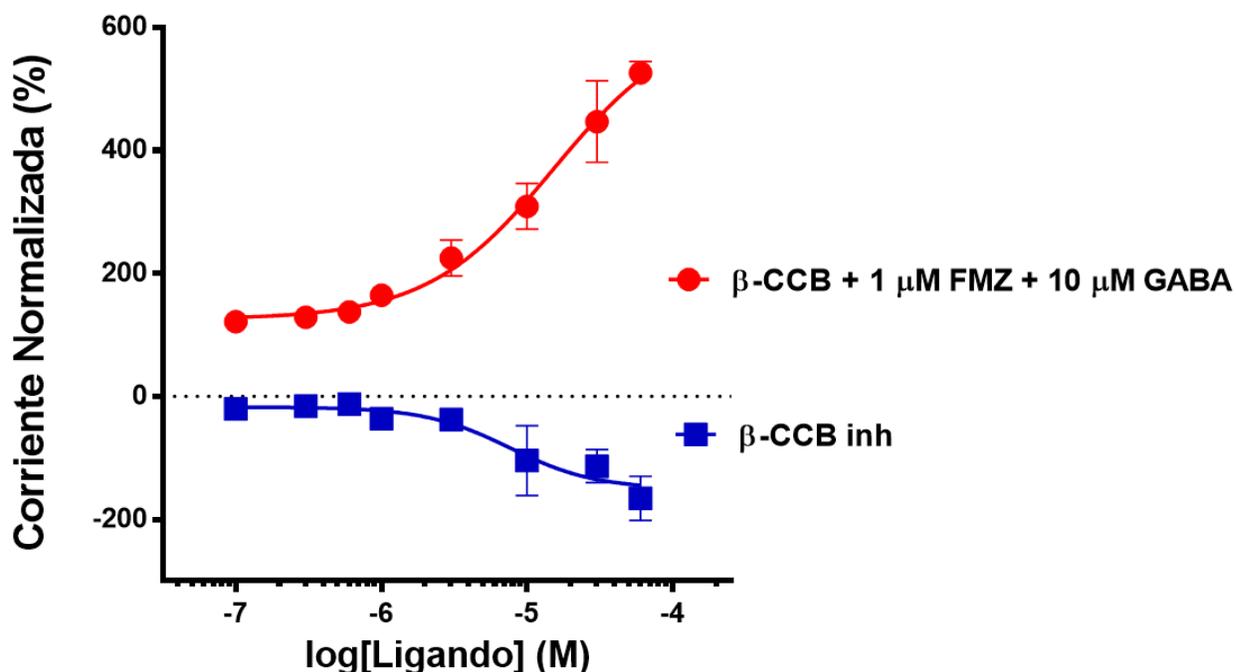


Figura 16. Curva dosis-respuesta del efecto inhibitorio de β -CCB.

El efecto inhibitorio de β -CCB (β -CCB inh) sobre la respuesta de GABA en el receptor $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ se obtuvo de la diferencia entre las curvas de la Figura 15. Los puntos representan el promedio de la corriente normalizada para cada concentración de β -CCB y las barras indican el error estándar de la media.

7.5 Subunidad γ del $GABA_A$ R y el efecto potenciador de β -CCB

Los resultados hasta aquí mostrados, parecen apoyar la idea de la existencia de uno o varios sitios de modulación alostérica positiva para β -CCB, sugiriendo además que este sitio de unión es independiente al sitio clásico de BZDs debido a que FMZ no bloqueó el efecto. Con la intención de explorar si las subunidades γ , que intervienen en la formación del sitio de unión a BZDs clásico, influyen en el efecto potenciador de β -CCB, analizamos el efecto de esta, comparando diferentes combinaciones de subunidades (Figura 17).

En cada caso analizado (10 ovocitos por combinación), primero fue monitoreada la corriente provocada por la aplicación de 10 μ M GABA, como registro de la amplitud control (100% de la respuesta). Después, los ovocitos fueron lavados de 80 a 100 s con solución externa normal, una segunda aplicación incluyó una

breve preincubación de las células perfundiendo 10 μM $\beta\text{-CCB}$ por 15 s, e inmediatamente fue perfundida la combinación de $\beta\text{-CCB}$ coaplicada con GABA en las mismas concentraciones.

Estos datos muestran que el efecto potenciador se mantiene incluso cuando la combinación no contiene subunidad γ , ya que el receptor $\alpha 3\beta 2$ muestra una potenciación de la respuesta a GABA, por la $\beta\text{-CCB}$ de $176.1 \pm 10 \%$. Además, se observó que la magnitud de potenciación también depende de la subunidad γ involucrada, siendo de mayor amplitud cuando la subunidad $\gamma 1$ ($217.3 \pm 16 \%$) está presente en comparación con la subunidad $\gamma 3$ ($150.4 \pm 2 \%$) (Figura 17).

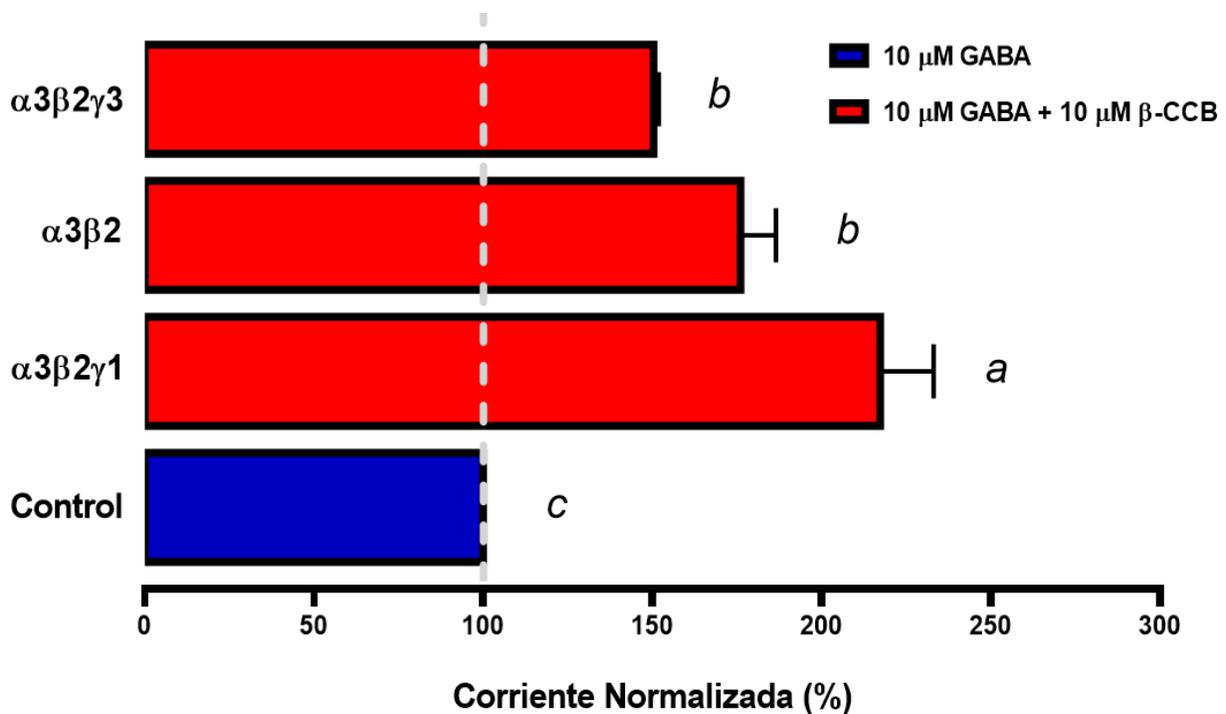


Figura 17. Efecto modulador alostérico positivo de $\beta\text{-CCB}$ en tres combinaciones diferentes de subunidades del receptor GABA_A .

La corriente medida en cada caso fue normalizada a la que se obtuvo al aplicar solo GABA como control (10 ovocitos por cada combinación estudiada). Los valores a parecen representados como media \pm SEM (error estándar de la media). El análisis de varianza (one-way ANOVA) muestra que entre los efectos analizados hay diferencias estadísticamente significativas ($F_{(3, 32; \alpha = 0.05)} = 23.81; p < 0.05$). La prueba *post hoc* de Tukey muestra los grupos diferentes (letras minúsculas cursivas).

8. Discusión

En este trabajo se describen las características farmacológicas de seis receptores tipo GABA_A. Estas combinaciones, fueron escogidas a partir de las conclusiones obtenidas en nuestro laboratorio, a través del estudio funcional y farmacológico de la señalización gabaérgica de los oligodendrocitos del nervio óptico de rata, mantenidos en cultivos primarios (Arellano *et al.*, 2016). En dicho trabajo, se sugiere que los GABA_ARs expresados en estas células gliales, participan principalmente las subunidades $\alpha 3/ \beta 2$ ó $\beta 3/ \gamma 1$ ó $\gamma 3$.

La información relacionada con la identidad del receptor oligodendroglial, es esencial para entender el papel que tienen estos receptores ionotrópicos, en procesos fisiológicos de gran importancia en el SNC, como es el caso de la mielinización. Las últimas investigaciones en este tema, apoyan de manera clara, la idea de que la señalización mediante este neurotransmisor participa en el proceso de comunicación neurona-oligodendroglia, e influye en el proceso fisiológico de la mielinización, así como en los procesos de reparación de la sustancia blanca ante insultos o accidentes del SNC. Además, mostramos información sobre un grupo de moléculas, las β -carbolinas, que pueden actuar de forma específica como modulador alostérico positivo en la respuesta a GABA de los OLs.

En esta sección discutiremos los resultados más relevantes del presente trabajo. Primero, analizaremos las evidencias farmacológicas y funcionales que sugieren que la combinación $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ es el receptor oligodendroglial a GABA de tipo A. Y a continuación, discutiremos las características de la potenciación de la respuesta a GABA que tienen las β -carbolinas, en particular la β -CCB, sobre el receptor constituido por las mismas subunidades.

8.1 La combinación $\alpha 3\beta 2\gamma 1$; el posible receptor oligodendroglial

Para estudiar las características farmacológicas y funcionales de los receptores, formados por diferentes combinaciones de subunidades del receptor GABA_A, clonadas a partir del mRNA de oligodendrocitos, se emplearon ovocitos de

Xenopus laevis como modelo de expresión heteróloga. Diversos trabajos han empleado este sistema de expresión para el estudio de este tipo de receptores (Sigel *et al.*, 1990; Boileau *et al.*, 2002; Palma *et al.*, 2003; Hall *et al.*, 2005; Shu *et al.*, 2012; Karim *et al.*, 2013; Hartiadi *et al.*, 2016), demostrando en su conjunto, que el sistema es una herramienta muy útil y pertinente para la investigación de estas moléculas membranales, ya que están compuestas por múltiples subunidades que pueden ser co-expresadas en diferentes arreglos experimentales.

Sabemos que el receptor ionotrópico a GABA expresado en los oligodendrocitos, presenta características farmacológicas y funcionales, que lo distinguen de los existentes en las neuronas y en otras células gliales (Arellano *et al.*, 2016). Este receptor tiene una relativamente baja afinidad a su agonista, es sensible a Zn^{2+} en el rango μM , y es potenciado por varias β -carbolinas, siendo la más potente la β -CCB. Por esta razón, aquí analizamos sistemáticamente, estos aspectos farmacológicos en las seis combinaciones de receptores, que expresamos de forma heteróloga en ovocitos.

Los receptores a GABA estudiados en este trabajo presentan características distintivas entre cada uno. Estas, no solo se ven reflejadas en la cinética de la respuesta a las diferentes concentraciones de GABA aplicadas, sino también en dos características esenciales, desde el punto de vista fisiológico, que son la amplitud máxima de la respuesta a GABA y la sensibilidad de cada uno a este neurotransmisor (Olsen & Sieghart, 2008).

Según la amplitud de la respuesta, entre todas las combinaciones estudiadas, observamos que la conformada por $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ es la que presenta las máximas respuestas a GABA. Si se analiza la respuesta máxima (a $1000 \mu M$ de GABA), esta es una respuesta de gran magnitud (varios μA) de activación y desensibilización rápida, similar a la reportada para la respuesta a GABA de células oligodendrogiales de diferentes preparaciones y condiciones de cultivo, considerando las diferencias en el tamaño de las células registradas (von Blankenfeld *et al.*, 1991; Williamson *et al.*, 1998; Arellano *et al.*, 2016).

La potencia (cuantificada con el EC_{50}) medida a GABA, muestra dos combinaciones que sobresalen por tener valores de EC_{50} altos, las conformadas por

$\alpha 3\beta 2\gamma 1$ ($53 \pm 3 \mu\text{M}$) y $\alpha 3\beta 3\gamma 1$ ($66 \pm 1.2 \mu\text{M}$). El factor común entre ambos receptores, que al mismo tiempo los distingue del resto, es la presencia de la subunidad $\gamma 1$. La subunidad $\alpha 3$, forma receptores de baja afinidad a GABA cuando están presentes las subunidades $\beta 2$ y la $\beta 3$ (Sigel *et al.*, 1990; Gingrich *et al.*, 1995; Karim *et al.*, 2013; Hartiadi *et al.*, 2016), sin embargo, no existen reportes en la literatura que indiquen cómo contribuyen las subunidades γ en la afinidad a GABA; nuestros datos muestran que es probable que esta subunidad tenga un efecto en la afinidad del receptor por su agonista. Ambos receptores, tienen afinidades a GABA cercanas a la reportada para el receptor nativo de los oligodendrocitos ($79 \pm 12 \mu\text{M}$; Arellano *et al.*, 2016).

La sensibilidad a zinc, es otra característica importante que verificamos en las combinaciones estudiadas. Así, encontramos tres grupos que difieren en este aspecto, el primero, en el que están las combinaciones que no presentan subunidad γ , son las dos combinaciones más sensibles a este metal, esto se explica al hecho de que, en ambas configuraciones se encuentran disponibles los tres sitios de unión inhibitorios del Zn^{2+} sobre el receptor (Hosie *et al.*, 2003).

La presencia en el receptor de la subunidad γ , provoca una disminución de la sensibilidad a Zn^{2+} , ya que solo queda disponible uno de los tres sitios antes mencionados. Nuestros datos confirman este hecho, sin embargo, muestran que el efecto de este metal sobre los receptores a GABA, es diferente cuando está presente la subunidad $\gamma 3$, o cuando se encuentra la $\gamma 1$. Es probable, por lo tanto, que la disrupción de los sitios de Zn^{2+} es diferente cuando está una subunidad o la otra. También, encontramos que el tipo de subunidad β parece ser relevante en el efecto inhibitorio de Zn^{2+} . Cuando se encuentra la subunidad $\beta 2$ en los receptores el efecto de Zn^{2+} es mayor que cuando está la $\beta 3$. Como mostramos anteriormente, las dos combinaciones con $\gamma 1$ son las de menor afinidad a GABA, pero entre ambos, el receptor que contiene a la subunidad $\beta 2$ es más sensible a Zn^{2+} . Además, tiene un valor de IC_{50} ($26 \pm 1 \mu\text{M}$) relativamente cercano al que se encontró en el receptor nativo de OLs, que es de aproximadamente $10 \mu\text{M}$ (Arellano *et al.*, 2016).

Hasta aquí, los datos muestran que, de las seis combinaciones estudiadas, la correspondiente a $\alpha 3\beta 2\gamma 1$, cumple con características farmacológicas relacionadas

con la afinidad a GABA y la sensibilidad a Zn^{2+} , cercanas a las del receptor oligodendroglial endógeno.

Debido a esto continuamos nuestro análisis estudiando el efecto de una batería de moduladores alostéricos de los $GABA_A$ Rs sobre el receptor $\alpha 3\beta 2\gamma 1$, esta batería de fármacos, también fue utilizada en la caracterización del receptor nativo de oligodendrocitos del nervio óptico de rata. Los efectos que tienen estas drogas sobre la respuesta a GABA en el receptor endógeno, permiten también afirmar que el receptor oligodendroglial tiene características farmacológicas que lo distinguen del neuronal y del presente en otras células gliales.

Los resultados obtenidos muestran que la combinación $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ reproduce el patrón farmacológico y funcional del receptor nativo de OLs. Primero, el receptor no presenta sensibilidad a indiplon, recordemos que este es un potente modulador alostérico positivo sobre el sitio de benzodiazepinas, cuando está presente la subunidad $\gamma 2$. Segundo, su respuesta a GABA es potenciada por DZP. El efecto de esta benzodiazepina clásica, refuerza dos ideas, primero que este receptor expresado de forma heteróloga, expresa funcionalmente el sitio de unión a benzodiazepinas, lo que prueba la incorporación de la subunidad $\gamma 1$ en el receptor expresado en estas condiciones, y segundo que este modulador tiene un efecto similar al que tiene sobre el receptor nativo de OLs del nervio óptico de rata.

De manera importante, aquí mostramos también que la β -CCB, tiene un efecto potenciador de la respuesta a GABA, sobre la combinación $\alpha 3\beta 2\gamma 1$. Este resultado concuerda con lo reportado para el receptor de GABA oligodendroglial. Como hemos mencionado, esta β -carbolina presentó un efecto potenciador de la respuesta a GABA en el receptor oligodendroglial. Aquí, no podemos perder de vista que la señalización gabaérgica tiene un papel importante en eventos esenciales en el proceso de mielinización (Zonouzi *et al.*, 2015; Arellano *et al.*, 2016; Daneshdoust *et al.*, 2017; Fattorini *et al.*, 2017; Hamilton *et al.*, 2017), es por lo tanto de importancia la búsqueda de sustancias, que puedan modular de manera específica a este tipo de receptores en los oligodendrocitos. En este contexto es de gran interés que diversas β -carbolinas probadas en nuestro laboratorio sobre las respuestas gabaérgicas neuronales muestran un nulo efecto (como es el caso de la

β -CCB) o un efecto inhibitorio (como el caso de DMCM) incluyendo las estudiadas aquí.

Por lo tanto, con los resultados mostrados, podemos decir que la combinación $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ reproduce el patrón farmacológico y funcional del GABA_AR que se encuentra en los OLs del nervio óptico de rata, y representa un nuevo tipo de receptor endógeno. Esto último es debido a que esta combinación de subunidades GABA_A, no aparece entre las 11 que han sido identificadas plenamente hasta ahora de manera endógena (Olsen & Sieghart, 2008). Dentro de estas últimas, están aquellas que combinan las subunidades $\alpha\beta$ ya sea con la $\gamma 2$ (receptores sinápticos) o con la subunidad δ (receptores extrasinápticos) y los homopentámeros de ρ . La combinación propuesta tampoco se encuentra entre los grupos de receptores (15 al menos) que se ha propuesto podrían existir, con una alta probabilidad, o que por lo menos son tentativos. Además, es una combinación de subunidades diferente a los receptores $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ (Benke *et al.*, 1991) y al $\alpha 2\beta 1\gamma 1$ (Whiting *et al.*, 2000) presentes principalmente en neuronas y astrocitos, respectivamente.

8.2 Efecto potenciador de la β -CCB

La β -CCB es una β -carbolina endógena, que se describió, como agonista inverso sobre el sitio de benzodiazepinas de receptores neuronales a GABA (Peña *et al.*, 1986; Rigo *et al.*, 1994; Thomet *et al.*, 1999). Nuestros resultados muestran en cambio, un efecto potenciador provocado por esta sustancia sobre la combinación propuesta para el receptor oligodendroglial.

Debido a la importancia de encontrar sustancias que actúen de manera específica sobre los OLs, los siguientes experimentos fueron realizados para tener información sobre el mecanismo de acción que la β -CCB tuvo sobre la combinación $\alpha 3\beta 2\gamma 1$. Primero, demostramos que este efecto alostérico positivo, no fue mediado por la unión de esta sustancia al sitio de unión de benzodiazepinas. Ya que con el bloqueo farmacológico de este sitio con 1 μ M de FMZ, no solo se mantiene el efecto, sino que es inclusive mayor a cuando el sitio no está bloqueado. Este hallazgo indica, que el efecto potenciador, no fue mediado por la unión de la β -carbolina al

sitio de benzodiazepinas. Debe existir otro sitio alostérico sobre la molécula que, al unirse a esta sustancia, provoca el efecto potenciador de la respuesta de GABA del receptor. Segundo, sugiere que la β -CCB no solo se une a este segundo sitio desconocido, sino que también lo hace al sitio de benzodiazepinas. Sin embargo, su unión a este último, provoca la inhibición de la respuesta a GABA. Lo que coincide con su efecto de agonista inverso sobre el sitio de benzodiazepinas. Este efecto dual de la β -CCB, puede explicar que, cuando el sitio de benzodiazepinas está bloqueado, i.e., que está anulada la inhibición, se obtuvo entonces un efecto potenciador mayor.

Los datos indican que el efecto dual de este modulador alostérico tiene magnitudes diferentes, ya que a las diferentes concentraciones de β -CCB estudiadas en la presencia y en la ausencia de FMZ, siempre la potenciación fue mayor que la inhibición. A pesar de eso, en la medida en que aumenta la concentración de β -CCB ambos efectos aumentan. Esto sugiere que, ambos sitios presentan valores de afinidades bastante cercanas (Walters *et al.*, 2000; Middendorp *et al.*, 2015).

Según nuestros datos, a pesar de que no esté presente la subunidad γ , al menos parte del efecto potenciador de la β -CCB se mantiene. Es probable por lo tanto que el efecto potenciador de β -CCB depende fundamentalmente de las subunidades $\alpha\beta$. Sin embargo, nuestros datos también indican que el tipo de subunidad γ que esté contribuyendo a la formación del canal, ejerció un efecto modulador de la potenciación provocada por esta β -carbolina endógena. Es posible que el balance entre los sitios de modulación positiva y negativa sea el responsable del resultado final observado, y que este balance dependa principalmente de la subunidad γ expresada.

Los resultados de esta investigación, han generado el planteamiento de nuevas preguntas que requieren de la ejecución de más estudios. En particular, por ejemplo, será importante saber si la combinación de subunidades propuesta como receptor oligodendroglial, con las herramientas farmacológicas y electrofisiológicas usadas hasta ahora, es respaldada además con otras técnicas de modificación a nivel molecular. También, será importante saber si esta combinación está presente

en los OLs que se expresan en distintas zonas del cerebro o son específicas del nervio óptico.

No sabemos si las características funcionales y farmacológicas que hemos encontrado cambian en las diferentes etapas del desarrollo del animal. Otra pregunta, es saber si las β -carbolinas, y en especial la β -CCB, actuando a través de estos receptores, podría afectar el proceso de mielinización, o de remielinización, ante daños a la sustancia blanca.

9. Conclusiones

- I- De las combinaciones expresadas de forma heteróloga, la combinación $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ reproduce el patrón funcional y farmacológico del receptor $GABA_A$ que se expresa en los oligodendrocitos del nervio óptico de rata.

- II- Existe uno o varios sitios de modulación alostérica positiva para la β -carbolina endógena β -CCB sobre el receptor $GABA_A$ oligodendroglial, que no es el sitio de unión a benzodiazepinas, donde actúa como agonista inverso.

- III- El efecto potenciador de la β -CCB, no depende de la presencia de subunidades γ , pero es modulado por el tipo de esta subunidad que esté presente en el receptor $GABA_A$.

10. Literatura Citada

Arancibia-Carcamo, L. y D. Attwell (2014): The node of Ranvier in CNS pathology. *Acta Neuropathologica* 128: 161-175.

Arellano, R. O. y R. Miledi (1993): Novel Cl⁻ currents elicited by follicle stimulating hormone and acetylcholine in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *The Journal of General Physiology* 102(102): 833-857.

Arellano, R. O., R. M. Woodward y R. Miledi (1995): A monovalent cationic conductance that is blocked by extracellular divalent cations in *Xenopus* oocytes. *Journal of Physiology* 484(3): 593-604.

Arellano, R. O., M. V. Sánchez, E. Alberdi, M. Canedo, J. C. Chara, A. Palomino, A. Pérez y C. Matute (2016): Axon-to-glia interaction regulates GABA_A receptor expression in oligodendrocytes. *Molecular Pharmacology* 89: 63-74.

Baracska, K. L., C. S. Duchala, R. H. Miller, W. B. Macklin y B. D. Trapp (2002): Oligodendrogenesis is differentially regulated in gray and white matter of jimpy mice. *Journal of Neuroscience Research* 70(5): 645-654.

Barnard, E. A., P. Skolnick, R. W. Olsen, H. Mohler, W. Sieghart, G. Biggio, C. Braestrup, A. N. Bateson y S. Z. Langer (1998): International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of γ -aminobutyric acid_A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacological Reviews* 50: 291-313.

Barres, B. A., W. J. Koroshetz, K. J. Swartz, L. L. Chun y D. P. Corey (1990): Ion channel expression by white matter glia: The O-2A glial progenitor cell. *Neuron* 4: 507-524.

- Barres, B. A. y M. C. Raff (1994): Control of oligodendrocyte number in the developing rat optic nerve. *Neuron* 12: 935-942.
- Baumann, N. y D. Pham-Dinh (2001): Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiological Reviews* 81: 871-927.
- Bechler, M. E., L. Byrne y French-Constant C (2015): CNS myelin sheath lengths are an intrinsic property of oligodendrocytes. *Current Biology* 25: 2411-2416.
- Benke, D., S. Mertens, A. Trzeciak, D. Gillessen y H. Mohler (1991): GABA_A Receptors Display Association of γ 2-Subunit with α 1-Subunit and β 2/3-Subunits. *Journal of Biological Chemistry* 266(7): 4478-4483.
- Bergles, D. E. (2012): *Physiology of NG2⁺ glial cells*. Oxford University Press. New York.
- Bergles, D. E., J. D. Roberts, P. Somogyi y C. E. Jahr (2000): Glutamatergic synapses on oligodendrocytes precursor cells in the hippocampus. *Nature* 405: 187-191.
- Bergles, D. E. y W. D. Richardson (2015): Oligodendrocyte development and plasticity. En: Barres, B. A., M. R. Freeman y B. Stevens (eds.), *Glia*. pp 139-165. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Bettler, B., K. Kaupmann, J. Mosbacher y M. Gassmann (2004): Molecular Structure and Physiological Functions of GABA_B Receptors. *Physiological Reviews* 84: 835-867.
- Boileau, A., R. Baur, L. Sharkey, E. Sigel y C. Czajkowski (2002): The relative amount of cRNA coding for γ 2 subunits affects stimulation by benzodiazepines in GABA_A receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuropharmacology* 43(4):

695-700.

Bradl, M. y H. Lassmann (2013): Multiple sclerosis. En: Kettenmann, H. y B.R. Ransom (eds.), *Neuroglia*. pp 785-797. Oxford University Press. New York.

Bronstein, J. M., T. G. Hales, R. F. Tyndale y A. C. Charles (1998): A conditionally immortalized glial cell line that expresses mature myelin proteins and functional GABA_A receptors. *Journal of Neurochemistry* 70(2): 483-491.

Butt, A. M. (2013): Structure and function of oligodendrocytes. En: Kettenmann, H. y B.R. Ransom (eds.), *Neuroglia*. pp 62-73. Oxford University Press. New York.

Butt, A. M., M. Ibrahim y M. Berry (1998): Axon-myelin sheath relations of oligodendrocyte unit phenotypes in the adult rat anterior medullary velum. *Journal of Neurocytology* 27 (4): 259-269.

Cahoy, J. D., B. Emery, A. Kaushal, L. C. Foo, J. L. Zamanian, K. S. Christopherson, Y. Xing, J. L. Lubischer, P. A. Krieg y S. A. Krupenko (2008): A transcriptome database for astrocytes, neurons and oligodendrocytes: A new resource for understanding brain development and function. *Journal of Neuroscience* 28: 264-278.

Clements, C. S., H. H. Reid, T. Beddoe, F. E. Tynan, M. A. Perugini y T. G. Johns (2003): The crystal structure of myelin oligodendrocyte glycoprotein, a key autoantigen in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(19): 11059-11064.

Daneshdoust, D., M. Khalili-Fomeshi, M. Ghasemi-Kasman, D. Ghorbanian, M. Hashemian, M. Gholami y A. Shojaei (2017): Pregabalin enhances myelin repair and attenuates glial activation in lysolecithin-induced demyelination model of rat optic chiasm. *Neuroscience* 344(January): 148-156.

- Delpire, E., K. B. Gagnon, J. J. Ledford y J. M. Wallace (2011): Housing and husbandry of *Xenopus laevis* affect the quality of oocytes for heterologous expression studies. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 50 (1): 46-53.
- Demerens, C., B. Stankoff, M. Logak, P. Anglade, B. Allinquant y F. Couraud (1996): Induction of myelination in the central nervous system by electrical activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 9887-9892.
- de Biase, L. M., A. Nishiyama y D. E. Bergles (2010): Excitability and synaptic communication within the oligodendrocyte lineage. *Journal of Neuroscience* 30: 3600-3611.
- del Rio-Hortega D. P. (1921): Histogénesis y evolución normal; éxodo y distribución regional de la microglía. *Real Sociedad Española de Historia Natural* 11: 213-268.
- Dumont, J.N. (1972): Oogenesis in *Xenopus laevis*. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *Journal of Morphology* 136: 153-179.
- Emery, B. (2010): Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Science* 330: 779-782.
- Fattorini, G., M. Melone, M. V. Sánchez-Gómez, R. O. Arellano, S. Bassi, C. Matute y F. Conti (2017): GAT-1 Mediated GABA Uptake in Rat Oligodendrocytes. *GLIA* 65: 514-522.
- Freeman M. R. y D. H. Rowitch (2013): Evolving concepts of gliogenesis: A look way back and ahead to the next 25 years. *Neuron* 80: 613-623.

- Frederickson, C. J. y A. I. Bush (2001): Synaptically released zinc: physiological functions and pathological effects. *Biometals* 14: 353-366.
- Frühbeis, C., D. Fröhlich, W. P. Kuo, J. Amphornrat, S. Thilemann, A. S. Saab, F. Kirchhoff, W. Möbius, S. Goebbels, K. A. Nave, A. Schneider, M. Simons, M. Klugmann, J. Trotter y E. M. Krämer-Albers (2013): Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte–neuron communication. *Plos Biology* 11(7): 1-19.
- Gibson, E. M., D. Purger, C. W. Mount, A. K. Goldstein, G. I. Lin, L. S. Wood, I. Inema, S. E. Miller, G. Bieri y J. B. Zuchero (2014): Neuronal activity promotes oligodendrogenesis and adaptative myelination in the mammalian brain. *Science* 344: 1252304.
- Gilbert, P., H. Kettenmann y M. Schachner (1984): Gamma-amino-butyric acid directly depolarizes cultured oligodendrocytes. *The Journal of Neuroscience* 4 (2): 561-569.
- Gingrich, K. J., W. A. Roberts y R. S. Kass (1995): Dependence of the GABA_A receptor gating kinetics on the α -subunit isoform: implications for structure-function relations and synaptic transmission. *Journal of Physiology* 489: 529-543.
- Griffiths, I., M. Klugmann, T. Anderson, D. Yool, C. Thomson, M. H. Schwab, A. Shneider, F. Zimmermann, M. McCulloch y N. Nadon (1998): Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* 280: 1610-1613.
- Goldin, A. L. (2006): Expression of ion channels in *Xenopus* Oocytes. En: Clare, J.J. y D. J. Trezise (eds.): *Expression and Analysis of Recombinant Ion Channels*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim.

- Hall, B. J., M. Chebib, J. R. Hanrahan y G. A. R Johnston (2005): 6-Methylflavanone, a more efficacious positive allosteric modulator of gamma-aminobutyric acid (GABA) action at human recombinant $\alpha 2\beta 2\gamma 2L$ than at $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ and $\alpha 1\beta 2$ GABA(A) receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *European Journal of Pharmacology* 512(2-3): 97-104.
- Hamilton, N. B., L. E. Clarke, I. L. Arancibia-Carcamo, E. Kougioumtzidou, M. Matthey, R. Káradóttir, L. Whiteley, L. H. Bergersen, W. D. Richardson y D. Attwell (2017): Endogenous GABA controls oligodendrocyte lineage cell number, myelination, and CNS internode length. *GLIA* 65: 309-321.
- Hartiadi, L. Y., K. A Philip, Ch. Mary y L. A. Nathan (2016): High and low GABA sensitivity $\alpha 4\beta 2\delta$ GABA_A receptors are expressed in *Xenopus laevis* oocytes with divergent stoichiometries. *Biochemical Pharmacology* 103: 98-108.
- Hevers, W. y H. Lüddens (1998): The diversity of GABA_A receptors: pharmacological and electrophysiological properties of GABA_A channel subtypes. *Molecular Neurobiology* 18: 35-86.
- Hille, B. (2001): *Ion Channels of Excitable Membranes*. University of Washington. New York. 814 pp.
- Hoppe, D y H. Kettenmann (1989): GABA triggers a Cl⁻ efflux from cultured mouse oligodendrocytes. *Neuroscience Letters* 97(3): 334-339.
- Hosie, A. M., E. L. Dunne, R. J. Harvey y T. G. Smart (2003): Zinc-mediated inhibition of GABA_A receptors: discrete binding sites underlie subtype specificity. *Nature Neuroscience* 6: 362-369.

- Hughes, E. G., S. H. Kang, M. Fukaya y D. E. Bergles (2013): Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain. *Nature Neuroscience* 16: 668-676.
- Ishibashi, T., K. A. Dakin, B. Stevens, P. R. Lee, S. V. Kozlov y C. L. Stewart (2006): Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. *Neuron* 49: 823-832.
- Kandel, E. R., J. H. Schwartz, T. M. Jessell, S. A. Siegelbaum y A. J. Hudspeth (2013): *Principles of Neural Science*. The McGraw-Hill Companies, Inc. 1709 pp.
- Kang, S. H., M. Fukaya, J. K. Yang, J. D. Rothstein y D. E. Bergles (2010): NG2+ CNS glial progenitors remain committed to the oligodendrocyte lineage in postnatal life and following neurodegeneration. *Neuron* 68(4): 668-81.
- Karim, N., P. Wellendorph, N. Absalom, G. Johnston, J. R. Hanrahan y M. Chebib (2013): Potency of GABA at human recombinant GABA_A receptors expressed in *Xenopus* oocytes: a mini review. *Amino Acids* 44: 1139-1149.
- Kettenmann, H. y B.R. Ransom (2013): *Neuroglia*. 3rd ed. Oxford University Press. New York.
- Kirchhoff, F. y H. Kettenmann (1992): GABA Triggers a [Ca²⁺]_i increase in murine precursor cells of the oligodendrocyte lineage. *European Journal of Neuroscience* 4(11): 1049-1058.
- Klausberger, T., J. D. B. Roberts y P. Somogyi (2002): Cell type and input-specific differences in the number and subtypes of synaptic GABA_A receptors in the hippocampus. *Journal of Neuroscience* 22: 2513-2521.

- Krall, J., T. Balle, N. Krogsgaard-Larsen, T. E. Sørensen, P. Krogsgaard-Larsen, U. Kristiansen y B. Frølund (2014): GABA_A Receptor partial agonists and antagonists: structure, binding mode, and pharmacology. *Advances in Pharmacology* 201-227.
- Kukley, M., A. Nishiyama y D. Dietrich (2010): The fate of synaptic input to NG2 glial cells: Neurons specifically down-regulate transmitter release onto differentiating oligodendroglial cells. *Journal of Neuroscience* 30: 8320-8331.
- Kusano, K., R. Miledi y J. Stinnakre (1982): Cholinergic and catecholaminergic receptors in the *Xenopus* oocyte membrane. *Journal of Physiology* 328: 143-170.
- Lappe-Siefke, C., S. Goebbels, M. Gravel, E. Nicksch, J. Lee y P. E. Braun (2003): Disruption of *Cnp1* uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nature Genetics* 33(3): 366-374.
- Lee, S., M. K. Leach, S. A. Redmond, S. Y. Chong, S. H. Mellon, S. J. Tuck, S. Q. Feng, J. M. Corey y J. R. Chan (2012): A culture system to study oligodendrocyte myelination processes using engineered nanofibers. *Nature Methods* 9: 917-922.
- Lees, P., F. M. Cunningham y J. Elliott (2004): Principles of pharmacodynamics and their applications in veterinary pharmacology. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 27: 397-414.
- Lin, S. C. y D. E. Bergles (2004): Synaptic signaling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature Neuroscience* 7(1): 24-32.

- Lin, S. C., J. H. Huck, J. D. Roberts, W. B. Macklin, P. Somogyi y D. E. Bergles (2005): Climbing fiber innervation of NG2-expressing glia in the mammalian cerebellum. *Neuron* 46: 773-785.
- Luyt, K., T. P. Slade, J. J. Dorward, C. F. Durant, Y. Wu y R. Shigemoto (2007): Developing oligodendrocytes express functional GABA_B receptors that stimulate cell proliferation and migration. *Journal of Neurochemistry* 100(3): 822-840.
- McKenzie, I. A., D. Ohayon, H. Li, J. P. Faria, B. Emery, K. Tohyama, W. D. Richardson (2014): Motor skill learning requires active central myelination. *Science* 346: 318-322.
- Marques, S., A. Zeisel, S. Codeluppi, D. van Bruggen, A. M. Falcão, L. Xiao, H. Li, M. Häring, H. Hochgerner, R. A. Romanov, D. Gyllborg, A. B. Muñoz-Manchado, G. La Manno, P. Lönnerberg, E. M. Floriddia, F. Rezayee, P. Ernfors, E. Arenas, J. Hjerling-Leffler, T. Harkany, W. D. Richardson, S. Linnarsson y G. Castelo-Branco (2016): Oligodendrocyte heterogeneity in the mouse juvenile and adult central nervous system. *Science* 352(6291): 1326-1329.
- Matute, C., R. O. Arellano, B. Conde-Guerrit y R. Miledi (1992): mRNA coding for neurotransmitter receptors in a human astrocytoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 89: 3399-3403.
- Middendorp, S. J., M. C. Maldifassi, R. Baur y E. Sigel (2015): Positive modulation of synaptic and extrasynaptic GABA_A receptors by an antagonist of the high affinity benzodiazepine binding site. *Neuropharmacology* 95: 459-67.
- Miledi, R. (1982): A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 215: 491-497.

- Miledi, R. y M. Woodward (1989): Effects of defolliculation on membrane current responses of *Xenopus* oocytes. *Journal of Physiology* 416: 601-621.
- Miller, R. H. (2002): Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Progress in Neurobiology* 67: 451-467.
- Miller, P. S. y A. R. Aricescu (2014): Crystal structure of a human GABA_A receptor. *Nature*. doi: 10.1038/nature13293. [Epub ahead of print].
- Mobius, W., B. Cooper, W. A. Kaujmann, C. Iming, T. Ruhwedel, N. Snaidero, A. S. Saab y F. Varoqueaux (2008): Electron microscopy of the mouse central nervous system. *Methods in Cell Biology* 96: 475-512.
- Monod, J., J. Wyman y J-P. Changeux (1965): On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *Journal of Molecular Biology* 12: 88-118.
- Muller, J., D. Reyes-Haro, T. Pivneva, C. Nolte, R. Schaette, J. Lubke y H. Kettenmann (2009): The principal neurons of the medial nucleus of the trapezoid body and NG2⁺ glial cells receive coordinated excitatory synaptic input. *The Journal of General Physiology* 134: 115-127.
- Nishiyama, A., M. Komitova, R. Suzuki, y X. Zhu (2009): Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *Nature Reviews Neuroscience* 10(1): 9-22.
- Olsen, R. W. (2015): Allosteric ligands and their binding sites define γ -aminobutyric acid (GABA) type A receptor subtypes. *Advances in Pharmacology* 167-202.
- Olsen, R. W. y W. Sieghart (2008): International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid_A receptors: classification on the basis of

subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacological Reviews* 60: 243-260.

Ono, K. y K. Ikenara (2013): Lineage and development: oligodendrocytes. En: Kettenmann, H. y B.R. Ransom (eds.), *Neuroglia*. pp 148-158. Oxford University Press. New York.

Paez, P. M., D. J. Fulton, V. Spreuer, V. Handley, C. W. Campagnoni, W. B. Macklin, C. Colwell y A. T. Campagnoni (2009): Golli myelin basic proteins regulate oligodendroglial progenitor cell migration through voltage-gated Ca^{2+} influx. *The Journal of Neuroscience*. 29: 6663-6676.

Palma, E., F. Trettel, S. Fucile, M. Renzi, R. Miledi y F. Eusebi (2003): Microtransplantation of membranes from cultured cells to *Xenopus* oocytes: a method to study neurotransmitter receptors embedded in native lipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(5): 2896-2900.

Peña, C., J. H. Medina, M. L. Novas, A. C. Paladini y E. De Robertis (1986): Isolation and identification in bovine cerebral cortex of *n*-butyl β -carboline-3-carboxylate, a potent benzodiazepine binding inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83: 4952-4956.

Petroski, R. E., J. E. Pomeroy, R. Das, H. Bowman, W. Yang, A. P. Chen y A. C. Foster (2006): Indiplon is a high-affinity positive allosteric modulator with selectivity for $\alpha 1$ subunit-containing GABA_A receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 317: 369-377.

- Pirker, S., C. Schwarzer, A. Wieselthaler, W. Sieghart y G. Sperk (2000): GABA_A receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience* 101: 815-833.
- Polc, P., J. P. Laurent, R. Scherschlicht y W. Haefely (1981): Electrophysiological studies on the specific benzodiazepine antagonist Ro 15-1788. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 316 (4): 317-325.
- Pörtl, A., B. Hauer, K. Fuchs, V. Tretter y W. Sieghart (2003): Subunit composition and quantitative importance of GABA_A receptor subtypes in the cerebellum of mouse and rat. *Journal of Neurochemistry* 87: 1444-1455.
- Raff, M.C., R.H. Miller y M. Noble (1983): A glial progenitor that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature* 303: 390-396.
- Rigo, J. M., S. Belachew, P. P. Lefebvre, P. Leprince, B. Malgrange, B. Rogister, H. Kettenmann y G. Moonen (1994): Astroglia-released factor shows similar effects as benzodiazepine inverse agonists. *Journal of Neuroscience Research* 39: 364-376.
- Rushton, W. A. (1951): A theory of the effects of fibre size in medullated nerve. *Journal of Physiology* 115: 101-122.
- Sampaio-Baptista, C., A. A. Khrapitchev, S. Foxley, T. Schlagheck, J. Scholz, S. Jbabdi, G. C. DeLuca, K. L. Miller, A. Taylor, N. Thomas, J. Kleim, N. R. Sibson, D. Bannerman y H. Johansen-Berg (2013): Motor skill learning induces changes in white matter microstructure and myelination. *Journal of Neuroscience* 33: 19499-19503.
- Sarto-Jackson, I. y W. Sieghart (2008): Assembly of GABA_A receptors (Review).

Molecular Membrane Biology 25 (4): 302-310.

Schachner, M. y U. Bartsch (2000): Multiple functions of the myelin-associated glycoprotein MAG (siglec-4a) in formation and maintenance of myelin. *Glia* 29(2): 154-165.

Seidl, A. H., E. W. Rubel y A. Barría (2014): Differential conduction velocity regulation in ipsilateral and contralateral collaterals innervating brainstem coincidence detector neurons. *Journal of Neuroscience* 34: 4914-4919.

Shu, H. J., J. Bracamontes, A. Taylor, K. Wu, M. M. Eaton, G. Akk y S. Mennerick (2012): Characteristics of concatemeric GABA_A receptors containing $\alpha 4/\delta$ subunits expressed in *Xenopus* oocytes. *British Journal of Pharmacology*, 165(7): 2228-2243.

Sieghart, W. (2014): Allosteric modulation of GABA_A Receptors via multiple drug-binding sites. *Advances in Pharmacology* 53-96.

Sieghart, W., J. Ramerstorfer, I. Sarto-Jackson, Z. Varagic y M. Ernst (2012): A novel GABA_A receptor pharmacology: drugs interacting with the $\alpha^+\beta^-$ interface. *British Journal of Pharmacology* 166: 476-485.

Sigel, E., R. Baur, G. Trube, H. Möhler y P. Malherbe (1990): The effect of subunit composition of rat brain GABA_A receptors on channel function. *Neuron* 5(5): 703-711.

Simon, J., H. Wakimoto, N. Fujita, M. Lalande y E.A. Barnard (2004): Analysis of the set of GABA_A receptor genes in the human genome. *Journal of Biological Chemistry* 279: 41422-41435.

- Simons, M. y D. A. Lyons (2013): Axonal selection and myelin sheath generation in the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology* 25: 512-519.
- Simons, M. y K-A. Nave (2015): Oligodendrocyte: myelination and axonal support. En: Barres, B. A., M. R. Freeman y B. Stevens (eds.), *Glia*. pp 189-203. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Smith, G. B. y R. W. Olsen (1995): Functional domains of GABA_A receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 16: 162-168.
- Sommer, I. y M. Schachner (1981): Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Developmental Biology* 83(2): 311-327.
- Taliani, S., B. Cosimelli, F. Da Settimo, A. M. Marini, C. La Motta, F. Simorini, S. Salerno, E. Novellino, G. Greco, S. Cosconati, L. Marinelli, F. Salvetti, G. L'Abbate, S. Trasciatti, M. Montali, B. Costa y C. Martini (2009): Identification of anxiolytic/nonsedative agents among indol-3-ylglyoxylamides acting as functionally selective agonists at the γ -aminobutyric acid-A (GABA_A) α 2 benzodiazepine receptor. *Journal of Medical Chemistry* 52: 3723-3734.
- Tanaka, Y., Y. Tozuka, T. Takata, N. Shimazu, N. Matsumura, A. Ohta y T. Hisatsune (2009): Excitatory gabaergic activation of cortical dividing glial cells. *Cerebral Cortex* 19: 2181-2195.
- Thomet, U., R. Baur, P. Scholze, W. Sieghart y E. Sigel (1999): Dual mode of stimulation by the β -carboline ZK 91085 of recombinant GABA_A receptor currents: molecular determinants affecting its action. *British Journal of Pharmacology* 127: 1231-1239.

- Tomassy, G. S., D. R. Berger, H. H. Chen, N. Kasthuri, K. J. Hayworth, A. Vercelli, H. S. Seung, J. W. Lichtman y P. Arlotta (2014): Distinct profiles of myelin distribution along single axons of pyramidal neurons in the neocortex. *Science* 344: 319-324.
- Toyama, B. H., J. N. Savas, S. K. Park, M. S. Harris, N. T. Ingolia, J. R. III Yates y M. W. Hetzer (2013): Identification of long-lived proteins reveals exceptional stability of essential cellular structures. *Cell* 154: 971-982.
- Ullén, F. (2009): Is activity regulation of late myelination a plastic mechanism in the human nervous system? *Neuron Glia Biology* 5: 29-34.
- Virchow, R. (1854): Ueber das ausgebreitete Vorkommen einer dem Nervenmark analogen substanz in den tierischen Geweben. *Virchow's Archiv Pathological Anatomy and Histology* 6: 562-572.
- Vélez-Fort M., P. P. Maldonado, A. M. Butt, E. Audinat y M. C. Angulo (2010): Postnatal switch from synaptic to extrasynaptic transmission between interneurons and NG2 cells. *Journal of Neuroscience* 30: 6921-6929.
- Vélez-Fort M., E. Audinat y M. C. Angulo (2012) Central role of GABA in neuron-glia interactions. *Neuroscientist* 18: 237-250.
- von Blankenfeld, G., J. Trotter y H. Kettenmann (1991): Expression and developmental regulation of a GABA_A receptor in cultured murine cells of the oligodendrocyte lineage. *European Journal of Neuroscience* 3(4): 310-316.
- Wake, H. P. R. Lee y R. D. Fields (2011): Control of local protein synthesis and initial events in myelination by action potentials. *Science* 333: 1647-1651.

- Walters, R. J., S. H. Hadley, K. Morris y J. Amin (2000): Benzodiazepines act on GABA_A receptors via two distinct and separable mechanisms. *Nature Neuroscience* 3(12): 1274-1281.
- Weber, W. M. (1999): Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochimica et Biophysica Acta* 1421: 213-233.
- Williamson, A. V., J. R. Mellor, A. L. Grant y A. D. Randall (1998): Properties of GABA_A receptors in cultured rat oligodendrocyte progenitor cells. *Neuropharmacology* 37: 859-873.
- Whiting, P. J., K. A. Wafford y R. M. McKernan (2000): Pharmacological subtypes of GABA_A receptors based on subunit composition, in *GABA in the Nervous System: The View at Fifty Years* (Martin D. L., Olsen R. W., eds.). Lippincott Williams & Wilkins 113-126.
- Yoon, B. y C. J. Lee (2014): GABA as a rising gliotransmitter. *Frontiers in Neural Circuits* 8(141): 1-8.
- Zonouzi, M., J. Scafidi, P. Li, B. McEllin, J. Edwards, J. L. Dupree, Ll. Harvey, D. Sun, Ch. A. Hübner, S. G. Cull-Candy, M. Farrant y V. Gallo (2015): GABAergic regulation of cerebellar NG2 cell development is altered in perinatal white matter injury. *Nature Neuroscience*: 1-9.

11. Índice de Figuras

Figura 1. Nodo de Ranvier	7
Figura 2. Receptor GABA_A	17
Figura 3. Sitios de GABA y de unión a Benzodiazepinas en el receptor GABA_A	19
Figura 4. Sitios de unión a diferentes ligandos en el receptor GABA_A	21
Figura 5. Sitio de unión de benzodiazepina en el receptor GABA_A	23
Figura 6. Cirugía de <i>Xenopus laevis</i>	32
Figura 7. Aislamiento de folículos de <i>Xenopus laevis</i>	33
Figura 8. Esquema de la técnica de control de voltaje con dos electrodos ..	34
Figura 9. Curvas dosis-respuesta a GABA de seis combinaciones de subunidades GABA_A expresadas de forma heteróloga en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i>	39
Figura 10. Sensibilidad a Zn²⁺ de seis combinaciones del receptor GABA_A expresados de forma heteróloga en ovocitos de en de <i>Xenopus laevis</i>	43
Figura 11. Curvas dosis-respuesta a Zn²⁺ de combinaciones de subunidades de GABA_AR expresada en folículos de <i>Xenopus laevis</i>	44
Figura 12. Patrón funcional y farmacológico de la combinación de subunidades $\alpha 3\beta 2\gamma 1$	47
Figura 13. Efecto de flumazenil en la respuesta a GABA del GABA_AR $\alpha 3\beta 2\gamma 1$	49
Figura 14. Bloqueo del sitio de benzodiazepinas en el receptor $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ y su efecto sobre la potenciación de β-CCB	50
Figura 15. Curva dosis-respuesta del efecto potenciador de β-CCB	51
Figura 16. Curva dosis-respuesta del efecto inhibitorio de β-CCB	52
Figura 17. Efecto modulador alostérico positivo de β-CCB en tres combinaciones diferentes de subunidades del receptor GABA_A ..	53

12. Lista de Abreviaturas

AC	Adenilato ciclasa
ATP	Adenosín trifosfato
Barbs	Barbitúricos
BZDs	Benzodiacepinas
Ca²⁺	Calcio
Cl⁻	Cloruro
cRNA	Ácido ribonucleico complementario
DMCM	Ácido carboxílico metil ester 4-etil-6,7-dimetoxi-9H-pirido
DZP	Diazepam
EM	Esclerosis Múltiple
Eto	Etomidato
EtOH	Etanol
FMZ	Flumazenil
GABA	Ácido γ -amino butírico
GABA_AR	Receptor al ácido γ -amino butírico de tipo A
GABA_BR	Receptor al ácido γ -amino butírico de tipo B
GFP	Proteína verde fluorescente
K⁺	Potasio
MBP	Proteína básica de la mielina
ME	Microscopía electrónica
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
Na⁺	Sodio
OLs	Oligodendrocitos
OPCs	Células precursora de oligodendrocitos
PLP	Proteína proteolipídica
Pro	Propofol
Pyr	Pirazoloquinolinas
RN	Ringer normal
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico

THIP	4,5,6,7-Tetrahidroisoxazolo[5,4-c]piridin-3-ol hidrocloreidrato
Zn²⁺	Zinc
β-CCB	Butil-β-carbolina-3-carboxilato