



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

**IDENTIDAD MOLECULAR Y PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS RECEPTORES**

**GABA<sub>A</sub> OLIGODENDROGLIALES**

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**M. EN C. RAINALD PABLO ORDAZ RAMOS**

DIRECTOR DE TESIS

**DR. ROGELIO ARELLANO OSTOA**

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

COMITÉ TUTOR

**DR. ATAÚLFO MARTÍNEZ TORRES**

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE**

INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Juriquilla, Santiago de Querétaro, septiembre de 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**Miembros del jurado de examen**

Dr. Francisco Rafael Fernández de Miguel      Presidente

Dr. Rogelio Arellano Ostoa      Secretario

Dr. David Erasmo García Díaz      Vocal

Dra. Tamara Luti Rosenbaum Emir      Vocal

Dr. Benjamín Florán Garduño      Vocal

**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 (UNAM), bajo la dirección del Dr. Rogelio Arellano Ostoá. Becario CONACyT No. 700811. Además, contó con los financiamientos CONACyT No. 252121; del PAPIIT-DGAPA-UNAM con los proyectos No. IN203519 y No. IN205822; así como fondos del PAEP-UNAM.**

## 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 Ostoia, mi magnífico tutor, por la gran labor de dirección académica que realizada y que hizo posible esta investigación. Además, por haber confiado en mí desde el primer día, por los sabios consejos y conocimientos brindados.

Agradezco especialmente a la Dra. Teresa Edith Garay Rojas por su apoyo técnico, los conocimientos brindados y los consejos oportunos.

Agradezco además al Dr. Ataúlfo Martínez Torres y al Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade integrantes de mi Comité Tutor, por su tiempo, sus críticas, sus valiosos comentarios y por ser piezas claves durante el desarrollo del proyecto.

A los integrantes del Jurado de examen de grado: Dr. Francisco Rafael Fernández de Miguel, Dr. David Erasmo García Díaz, Dra. Tamara Luti Rosenbaum Emir y Dr. Benjamín Florán Garduño, por servirse a leer y comentar este documento y a sus atinadas observaciones al mismo.

Además, agradezco a los integrantes del Laboratorio de Neurofisiología Celular (D14) por sus enseñanzas y por los buenos momentos dentro y fuera del laboratorio.

Agradezco el apoyo técnico de los integrantes del Laboratorio Universitario de Bioterio: MZV. José Martín García Servín, Dra. Alejandra Castilla León y Dra. María A. Carbajo Mata.

Agradezco el apoyo técnico brindado por la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos, de la Unidad de Microscopía.

Además, agradezco a las integrantes de la Unidad de Enseñanza y Posgrado: Dra. Nuri Aranda López y María del Carmen Mendoza López.

Un agradecimiento muy especial a la M. en C. Leonor Casanova Rico 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**.

## DEDICATORIAS

*A mis padres Cecilia y Pedro Pablo*

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

*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 Inés e Ibrahim*

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

*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 hermanos mexicanos: Aline, Kechu, Irma, Arturo y Chema*

*... por su amistad sincera e incondicional.*

*Al amor de mi vida Edith*

*... por compartir conmigo todo este camino y hacerlo una experiencia especial e irrepetible.*

*A Cuba.*

## RESUMEN

Los oligodendrocitos (OLs) son las células mielinizantes en el sistema nervioso central (SNC). En el linaje oligodendroglial, las células precursoras de oligodendrocitos (OPCs) son las únicas células gliales que establecen sinapsis química directa con las neuronas. Estas tienen en su membrana receptores a ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) de tipo A funcionales ( $GABA_A$ R), y su expresión es modulada por el contacto con las neuronas. Estos receptores-canal pentaméricos, permeables a aniones de  $Cl^-$  y  $HCO_3^-$ , pueden ser activados por el GABA liberado en las sinapsis por los axones o por GABA acumulado en el espacio extrasináptico. Sin embargo, la identidad molecular de los receptores no ha sido determinada. Esta falta de conocimiento ha retrasado el acceso a una mejor comprensión del papel de los  $GABA_A$ Rs en la comunicación GABAérgica entre neuronas y OLs en el contexto de la mielinización. Además, ha limitado la exploración de nuevas sustancias, que a través de los  $GABA_A$ Rs oligodendrogliales promueven la remielinización eficiente en áreas dañadas de la sustancia blanca tales como algunas  $\beta$ -carbolinas. En el presente trabajo, estudiamos el efecto potenciador diferencial de la  $\beta$ -carbolina  $\beta$ -CCB en la respuesta a GABA de OLs y neuronas. Aunado a esto demostramos que el sitio de modulación alostérica positiva para esta sustancia en el  $GABA_A$ R no correspondió con los sitios clásicos de alta y baja afinidad para diazepam (DZP). Además, mostramos que las subunidades  $GABA_A$ R  $\alpha 3$  y  $\gamma 1$  participan en la conformación del principal receptor oligodendroglial. Para esto se emplearon análisis funcionales y farmacológicos, así como de expresión génica y proteica de las subunidades  $GABA_A$ R en el linaje oligodendroglial. De manera específica, el silenciamiento de las subunidades  $\alpha 3$  y  $\gamma 1$  empleando siRNAs, cambió las características de respuesta de GABA en las OPCs, lo que indicó su participación en la conformación del receptor endógeno en estas células. Por último, encontramos que el silenciamiento de estas subunidades interfirió con la diferenciación de OPCs a OLs maduros. Este importante efecto fue reproducido al preincubar las OPCs con los bloqueadores clásicos de los  $GABA_A$ Rs: gabazina y bicuculina. En conjunto, nuestros resultados contribuyen a definir la identidad molecular y las propiedades funcionales y farmacológicas de los

GABA<sub>A</sub>R en el linaje oligodendroglial, y muestran que la función del receptor podría representar un punto de control, o "*checkpoint*", para la maduración de los OLs.

## ABSTRACT

Oligodendrocytes (OLs) are the myelinating cells in the central nervous system (CNS). In the oligodendroglial lineage, oligodendrocyte precursor cells (OPCs) are the only glial cells that establish direct chemical synapses with neurons. They have functional type A  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) receptors (GABA<sub>A</sub>R) on their membrane, and their expression is modulated by contact with neurons. These pentameric receptor-channels, permeable to Cl<sup>-</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> anions, can be activated by GABA released at synapses by axons or by GABA accumulated in the extrasynaptic space. However, the molecular identity of the receptors has not been determined. This lack of knowledge has delayed access to a better understanding of the role of GABA<sub>A</sub>Rs in GABAergic communication between neurons and OLs in the context of myelination. As well as it has limited the exploration of new substances, which through the oligodendroglial GABA<sub>A</sub>Rs promote efficient remyelination in damaged areas of the white matter, such as some  $\beta$ -carbolines. Here we studied the differential potentiating effect of  $\beta$ -CCB, a  $\beta$ -carboline, on the GABA response of OLs and neurons. Additionally, we demonstrated that the positive allosteric modulation site for this substance in the GABA<sub>A</sub>R did not correspond with the classic sites of high and low affinity for diazepam (DZP). Furthermore, we show that GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 3 and  $\gamma$ 1 subunits participate in the conformation of the main oligodendroglial receptor. For this, functional and pharmacological analyzes were used, as well as gene and protein expression of GABA<sub>A</sub>R subunits in the oligodendroglial lineage. Specifically, the silencing of the  $\alpha$ 3 and  $\gamma$ 1 subunits using siRNAs changed the characteristics of the GABA response in OPCs, which indicated their participation in the conformation of the endogenous receptor in these cells. Finally, we found that silencing of these subunits interfered with the differentiation of OPCs to mature OLs. This important effect was reproduced by preincubating the OPCs with the classic GABA<sub>A</sub>R blockers: gabazine and bicuculline. Taken together, our results contribute to define the molecular identity and functional and pharmacological properties of GABA<sub>A</sub>Rs in the oligodendroglial lineage and show that receptor function could represent a checkpoint for OLs maturation.

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iii
<b>DEDICATORIAS</b> .....	iv
<b>RESUMEN</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	4
<b>2.1 Los oligodendrocitos</b> .....	4
<b>2.2 Mielina</b> .....	9
<b>2.3 Mielinización</b> .....	12
<b>2.4 GABA y Oligodendrocitos</b> .....	17
<b>2.5 Receptores GABA de tipo A (GABA<sub>A</sub>R)</b> .....	23
<b>2.6 Moduladores alostéricos de los Receptores GABA<sub>A</sub></b> .....	28
<b>2.7 Estructura y Función de los Receptores GABA<sub>A</sub></b> .....	31
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	34
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	35
<b>5. OBJETIVOS GENERALES</b> .....	36
<b>6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	37
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	38
<b>7.1 Cultivos primarios de OPCs y neuronas corticales de ratas neonatas</b> .....	38
<b>7.2 Inmunocitoquímica</b> .....	41
<b>7.3 Silenciamiento con siRNAs</b> .....	44
<b>7.4 Fijación de voltaje con un electrodo (<i>patch-clamp</i>)</b> .....	46
<b>7.5 Determinación de la expresión génica por reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), clonación y mutagénesis sitio-dirigida de subunidades GABA<sub>A</sub></b> .....	48
<b>7.6 Expresión heteróloga funcional en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i></b> .....	50
<b>7.7 Análisis estadístico</b> .....	55
<b>8. RESULTADOS</b> .....	56
<b>8.1 Caracterización del efecto de la β-CCB sobre el GABA<sub>A</sub>R endógeno y el expresado heterológamente (α3β2γ1)</b> .....	56
<b>8.1.1 Efecto de β-carbolinas en la respuesta a GABA endógena de oligodendrocitos y neuronas</b> .....	56
<b>7.1.2 Efecto de β-CCB sobre la respuesta a GABA del receptor GABA<sub>A</sub> α3β2γ1</b> .....	60

<b>7.2 Efecto de la disminución de la expresión de subunidades específicas del GABA<sub>A</sub>R oligodendroglial sobre la respuesta a GABA en OPCs .....</b>	<b>65</b>
7.2.1 Cultivo mixto de células gliales .....	66
7.2.2 Caracterización de las OPCs aisladas.....	69
7.2.3 Respuesta a GABA de OPCs mantenidas <i>in vitro</i> .....	74
7.2.4 Silenciamiento específico de las subunidades GABA <sub>A</sub> R endógenas $\alpha 3$ ó $\gamma 1$ en OPCs.....	81
7.2.5 La expresión de la subunidad $\alpha 2$ del GABA <sub>A</sub> R en las OPCs.....	87
7.2.6 Proteínas de andamiaje y las subunidades GABA <sub>A</sub> R $\alpha 2$ y $\alpha 3$ en oligodendrocitos en condiciones <i>in vitro</i> .....	89
<b>7.3 Efecto de la disminución de la expresión de subunidades específicas del GABA<sub>A</sub>R oligodendroglial sobre la maduración del linaje oligodendroglial .....</b>	<b>94</b>
7.3.1 Maduración de OPCs en cultivo.....	94
7.3.2 Efecto de la interferencia de las subunidades $\alpha 3$ ó $\gamma 1$ sobre la maduración de OPCs en cultivo .....	96
7.3.3 Detección y cuantificación de GABA en el medio de cultivo .....	104
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>108</b>
8.1 $\beta$ -carbolinas y su efecto en la respuesta a GABA en OLs y neuronas.....	109
8.2 Participación de las subunidades $\alpha 3$ y $\gamma 1$ en la respuesta a GABA oligodendroglial .....	112
8.3 El receptor GABA <sub>A</sub> y la diferenciación de las células del linaje oligodendroglial ..	120
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>124</b>
<b>10. ANEXOS .....</b>	<b>125</b>
10.1 Anexo I. Liberación de GABA en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i> .....	125
10.1.1 Introducción .....	125
10.1.2 Resultados.....	126
10.1.3 Conclusión .....	129
10.2 Anexo II.....	130
10.3 Anexo III.....	131
<b>11. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>132</b>
<b>12. ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>168</b>
<b>13. LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>172</b>

## 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 de mielina que se interrumpe en intervalos regulares conocidos como nodos de Ranvier. La composición y estructura de la vaina de mielina tiene varias consecuencias, como el aumento de la velocidad de conducción del potencial de acción (Kettenmann & Ransom, 2013) y el soporte trófico y metabólico de las neuronas mielinizadas (Nave & Trapp, 2008; Philips & Rothstein, 2017).

El proceso de mielinización, su mantenimiento, y su plasticidad, tienen lugar en un entorno de estrecha comunicación entre los oligodendrocitos y las neuronas. Una clara 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; Wake et al., 2011; Ortiz et al., 2019), e implica un mecanismo de plasticidad del SNC (Maas & Angulo, 2021). Entre las moléculas mediadoras en la intercomunicación neurona-OLs se han propuesto al ATP (Welsh & Kucenas, 2018), al glutamato (Chen et al., 2018; Gautier et al., 2015); la adenosina (Stevens et al., 2002; Shen et al., 2018; Fontenas et al., 2019) y el GABA (Arellano et al., 2016; Hamilton et al., 2017; Serrano-Regal et al., 2020; Serrano-Regal et al., 2020; Vélez-Fort et al., 2012; Williamson et al., 1998; Zonouzi et al., 2015). Por ejemplo, recientemente se ha demostrado que neuronas y células oligodendrogiales se comunican bidireccionalmente y las primeras liberan neurotransmisores que encuentran sus blancos en la membrana de los OLs. La activación de estos receptores provoca que los OLs promuevan la liberación de nanovesículas (exosomas) que contienen diversas proteínas, factores metabólicos, mRNA, miRNA, las cuales son endocitadas y utilizadas por las neuronas y la microglía (Frühbeis et al., 2013; Goncalves et al., 2019).

Es bien conocido que el linaje oligodendrogial expresa diversos tipos de receptores a varios transmisores, que presumiblemente regulan procesos fisiológicos del linaje oligodendrogial, tales como la proliferación, la migración, la diferenciación y, por

supuesto, el proceso de la mielinización *per se* (Larson et al., 2016). Entre las moléculas estudiadas se encuentran los receptores a GABA tipo A (GABA<sub>A</sub>R) (Arellano et al., 2016; Cisneros-Mejorado et al., 2020; Habermacher et al., 2019; Reyes-Haro et al., 2021; Serrano-Regal et al., 2020).

Existen al menos cuatro trabajos previos sobre las características del GABA<sub>A</sub>R expresado en diferentes preparaciones de células precursoras de oligodendrocitos (OPCs) y OLs (von Blankenfeld et al., 1991; Bronstein et al., 1998; Williamson et al., 1998; Arellano et al., 2016). Pero no existe información suficiente para definir sin ambigüedades la composición del principal receptor en el linaje oligodendroglial. Sin embargo, la información parece ser clara en el sentido de que este representa un GABA<sub>A</sub>R con una identidad molecular diferente a la de los expresados en otras células neurales (Arellano et al., 2016). La determinación de las subunidades que lo componen y la identificación de posibles sustancias que modulan de manera específica estos nuevos receptores, permitiría obtener herramientas moleculares para su manipulación experimental y su control genético. Esto hará posible, la exploración de sus funciones durante la diferenciación de los OLs a partir de las OPCs y la importante etapa de mielinización.

Ha sido propuesto a través de estudios funcionales que el receptor GABA<sub>A</sub> expresado en oligodendrocitos es un nuevo subtipo formado por una combinación de las subunidades  $\alpha 3 / \beta 2$  ó  $\beta 3 / \gamma 1$  ó  $\gamma 3$  (Arellano et al., 2016). La participación de estas subunidades es apoyado por el análisis transcriptómico en células oligodendrogliales (Larson et al., 2016; Ordaz et al., 2021). Más recientemente, utilizando un modelo de expresión heteróloga de las cinco subunidades propuestas y clonadas de los OLs, se demostró que la combinación  $\alpha 3 \beta 2 \gamma 1$  reproduce funcionalmente la mayoría de las características observadas en los receptores endógenos (Ordaz, 2017). Es necesario confirmar lo descrito hasta ahora analizando la participación de las subunidades propuestas de manera directa, influyendo sobre su expresión de manera específica. Para lograr esto, se requiere de confirmar directamente la expresión de las subunidades que conforman el receptor oligodendroglial, y estudiar las consecuencias de su silenciamiento específico.

Aunado a esto, es esencial la exploración de sustancias, que a través de los GABA<sub>A</sub>Rs oligodendrogiales promuevan la remielinización de la sustancia blanca, tales como algunas  $\beta$ -carbolinas. Nuestro grupo demostró que la  $\beta$ -carbolina  $\beta$ -CCB acelera la remielinización en un modelo de desmielinización-remielinización, monitoreado longitudinalmente mediante imagenología por resonancia magnética e histología (Cisneros-Mejorado et al., 2020).

Esta información, sin duda, permitirá avanzar en el estudio de la posible participación de los GABA<sub>A</sub>Rs en la diferenciación de las células oligodendrogiales, así como en el proceso de mielinización y de sus mecanismos. El presente proyecto de investigación plantea la siguiente línea de análisis: explorar el efecto de diferentes  $\beta$ -carbolinas sobre la respuesta a GABA en oligodendrocitos y neuronas, estudiar el efecto de la inhibición de la expresión de las subunidades  $\alpha 3$  y  $\gamma 1$  sobre la expresión y/o función de los receptores GABA<sub>A</sub> en el linaje oligodendrogial, y explorar las consecuencias de este silenciamiento en procesos de diferenciación del linaje oligodendrogial.

## 2. ANTECEDENTES

Las funciones neuronales en el SNC requieren de la participación de las células neurogliales, a tal grado que la evolución de los sistemas nerviosos complejos no hubiera ocurrido, tal y como los conocemos, sin la participación de las funciones que llevan a cabo estas células. 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 y consolidación de las redes neuronales, en la sinaptogénesis, mantienen la homeostasis y las funciones metabólicas neuronales, a la vez que protegen al sistema de posibles agentes patógenos (Allen & Lyons, 2018; Jäkel & Dimou, 2017). 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), éstos son generados en el desarrollo a partir de células madre progenitoras del ectodermo neuronal periventricular, las cuales se dividen asimétricamente y dan lugar a las células progenitoras de oligodendrocitos (OPCs). El término oligodendrocito etimológicamente significa glía poco ramificada. Estas células han sido objeto de gran interés desde su descubrimiento (del Río Hortega, 1921; Raff et al., 1983). El conocimiento de sus características es fundamental para comprender aspectos relacionados con el control de la generación de mielina, y de la etiología de enfermedades desmielinizantes y para desarrollar protocolos clínicos que promuevan la reparación de daños en el SNC.

Los OLs mielinizantes transitan por diferentes estadios de diferenciación desde su etapa de célula precursora. Cada uno de estos estadios expresan marcadores moleculares específicos. Del Río Hortega (1921) clasificó a los OLs mielinizantes (o maduros) en cuatro tipos (I, II, III y IV), basado fundamentalmente en sus características morfológicas, tales como 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 su distribución en el SNC (Fig. 1A y 1B).

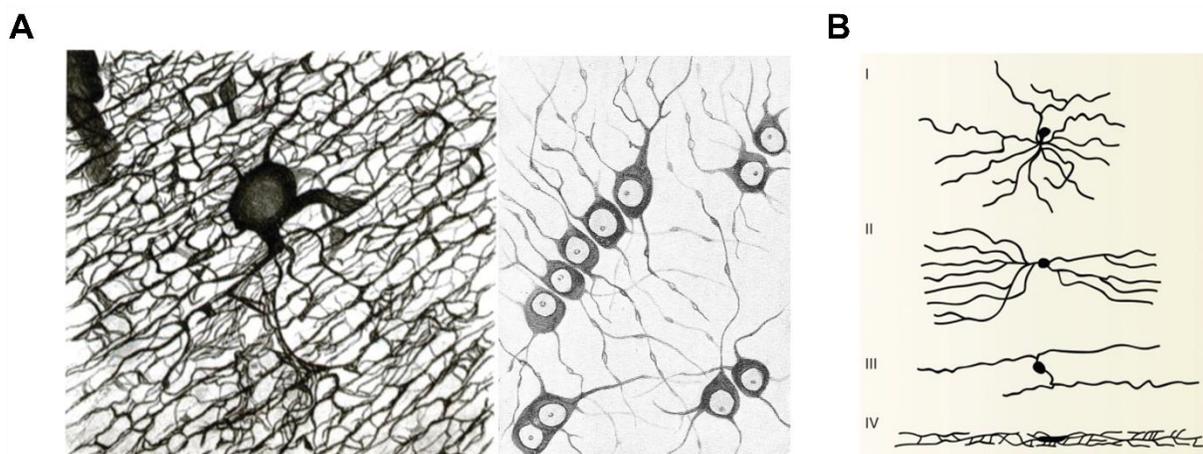


Figura 1. **Oligodendrocitos.** (A) Dibujos originales de Pío del Río Hortega donde se ilustra la morfología de los oligodendrocitos. (B) Lo cuatro tipos morfológicos de oligodendrocitos descritos por del Río Hortega. (Imágenes modificadas de Sierra et al., 2016; Simons & Nave, 2016).

Los oligodendrocitos con fenotipo I y II tienen un soma pequeño y redondeado (entre 10 y 12  $\mu\text{m}$ ), del que se proyectan cuatro y cinco procesos primarios cuyas ramificaciones mielinizan entre 10 y 30 axones de pequeño calibre (menos de 2  $\mu\text{m}$ ). Estos fenotipos son los más estudiados, y conforman la mayor población en la sustancia blanca. Ambos fenotipos se pueden distinguir por la orientación de los axones que mielinizan. Los de tipo I, se asocian a axones que se extienden en diferentes direcciones con una distribución aleatoria; los de tipo II mielinizan axones con orientación paralela, ubicados muy cerca del soma de los OLs (Butt et al., 1998). En el ratón, los OLs de tipo I se han localizado en regiones como la corteza frontal y el hipocampo. La distancia internodal en estas regiones es de entre 10 a 50  $\mu\text{m}$ . Los OLs de tipo II se han encontrado en otras regiones corticales, el nervio óptico, el cerebelo y la médula espinal. La distancia internodal es mayor y está en el rango de 50 a 350  $\mu\text{m}$ .

Por su parte los OLs de tipo III se localizan en áreas donde los axones tienen un diámetro superior a 4  $\mu\text{m}$ , 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  $\mu\text{m}$  y mielinizan axones con diámetros entre 4 y 15  $\mu\text{m}$ , presentando una distancia internodal cercana a 400  $\mu\text{m}$ . Finalmente, los oligodendrocitos de tipo IV se asocian a tractos con axones con un calibre superior a 10  $\mu\text{m}$ . Generalmente cada OLs mieliniza a un sólo axón, con una distancia internodal superior a 1000  $\mu\text{m}$  (Butt, 2013).

Utilizando herramientas modernas a nivel molecular, han sido identificadas 13 poblaciones de células que representan un continuo en el proceso de maduración de las OPCs a OLs maduros (Marques et al., 2016). El estudio fue realizado analizando el transcriptoma de 5072 células que expresaban marcadores del linaje oligodendroglial. Las células fueron aisladas de diez regiones diferentes del SNC de ratones de diferentes edades y muestran que la diferenciación inicial de los OLs es semejante en todo el SNC. Sin embargo, la maduración de diferentes subtipos de OLs ocurre en regiones específicas en distintas etapas postnatales. De manera particular, los OLs que expresan el marcador ITPR2 están implicados en la mielinización rápida, por lo que pueden ser relevantes en procesos de remielinización.

Una alta proporción de las células llamadas NG2<sup>+</sup>, que expresan en su superficie el proteoglicano NG2, corresponden con OPCs (Huang et al., 2019). 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  $\alpha$  del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR $\alpha$ ). La expresión de ambos es rápidamente regulada a la baja cuando las OPCs comienzan a diferenciarse 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 y Richardson, 2015). En resumen, los OLs conforman un linaje celular donde sus células pasan por diferentes estadios de diferenciación hasta convertirse en células mielinizantes, muchos de estos estadios pueden ser identificados por la expresión de marcadores celulares específicos (Barateiro & Fernandes, 2014; Spitzer et al., 2019).

Una batería de sondas permite identificar el estadio de las células del linaje oligodendroglial. Por ejemplo, las OPCs pueden ser identificadas por su perfil de expresión  $Olig2^+$  y  $NG2^+$ , las células  $NG2^+$ , que son células proliferantes también pueden ser identificadas por la expresión del marcador de ciclo celular Ki67 ( $Ki67^+$ ), mientras que los oligodendrocitos maduros, que son células postmitóticas, expresan CC1 (células  $CC1^+$ ) (Zonouzi et al., 2015) (Fig. 2).

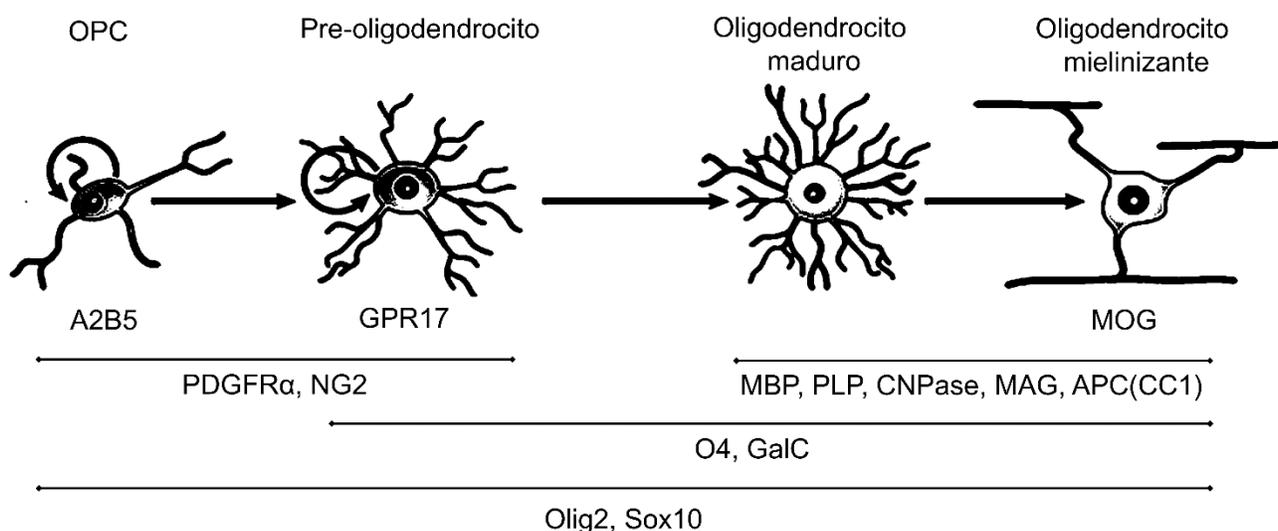


Figura 2. **Linaje oligodendroglial.** Representación esquemática de los estadios de desarrollo del linaje oligodendroglial. Además, se indican los marcadores moleculares específicos de estadio de diferenciación. Las líneas rectas señalan los estadios en los que se expresan los marcadores escritos debajo de cada una. Las flechas curvas de los estadios OPC y Pre-oligodendrocito hacen alusión a que son células con capacidad de proliferación. (Modificado de Barateiro & Fernandes, 2014; Traiffort et al., 2016).

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 los procesos, disminuyendo en las zonas de mielina compacta (Lappe-Siefke et al., 2003).

Las OPCs tienen una morfología bipolar, son proliferativas, y en el desarrollo migran hasta alcanzar su ubicación final en el SNC. Tanto en el prosencéfalo como en la médula espinal las OPCs tienen inicialmente un origen ventral. Más tarde, aunque en

menor cantidad, se derivan de zonas dorsales. Recientemente, se ha reportado información más detallada sobre el origen de las OPCs en diferentes zonas germinales en el cerebro de roedores. El mapeo de destino empleando la técnica de Cre/Lox durante el desarrollo del cerebro anterior del ratón ha demostrado que las OPCs se originan a partir de tres ondas de generación en distintas áreas periventriculares siguiendo una progresión temporal ventro-dorsal (Kessarlis et al., 2006; Guo et al., 2021). La primera ola consiste en OPCs que provienen de precursores de dos sitios germinales: de la eminencia ganglionar medial (MGE) de células que expresan el factor de transcripción Nkx2.1, y del área preóptica embrionaria (POA) de células que expresan los factores de transcripción Nkx2.1 y Dbx1 alrededor del día embrionario 12.5 (E12.5), y que comienzan a migrar hacia el palio dorsal alrededor de E14.5. Posteriormente, se comienza a producir una segunda ola de OPCs en E14.5 desde la eminencia ganglionar lateral (LGE) y caudal (CGE) del cerebro, a partir de precursores que expresan Gsh2 y migran a regiones ubicadas dorsalmente. Finalmente, una tercera ola migratoria de OPCs derivadas de precursores que expresan Emx1 surge de la región del paleo dorsal en etapas perinatales en ratones. Aunque inicialmente se propuso que esta onda dorsal de OPC se produce de forma posnatal (Kessarlis et al., 2006; van Tilborg et al., 2018), un estudio reciente evidencia que comienza a generarse en E17.5 (Winkler et al., 2018).

El desarrollo de OLs en otras partes del cerebro, como son el diencéfalo y el cerebelo está aún en discusión. De manera importante, una población de OPCs persiste en el cerebro adulto, constituyendo el principal tipo celular proliferativo que origina oligodendrocitos mielinizantes. Ante daños patológicos ocasionados a la mielina además de ser células precursoras de OLs, estas OPCs parecen ser progenitoras multipotentes capaces de generar neuronas y a astrocitos (Kang et al., 2010; Nishiyama et al., 2009). Además, se plantea que el mantenimiento de dicha población celular en el SNC en adultos, permite monitorear localmente el estado de la mielinización y responder de manera inmediata ante daños desmielinizantes o ante demandas fisiológicas de mielina (Bergles & Richardson, 2015).

La diferenciación a OLs maduros es regulada por hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores, péptidos, factores humorales, por la actividad eléctrica axonal.

## 2.2 Mielina

Una de las interacciones neurona-glia más importantes en extensión y consecuencias funcionales se da cuando las células gliales envuelven a proyecciones neuronales de los vertebrados. Esta envoltura, conocida como vaina de mielina, fue descubierta y nombrada por el investigador alemán Rudolf Virchow (1854).

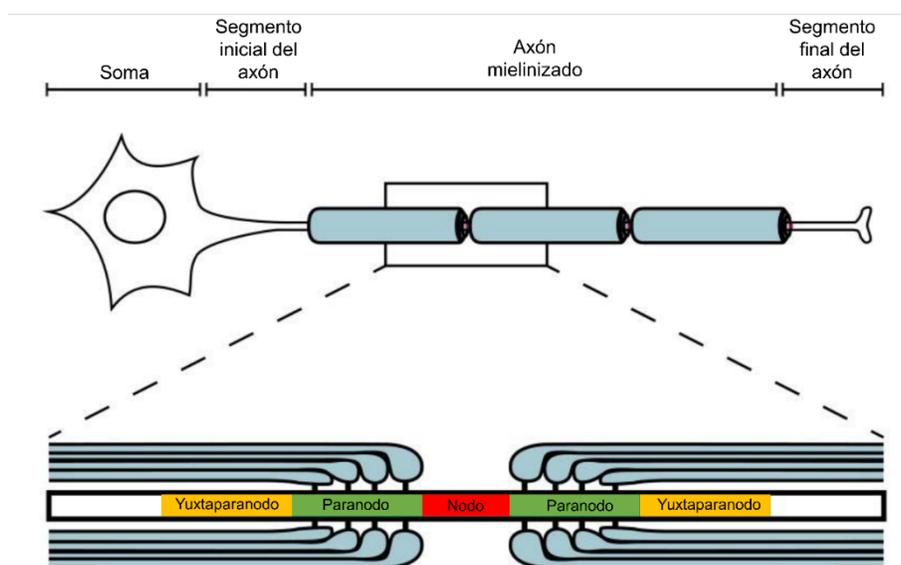


Figura 3. **Nodo de Ranvier.** En la figura se muestran los segmentos principales neuronales y se amplifica la región de un nodo de Ranvier en el axón mielinizado. Se identifican tres zonas principales de esta estructura: yuxtaparanodo, paranodo y nodo, señaladas con los colores amarillo, verde y rojo, respectivamente. (Modificado de Arancibia-Carcamo & Attwell, 2014).

El refinamiento de las técnicas de microscopía electrónica (ME) y los estudios bioquímicos, así como el empleo de animales transgénicos, han permitido conocer la arquitectura molecular de la vaina de mielina (Simons & Nave, 2016). Los primeros estudios de ME sobre la mielina empleaban tejidos deshidratados y fijados con glutaraldehído, con la desventaja de que este procedimiento colapsa los espacios

intracelulares. Sin embargo, la fijación en frío con alta presión preserva la arquitectura de los tejidos y permite detallar los espacios citoplasmáticos oligodendrogliales en las áreas mielinizadas (Möbius et al., 2010).

La mielina es un conjunto de capas de membrana, con un arreglo periódico, en el que se alternan zonas electrodensas con zonas electrolúcidas que envuelven a los axones a modo de vaina. En los nodos de Ranvier, que son zonas axonales desprovistas de mielina, existe una alta densidad de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje (Fig. 3 y 4). La mielina permite que la velocidad de conducción del potencial de acción sea varias veces más rápida comparada a 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. 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

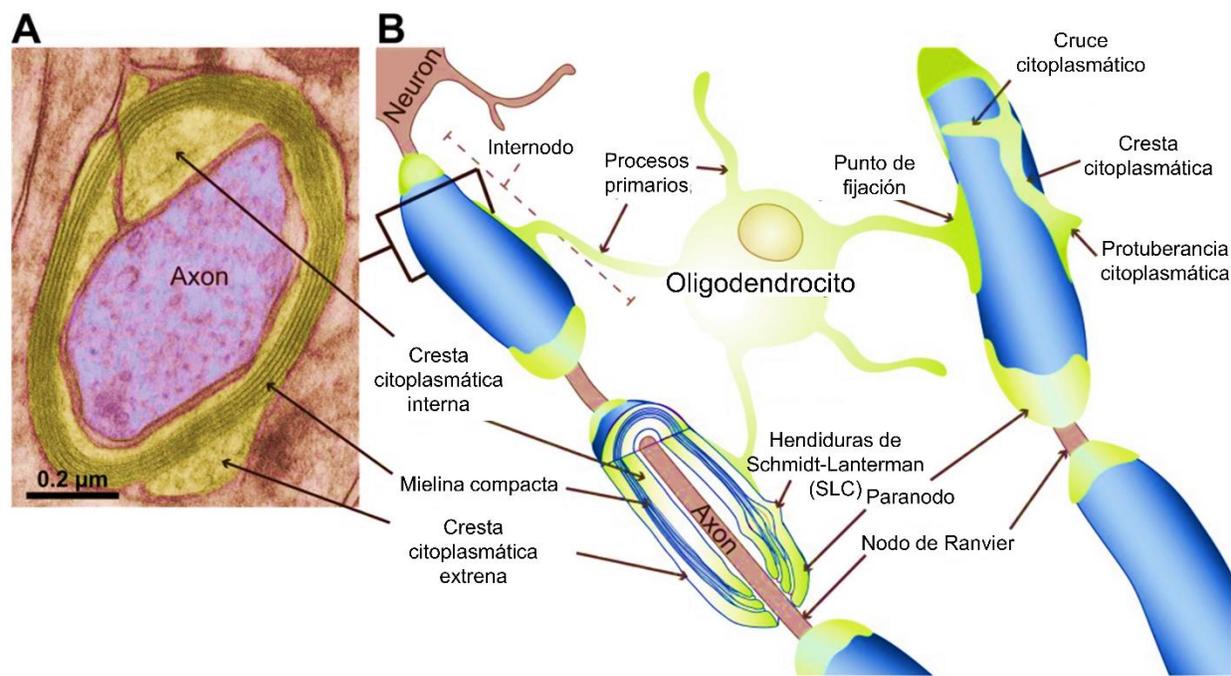


Figura 4. **Oligodendrocito mielinizante y la estructura de la mielina.** Los oligodendrocitos mielinizantes tienen un cuerpo celular, procesos primarios y la vaina de mielina. El segmento mielinizado del axón se llama internodo. La membrana plasmática, que se envuelve para formar la mielina compacta, tiene bordes que corren a lo largo de la zona interna (adaxonal) y externa (abaxonal) de la vaina de

mielina, y se conocen como crestas citoplasmáticas interna y externa. Esto se puede ver en (A) una micrografía electrónica de una sección transversal de un axón mielinizado y (B) la caricatura. Las membranas de mielina están menos densamente envueltas en los paranodos, que flanquean los nodos de Ranvier. Los paranodos y las crestas citoplasmáticas de la vaina de mielina se pueden identificar con un marcador citoplasmático (color verde). La vaina de mielina contiene áreas de mielina menos compacta, las denominadas hendiduras o incisuras de Schmidt-Lanterman (SLC), que forman protuberancias. (Modificado de Rinholm et al., 2016).

---

conducción del potencial de acción en los axones mielinizados (e.g. Ford et al., 2015; Seidl et al., 2010; Ullén, 2009). Además, el grado de mielinización correlaciona con la actividad neuronal y es un fenómeno plástico. Por ejemplo, en ratas que son entrenadas a atrapar alimento, el aumento en la sustancia blanca detectado mediante análisis de imágenes de resonancia magnética, correlaciona con el aumento en la expresión de proteínas de la mielina (Sampaio-Baptista et al., 2013). También, ha sido demostrado que es necesaria la producción de nueva mielina en el SNC de ratones para la adquisición de habilidades para correr en un paradigma de rueda (McKenzie et al., 2014).

La mielina se caracteriza por tener poca hidratación (40%). Está compuesta de lípidos (70%), con altas concentraciones de colesterol y fosfolípidos. El 30% restante los aportan proteínas. La mayoría de estas moléculas son constituyentes específicos de la mielina y permiten la identificación de OLs por inmunohistoquímica. Alternativamente, sus genes permiten la expresión de proteínas reporteras fluorescentes. Por ejemplo, los lípidos de la mielina en el SNC son ricos en el glicoesfingolípido galactocerebrósido (GalC) y su derivado sulfatado, que es reconocido por el anticuerpo O4. Ambos son marcadores específicos de OLs (Sommer & Schachner, 1981).

En el SNC, la mielina tiene dos proteínas principales: la proteína básica de la mielina (MBP) y la proteína proteolípida (PLP). La primera es pequeña, con carga neta positiva. Se encuentra en la superficie citoplasmática y constituye el 30% del total de las proteínas en la mielina. La PLP es una proteína integral de membrana y es la 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 las mielinizadas de mayor calibre. Ambas proteínas parecen proporcionar estabilidad estructural a la vaina (Butt, 2013).

La glicoproteína mielínica de oligodendrocitos (MOG) y la glicoproteína asociada a la mielina (MAG) también forman parte de la mielina y se emplean para la identificación de OLs. La MAG se expresa tanto en el SNC como en el sistema nervioso periférico (SNP) mientras que la MOG es específica del SNC donde es, además, el autoantígeno diana en la desmielinización primaria en la esclerosis múltiple (EM) (Clements et al., 2003). La MAG presenta dos isoformas: la corta (S-MAG) y la larga (L-MAG). Los estudios indican que la isoforma S-MAG es esencial en la mielinización normal en el SNP, mientras que la L-MAG es funcionalmente importante en el SNC (Schachner & Bartsch, 2000). Butt (2013) ha mostrado 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<sup>+</sup>/S-MAG<sup>-</sup>), mientras que los fenotipos III y IV son CAII<sup>-</sup>/S-MAG<sup>+</sup>.

Una 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 compartimentalizada estructural y también bioquímicamente en diferentes dominios. La mayoría de los OLs generan simultáneamente de entre 20 a 60 procesos de mielinización, en estrecho contacto con las neuronas, con una distancia intermodal de entre 20 a 200  $\mu\text{m}$  y con aproximadamente 100 vueltas de membrana, con lo que se cubre un área de 5 a 50 x 10<sup>3</sup>  $\mu\text{m}^2$ . En el humano ningún otro tipo celular abarca estas dimensiones (Simons & Nave, 2016).

### **2.3 Mielinización**

La mielinización requiere de una compleja secuencia de eventos que generan una estrecha relación entre los OLs y los axones neuronales mediante la formación de la vaina de mielina. Para su mejor comprensión y estudio esta secuencia se ha dividido en los siguientes eventos: (1) proliferación y migración de las OPCs hacia y en los

tractos de sustancia blanca; (2) identificación de los axones blanco y la consecuente señalización axón-glía; (3) diferenciación de las OPCs a oligodendrocitos mielinizantes; (4) crecimiento de la membrana del OL y enrollado de los axones; (5) aumento del tráfico de componentes de la membrana; (6) compactación de la mielina y (7) formación de nodos (Emery, 2010; Freeman & Rowitch, 2013) (Fig. 5).

Como se mencionó, 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 propuesto para este control, es el establecimiento de competencia por las concentraciones 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). La activación de mecanismos de apoptosis también controla la población resultante de OLs formadores de mielina (Simons & Nave, 2016).

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 SNP donde se ha identificado que la neuregulina-1 de la membrana de los axones controla la mielinización mediada por las células de Schwann (SC) (Simons & Nave, 2016).

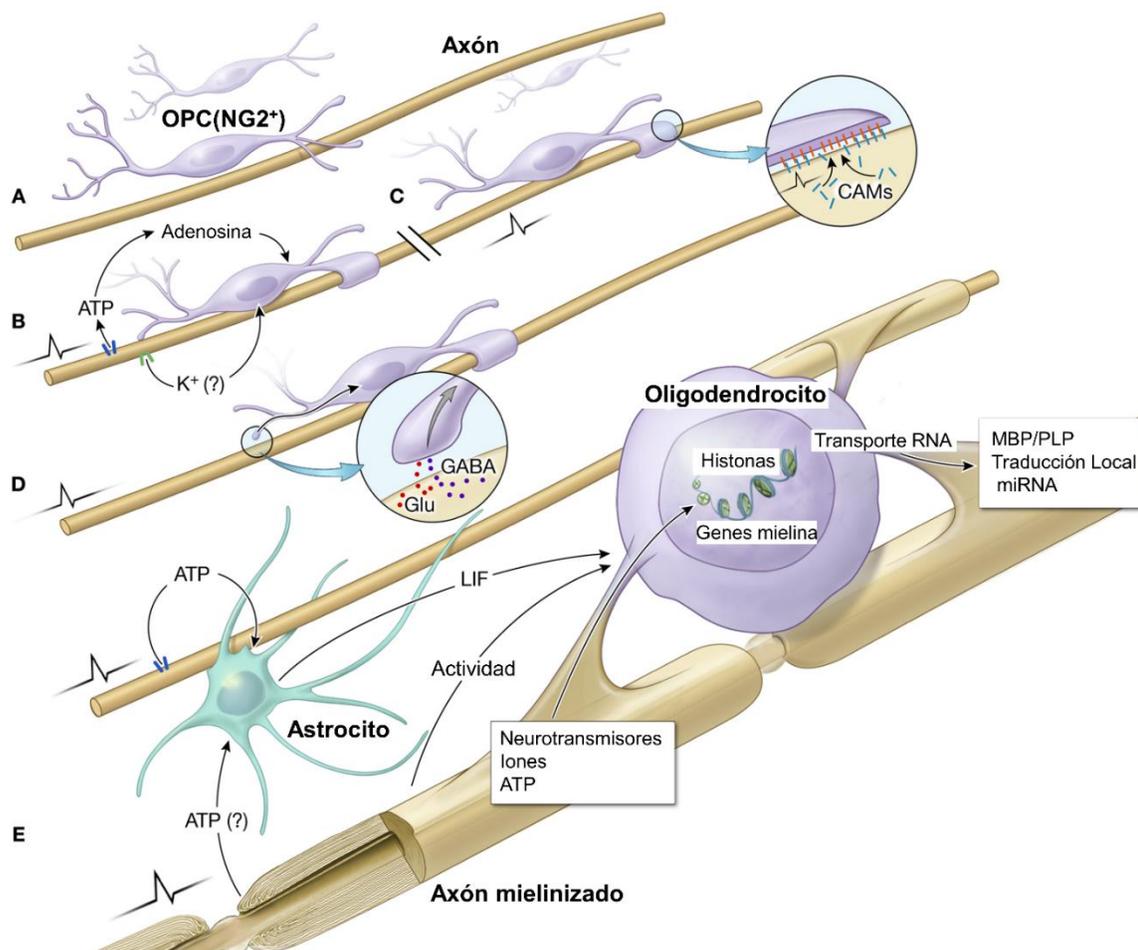


Figura 5. **La mielinización y algunos factores extrínsecos e intrínsecos que la modulan.** En el esquema se muestra el proceso de mielinización en varias etapas. (A) OPC (NG2<sup>+</sup>) en un axón no mielinizado eléctricamente silente. (B) La actividad eléctrica provoca la liberación de ATP de los axones, lo que genera adenosina que estimula la diferenciación de las OPCs. El K<sup>+</sup> que se libera de los axones eléctricamente activos puede regular la proliferación de las OPCs y la progresión del linaje oligodendrogial. (C) La actividad eléctrica también puede alterar la expresión de moléculas de adhesión celular (CAMs) en el axón que están involucradas en el inicio de la mielinización. (D) La liberación de los neurotransmisores Glu o GABA de las sinapsis formadas con las OPCs, podría proporcionar otro mecanismo para regular la mielinización en respuesta a la actividad axonal. (E) Después de que las OPCs se diferencian en oligodendrocitos, el ATP liberado de los axones que disparan potenciales de acción, estimula la síntesis y liberación de la citocina factor inhibidor de la leucemia (LIF) de los astrocitos, promoviendo la mielinización. La actividad eléctrica en los axones, a través de la liberación de neurotransmisores, iones y ATP, puede influir en la expresión génica en los oligodendrocitos mediante la

modificación de las histonas, el transporte de ARN, la traducción local y la traducción de los miRNA y por consecuencia en la mielinización. (Modificado de Lee & Fields, 2009).

---

También se sabe poco acerca de qué determina la selección de los axones a mielinizar. Algunos investigadores plantean que requiere del reconocimiento de moléculas de adhesión específicas expresadas en la membrana de los axones (Simons & Lyons, 2013). Otros apuntan a que las dimensiones del axón son suficientes para determinar este proceso. Un ejemplo de esto es la mielinización de fibras sintéticas por OLs cultivados, lo que sugiere que no son requeridas moléculas de adhesión o factores de crecimiento para iniciar la formación de mielina (Lee et al., 2012). En dichos experimentos el calibre de 400 nm de las fibras es muy cercano al umbral en el que los OLs mielinizan a los axones, sin embargo, la mielina generada muestra deficiencias estructurales que indican requerimientos moduladores extrínsecos para su correcto ensamblaje y función.

Así, a pesar de que existe un programa intrínseco de mielinización, existe también un control extrínseco que determina la mielinización diferencial de fibras axónicas en todo el SNC (Fig. 5). Por ejemplo, las neuronas del núcleo coclear que intervienen en la detección de la fuente sonora emiten un único axón que se bifurca en una rama ipsilateral y una contralateral. Existe una velocidad de propagación diferencial del impulso nervioso en cada rama que permite que la información que viaja por ellas coincida en el tiempo y sea integrada eficientemente. Esta diferenciación entre las ramas, se debe al menos en parte, a diferencias en las características de la mielina promovidas por la interacción local de los segmentos axonales con los OLs (Seidl et al., 2014).

Las evidencias experimentales indican que las neuronas eléctricamente activas estimulan la proliferación de las OPCs e inducen la mielinización selectiva de 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). Además, ha generado gran interés el tratar de utilizar como una estrategia de la mielina en

patologías desmielinizantes, la capacidad de la actividad neuronal para controlar la mielinización. Los estudios preclínicos indican que la estimulación con un paradigma adecuado, de la actividad neuronal en áreas desmielinizadas mejora la remielinización (Maas & Angulo, 2021).

La mielinización, implica la participación de varias vías de señalización intracelular en los OLs. De hecho, algunas de esas vías son comunes en el SNC y el SNP. Por ejemplo, la unión de las nurregulinas (NRG) a los receptores ErbB activa una secuencia de vías intracelulares canónicas río abajo de receptores tirosin-quinasa (RTK), como la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)/Akt que es el blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR), o proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK; Newbern & Birchmeier, 2010). El monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) induce la diferenciación celular y la mielinización, lo que requiere de la participación de la proteína de unión al elemento de respuesta cAMP (CREB). La CREB media la estimulación de la expresión de MBP por cAMP en OLs (Afshari et al., 2001). Las cinasas de la familia Src (SFK) son tirosina cinasas no receptoras que integran señales externas de los receptores de integrina y factor de crecimiento y transducen señales relacionadas con el desarrollo y la mielinización de OLs (Colognato et al., 2004; Melfi et al., 2017). En particular, las vías de señalización río abajo del miembro de la familia Src/Fyn regulan la diferenciación morfológica de los OLs, el reclutamiento de componentes del citoesqueleto y la traducción local de MBP (Quintela-López et al., 2019; White & Krämer-Albers, 2014).

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 cols. (1998) demostraron que la pérdida de la mielina, inducida por la ausencia de proteínas mielínicas específicas, provocaba degradación axonal y muerte neuronal. Lo que evidencia la función de apoyo metabólico y trófico de los OLs a los axones (Saab et al., 2016).

Los OLs son capaces de liberar exosomas (nanovesículas de 40 a 120 nm de diámetro) (Krämer-Albers et al., 2007). Dichas nanovesículas, 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 este estudio, las nanovesículas pudieron ser liberadas por la activación de receptores ionotrópicos glutamatérgicos tipo AMPA y NMDA oligodendrogiales ante un mecanismo dependiente del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Frühbeis et al., 2013). Previamente, había sido demostrado que la actividad eléctrica neuronal provoca la liberación de ácido glutámico desde el axoplasma (ver en Emery, 2010).

La mielinización dista de ser un proceso estático, ya que muestra una 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), que muestran patrones diferenciales en los que zonas mielinizadas están separadas por extensas zonas sin mielina. El patrón de mielinización de cada neurona le confiere identidad. Se sugiere que esta es una estrategia para modular la comunicación a distancia entre grupos o circuitos neuronales.

La mielinización disfuncional en el humano tiene graves consecuencias para el sistema nervioso. Entre las enfermedades desmielinizantes más comunes encontramos las leucodistrofias, así como las secuelas producidas por isquemia durante accidentes cerebrovasculares, y la esclerosis múltiple. Tan sólo, en occidente esta última tiene una prevalencia de 1:1000 habitantes entre la población de adultos jóvenes (Bradl y Lassmann, 2013). El desarrollo de terapias clínicas novedosas que coadyuven en promover la mielinización en el SNC es un objetivo de frontera que requiere de mayor investigación básica.

## **2.4 GABA y Oligodendrocitos**

Existen varios estudios, en los que se proponen diversos neurotransmisores actuando en diferentes etapas del proceso de maduración del linaje oligodendrogial, y evidenciando un papel importante en la estrecha comunicación neurona-oligodendrocito (Barca-Mayo & Lu, 2012; Baydyuk et al., 2020).

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 estas vías de neurotransmisión se modula 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, principalmente de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> (Bergles, 2012).

En los últimos años varios trabajos han mostrado que las OPCs forman sinapsis química directa con neuronas glutamatérgicas y/o GABAérgicas en diferentes zonas del cerebro como 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; Jabs et al., 2005; Káradóttir et al., 2008; Kukley et al., 2007; Lin et al., 2005; Lin & Bergles, 2004; Müller et al., 2009; Orduz et al., 2015; Tanaka et al., 2009; Vélez-Fort et al., 2010; Zonouzi et al., 2015). Se sabe además que la expresión de los receptores y de sinapsis con neuronas puede cambiar a lo largo de la progresión del linaje oligodendroglial. Los receptores AMPA y NMDA disminuyen rápidamente su expresión en las OPCs y las sinapsis desaparecen cuando estas comienzan a diferenciarse (de Biase et al., 2010; Kukley et al., 2010).

Las células gliales expresan tanto receptores metabotrópicos como ionotrópicos a GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico). La interacción neurona-glía se postula interesante en procesos fundamentales del sistema nervioso como la actividad neuronal, diferenciación, neuroprotección y la mielinización (Arellano et al., 2016; Serrano-Regal et al., 2020; Serrano-Regal et al., 2020; Vélez-Fort et al., 2012; Yoon & Lee, 2014).

El GABA es el neurotransmisor inhibitorio de más amplia expresión en el sistema nervioso. Existen además evidencias de que el GABA participa en la señalización que rige la diferenciación y las capacidades mielinizantes de los OLs. Tanto las OPCs como los OLs maduros, expresan receptores tipo GABA<sub>B</sub> (GABA<sub>B</sub>R) (Serrano-Regal et al., 2020). Estos receptores metabotrópicos acoplados a proteína G son los encargados de mediar los efectos relativamente lentos del GABA en el SNC. De este receptor se han descrito dos isoformas el GABA<sub>B1</sub> y el GABA<sub>B2</sub> y variantes alternativas resultado del

“splicing” de GABA<sub>B1</sub> llamadas GABA<sub>B1</sub> de la A hasta la G. Cuando estos receptores tienen ubicación presináptica, reducen la liberación de neurotransmisores a través de la inhibición de los canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje. En la postsinapsis, la activación de los GABA<sub>B</sub>R 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; Raveh et al., 2015).

Luyt y cols. (2007) demostraron, mediante inmunofluorescencia, la presencia de proteínas del GABA<sub>B</sub>R 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<sub>B</sub>R) incrementa tanto la migración como la proliferación de las OPCs. Lo que sugiere que este tipo de receptores puede contribuir al proceso de maduración de los OLs. Estas evidencias han sido confirmadas recientemente por Serrano-Regal y colaboradores (2020).

Los receptores GABA<sub>A</sub> funcionales tanto en OPCs como en OLs, 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 posterior a la activación del receptor muestra un potencial de inversión cercano al potencial de equilibrio del Cl<sup>-</sup>. En neuronas maduras este movimiento de cargas tiene un efecto hiperpolarizante mientras que en las OPCs tiene un efecto despolarizante debido a dos procesos, primero, estas células mantienen una alta concentración intracelular de Cl<sup>-</sup> a través de la acción de transportadores. Segundo, a que la despolarización induce la activación de canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje e incrementa la despolarización (Kirchhoff & Kettenmann, 1992; Lin & Bergles, 2004; Tanaka et al., 2009). La respuesta a GABA en OLs aumenta la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular. Este segundo mensajero interviene en numerosos fenómenos incluida la mielinización (Baraban et al., 2018; Cesetti et al., 2012; Cheli et al., 2015, 2016; Krasnow et al., 2018; Marisca et al., 2020; Pitman & Young, 2016; Wake et al., 2015).

Vélez-Fort y colaboradores (2012) apuntan que uno de los descubrimientos más importantes de los últimos años, en el estudio de la interacción neurona-glia, fue el

realizado por el grupo de Bergles (Bergles et al., 2000; Lin & Bergles, 2004a, 2004b), quienes demuestran la existencia de sinapsis químicas funcionales entre las neuronas y las OPCs. Las primeras sinapsis GABAérgicas en OPCs fueron estudiadas en rebanadas de hipocampo de ratas juveniles (Lin & Bergles, 2004a).

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 GABAérgicas 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 (Baracskaý et al., 2002).

Estudios recientes sugieren que la señalización GABAérgica regula la proliferación y la diferenciación *in vivo* de las OPCs NG2<sup>+</sup> 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 las sinapsis GABAérgicas en estas células, a la vez que aumenta su proliferación y disminuye su capacidad de diferenciarse en OLMs mielinizantes, provocando hipomielinización del sistema. Bajo estas circunstancias hipomielinizantes, animales tratados con drogas que aumentan la disponibilidad de GABA en el espacio sináptico, como la tiagabina (un inhibidor selectivo de GAT-1, transportador de GABA) o la vigabatrina (un inhibidor de la transaminasa de GABA), disminuyen de la proliferación de las células NG2<sup>+</sup>, y aumentan el número de oligodendrocitos mielinizantes, lo cual revierte los efectos producidos por la hipoxia. Esto indica la posibilidad de desarrollar terapias que promuevan la repoblación y maduración de OLMs mielinizantes en zonas cerebrales dañadas manipulando la señalización GABAérgica neurona-oligodendrocito.

Zonouzi y colaboradores (2015) interpretaron que un desajuste en la señalización GABAérgica entre las interneuronas de la sustancia blanca y las células NG2<sup>+</sup> lleva a la hipomielinización observada, ya que previamente la literatura solo reportaba la presencia de GAT-1 en las terminales axónicas y en los procesos de los astrocitos. Sin embargo, abundando en este contexto, nuestro grupo (Fattorini et al., 2017) demostró

que el transportador GAT-1 también se expresa tanto en oligodendrocitos inmaduros como maduros. Esta información sugiere un control estricto de la concentración de GABA en el entorno de los OLs, indicando que el sistema GABAérgico podría incluir otros componentes como la de su síntesis y recaptura (Angulo et al., 2008; Rowley et al., 2012; Serrano-Regal et al., 2020).

Hamilton y cols. (2017), estudiando cultivos organotípicos de la corteza cerebral de ratones, en los que los OLs Sox10<sup>+</sup> fueron marcados con proteína verde fluorescente (GFP), encontraron que el GABA liberado de forma endógena, reduce el número de células del linaje oligodendroglial a través de la activación de receptores GABA<sub>A</sub>. Esto estuvo correlacionado con un aumento de la distancia internodal en las vainas de mielina, lo cual resulta interesante, porque este parámetro se asumía que solo dependía del diámetro de los axones (Rushton, 1951) o que era una propiedad intrínseca de los oligodendrocitos mielinizantes (Bechler et al., 2015); el estudio de Hamilton y cols. (2017), indica que esta importante propiedad en la función neuronal es también regulada a través de la señalización GABAérgica axón-OL.

La terapia con neuroesteroides es otro enfoque farmacológico para modular la actividad de GABA<sub>A</sub>R en el sistema nervioso, ya que actúan como moduladores alostéricos de estos receptores en el rango de concentración nanomolar (Lambert et al., 2009). De hecho, la progestina alopregnanolona (ALLO) aumenta la producción de proteína básica de mielina (MBP) en cortes organotípicos de cerebelo derivados de rata, un efecto que parece requerir de la activación de GABA<sub>A</sub>Rs (Ghoumari et al., 2003). Los efectos de los neuroesteroides son de especial interés en el desarrollo posnatal, ya que pueden ayudar a mitigar los trastornos del neurodesarrollo asociados con el parto prematuro (Shaw et al., 2019). ALLO, que se sintetiza principalmente en la placenta, tiene un papel importante durante el desarrollo del sistema nervioso. En los recién nacidos prematuros, la concentración de ALLO disminuye abruptamente y esta disminución se asocia con hipomielinización (Shaw et al., 2015). En este contexto, la administración experimental del análogo de ALLO, ganaxolona, como terapia de reemplazo en cobayos recién nacidos prematuramente muestra efectos positivos sobre la mielinización, a través de su interacción con los GABA<sub>A</sub>R. Esto indica que, el

reemplazo de neuroesteroides podría ser una buena opción terapéutica para mejorar la mielinización en esta condición (Shaw et al., 2019).

Un ejemplo más de como la potenciación de la señalización GABAérgica podría tener efectos en la mielinización está representado por resultados de experimentos también realizados en nuestro grupo (Cisneros-Mejorado et al., 2020). Utilizando un modelo de desmielinización y evaluando longitudinalmente la microestructura de tractos nerviosos por resonancia magnética, fue mostrado que el N-butil- $\beta$ -carbolina-3-carboxilato ( $\beta$ -CCB), un fármaco selectivo que activa preferentemente los GABA<sub>A</sub>R oligodendrogiales (Arellano et al., 2016), promueve la remielinización del pedúnculo caudal del cerebelo de rata al cual le fue inducida desmielinización por inyección focal de bromuro de etidio.

Toda esta información plantea la necesidad de un sistema de señalización GABAérgico que es mantenido durante el reconocimiento entre los axones y los OLs, y de hecho, Arellano y colaboradores (2016) demostraron que la expresión de los receptores GABA<sub>A</sub>, en la membrana de los OLs, depende de su interacción con los axones, ya que el aislamiento de los OLs y la pérdida de contacto con los axones provoca que la expresión funcional de los receptores sea regulada a la baja (Fig. 6). En este estudio también es demostrado que los receptores GABA<sub>A</sub> oligodendrogiales tienen características funcionales y farmacológicas que los distinguen de los expresados mayoritariamente en neuronas, y en astrocitos (Arellano et al., 2016); esta identidad específica es una oportunidad para lograr el control dirigido de la señalización axón-OL.

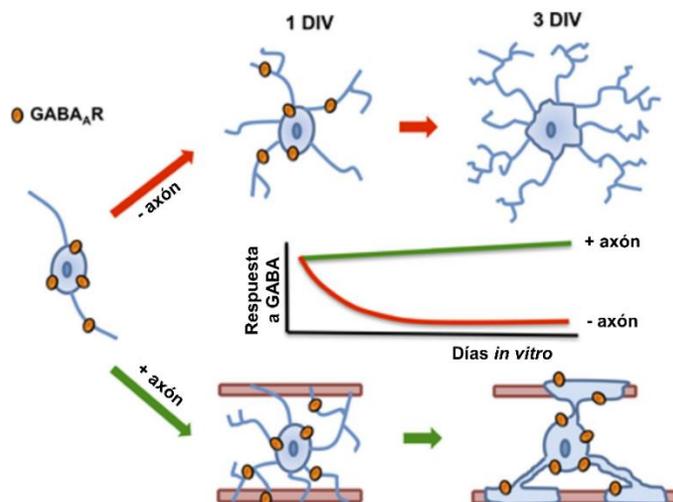


Figura 6. **La expresión de los GABA<sub>A</sub>R en oligodendrocitos (*in vitro*) depende de su contacto con las neuronas.** En el esquema se ilustra como la expresión de los receptores GABA<sub>A</sub> en los OLs depende del contacto con las neuronas, ya que cuando los OLs están aislados su respuesta electrofisiológica a GABA se pierde progresivamente (líneas de color rojo). Sin embargo, al poner en co-cultivo a estas células con neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG) la respuesta a GABA se mantienen en los OLs. (Modificado de Arellano et al., 2016).

Todos estos hallazgos sugieren que la señalización mediada por GABA<sub>A</sub>R regula los procesos de mielinización y remielinización en los OLs, ya sea de manera directa o indirecta.

## 2.5 Receptores GABA de tipo A (GABA<sub>A</sub>R)

El aminoácido GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio en el SNC de vertebrados. No se limita al SNC ya que el GABA y sus receptores también se expresan en el SNP y en sistemas no neuronales como las glándulas suprarrenales, los riñones, el hígado, el páncreas, el estómago y el intestino, los ovarios y el útero, en el esperma y tejidos de la vejiga urinaria (Erdö, 1992), así como en el sistema inmunitario (Bhat et al., 2010). El GABA se puede sintetizar a través de dos vías diferentes. Por un lado, como demostraron por primera vez (Roberts & Frankel, 1950), se sintetiza por

descarboxilación del glutamato (Glu) por la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD). Existen dos isoformas de la GAD con diferente peso molecular, la GAD65 y la GAD67, que tienen también diferentes propiedades catalíticas, cinéticas y de localización subcelular (Kaufman et al., 1991). Por otro lado, el GABA se puede producir a partir de la putrescina a través de una ruta alternativa que no involucra al ácido glutámico como intermediario (Seiler et al., 1973). En este caso, al menos en las células gliales, la putrescina primero se acetila a monoacetil putrescina y luego se degrada a GABA por la enzima monoamino oxidasa B (MAOB) (Angulo et al., 2008; Yoon et al., 2014).

La degradación de GABA ocurre a través de la GABA-transaminasa (GABA-T), que es una enzima dependiente de fosfato de piridoxal que convierte al GABA en semialdehído succínico (SSA) por transaminación con los co-sustratos glutamato y ácido  $\alpha$ -cetoglutárico ( $\alpha$ -KG). En consecuencia, la SSA es oxidada por la SSA deshidrogenasa (SSADH) a succinato, un intermediario del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) (Angulo et al., 2008; Rowley et al., 2012). La GABA-T es inhibida específicamente por vigabatrina, un fármaco antiepiléptico clínicamente activo (Golec et al., 2021; James Willmore et al., 2009; Wheless et al., 2007; Williams & French, 1999).

Los receptores GABA<sub>A</sub> (GABA<sub>A</sub>R) son canales iónicos integrales de membrana permeables a los aniones Cl<sup>-</sup> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, que median la principal forma de neurotransmisión inhibitoria rápida en el SNC (Doyon et al., 2016; Olsen & Sieghart, 2008). Pertenecen a la superfamilia de canales-receptores activados por ligando, junto con los receptores nicotínicos a acetilcolina, el receptor de glicina, los receptores a serotonina 5-HT<sub>3</sub>, y los canales iónicos activados por Zn<sup>2+</sup>; los cuales presentan un asa Cys en su dominio extracelular (Hevers & Lüddens, 1998).

Los GABA<sub>A</sub>R 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 protruyen 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 varias moléculas modificadoras (Fig. 7A).

Cada subunidad tiene un extremo amino extracelular, hidrofílico y largo, seguido de cuatro  $\alpha$ -hélices transmembranales (TM1-TM4) que están conectados por asas. El asa entre los dominios TM3 y TM4 es más largo que los demás y 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 cinco dominios TM2 forman la pared del poro del canal (Olsen & Sieghart, 2008) (Fig. 7A y 8A).

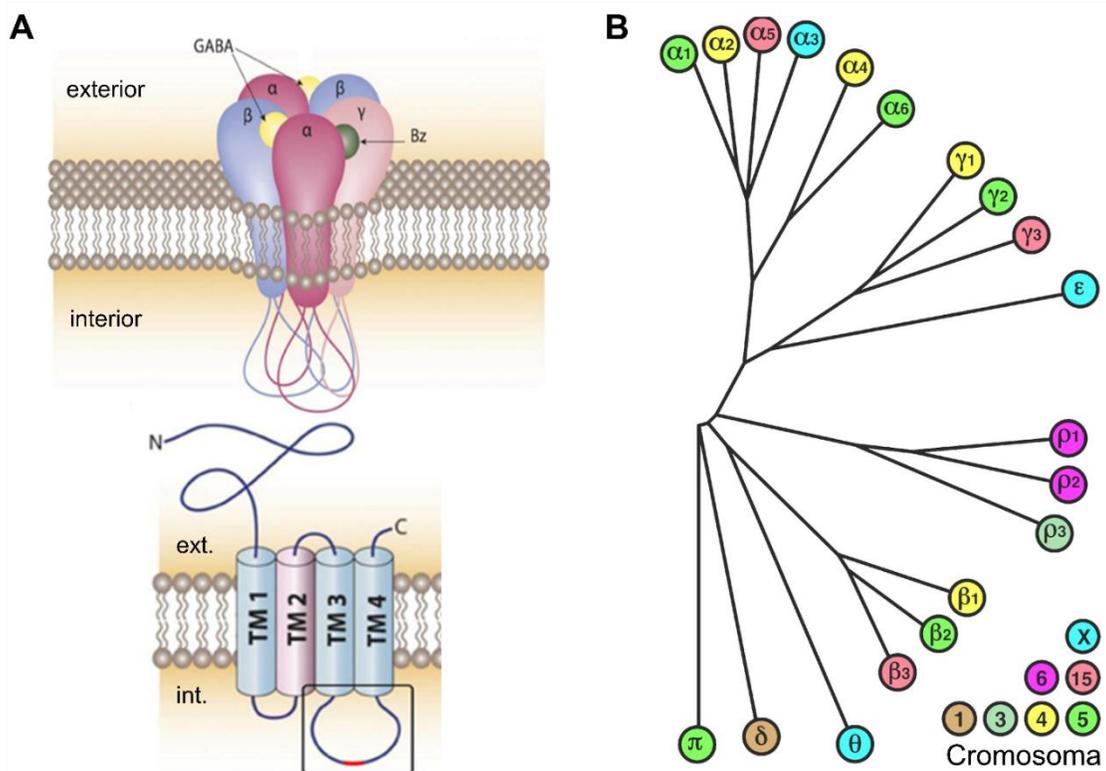


Figura 7. **Receptor-canal GABA<sub>A</sub>**. (A) En el esquema se ilustra la estructura pentamérica de los receptores GABA<sub>A</sub>. Además se indica los sitios de unión a GABA y a benzodiazepina (BZDs). También aparece representada la estructura de una subunidad de este receptor. El recuadro señala el lazo intracelular existente entre los segmentos transmembranales (TM) 3 y 4. (B) Esquema que muestra a la familia de genes codificantes y a que cromosoma pertenece cada una de las subunidades GABA<sub>A</sub>; en el caso de la familia de las subunidades  $\beta$ , recientemente se agregó la  $\beta_4$  (Sieghart & Savić, 2018). (Modificado de Sigel & Steinmann, 2012; Tretter et al., 2012).

En vertebrados se conocen 20 genes que codifican para distintas subunidades: 6  $\alpha$  ( $\alpha 1$ - $\alpha 6$ ), 4  $\beta$  ( $\beta 1$ - $\beta 4$ ), 3  $\gamma$  ( $\gamma 1$ - $\gamma 3$ ), 3  $\rho$  ( $\rho 1$ - $\rho 3$ ), y un gen para cada una de las subunidades  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  y  $\pi$  (Sieghart & Savić, 2018) (Fig. 7B). Esta diversidad predice una gama amplia de combinaciones de subunidades tanto homoméricas como heteroméricas con ubicaciones específicas en el SNC, y con funciones y características distintivas (Krall et al., 2014; Vogt, 2015). El perfil de las subunidades que forman a los GABA<sub>A</sub>Rs depende de varios factores, incluidos la región del cerebro, el tipo celular, la etapa de desarrollo del individuo, y las condiciones fisiológicas o fisiopatológicas (Levitan et al., 1988; Seeburg et al., 1990; Waldvogel & Faull, 2015).

Los GABA<sub>A</sub>R se ensamblan en el retículo endoplásmico (RE), en un proceso regulado por proteínas chaperonas clásicas. La degradación por ubiquitinación de subunidades homoméricas no ensambladas, también ocurre en este organelo (Bedford et al., 2001), y en las neuronas su regulación está modulada por la actividad a la que está sometida la célula (Saliba et al., 2007). Después de su ensamblaje en el retículo, los GABA<sub>A</sub>R son dirigidos al aparato de Golgi y distribuidos en vesículas para su transporte e inserción en la membrana plasmática. Este proceso es promovido por una variedad de proteínas asociadas a los GABA<sub>A</sub>R. En las neuronas, los GABA<sub>A</sub>R experimentan endocitosis extensa dependiente de clatrina (Kittler et al., 2000). Una vez endocitados, la mayoría de ellos se reciclan de nuevo en corto tiempo a la membrana plasmática (Jacob et al., 2008).

Los GABA<sub>A</sub>R están distribuidos de manera ubicua en el SNC, señalando su importante participación en el procesamiento de la información. Existen varias drogas psicoactivas que ejercen sus efectos moduladores uniéndose a diversos sitios sobre este tipo de receptores. De este modo, son de amplio uso en el tratamiento de enfermedades psiquiátricas tales como la ansiedad, trastorno bipolar, el alcoholismo, el insomnio, el pánico, y varias más (Hevers & Lüddens, 1998). Entre estas drogas terapéuticas se encuentran las benzodiazepinas (BZDs), los neuroesteroides, los barbitúricos y cationes de interés fisiológico como el Zn<sup>2+</sup>.

Las evidencias indican que, de manera regular, los receptores heteroméricos, ya sean recombinantes o nativos, en su estequiometría pueden estar conformados por dos subunidades  $\alpha$ , dos  $\beta$  y una  $\gamma$  (Araujo et al., 1999; Benke et al., 2004; Sarto-Jackson & Sieghart, 2008a; Verdoorn, 1994). Algunos de los sitios de unión para estas sustancias se han estudiado en GABA<sub>A</sub>R de diferentes composiciones y varios de los hallazgos han sido confirmados estructuralmente mediante estudios de cristalografía (P. S. Miller & Aricescu, 2014). Cada una de las subunidades tiene un extremo positivo (+) y otro negativo (-) (Fig. 8B). Son dos los sitios de unión a GABA y se encuentran conformados entre las interfases extracelulares de las subunidades  $\alpha/\beta+$  vecinas en el pentámero, también se ha demostrado que las BZDs se unen a un sitio específico, homólogo a los de GABA que se encuentra en la interfase extracelular de las subunidades  $\alpha/\gamma-$  (Fig 8B y 8C). Las interfases que no conforman los sitios clásicos de reconocimiento para estos agonistas, también presentan sitios de unión homólogos y se han propuesto como nuevos blancos moleculares del receptor que podría aumentar su potencial farmacológico (Sieghart et al., 2012).

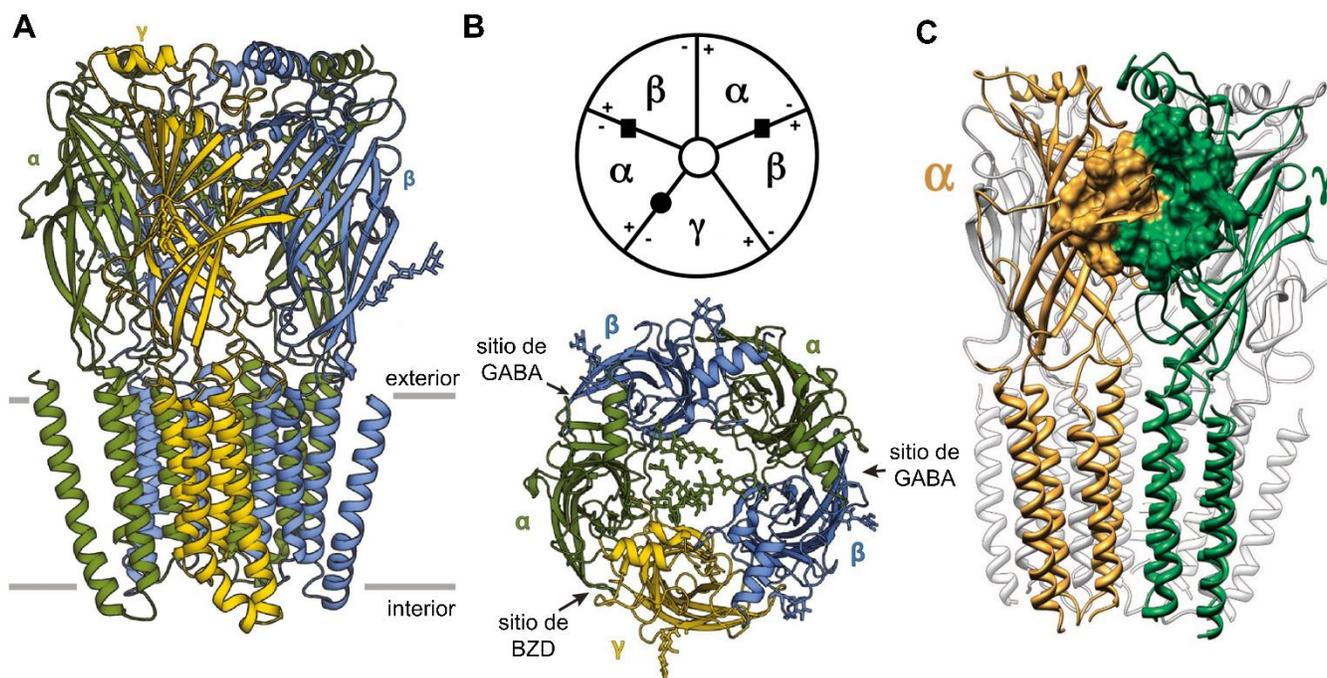


Figura 8. **Sitios de unión a GABA y BZDs en el GABA<sub>A</sub>R.** (A) Modelo *in silico* 3D que ilustra la estructura pentamérica de los receptores GABA<sub>A</sub> donde se indican en colores las subunidades que lo componen: verde ( $\alpha$ ), azul ( $\beta$ ) y amarillo ( $\gamma$ ). (B) Se muestran un esquema (en vista superior) de la polaridad de las subunidades que componen al receptor y la ubicación de los sitios de unión a GABA

(cuadros negros) y a BZD (círculo negro). Además se observa una vista superior, extracelular de (A) y se señalan los sitios de unión a GABA y a benzodiazepina (BZD). (C) Modelo *in silico* 3D, en vista lateral del sitio de unión a BZD ocupado. La cavidad del sitio se representa como una superficie en la vecindad de las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$ . (Modificado de Kim & Hibbs, 2021; Sigel & Steinmann, 2012; Taliani et al., 2009).

---

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 20 subunidades conocidas resultan en varios cientos de receptores diferentes (Olsen & Sieghart, 2008), pero muchas de estas combinaciones no son funcionales; las reglas que determinan la combinatoria molecular permanecen 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  $\rho$  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  $\alpha$  distintas, particularmente 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, y hasta hace algunos años existían controversias en aspectos importantes de su farmacología y otras características funcionales básicas que dependen de la estequiometría del pentámero. Sin embargo, el principal GABA<sub>A</sub>R oligodendroglial tiene una composición única, y representa un nuevo receptor a GABA tipo A, específico de este linaje (Arellano et al., 2016).

## 2.6 Moduladores alostéricos de los Receptores GABA<sub>A</sub>

Los GABA<sub>A</sub>Rs tienen una complejidad estructural alta y presentan una gran cantidad de sitios reguladores a diferentes drogas. Han sido identificados cientos de compuestos de diferentes características químicas que lo modulan, activan o lo inhiben. La mayoría de estas sustancias interactúan con más de un sitio de unión en los GABA<sub>A</sub>R.

La identificación de los sitios de unión para estas drogas ha sido posible mediante el uso de técnicas como la mutagénesis, la sustitución de cisteínas, la cristalografía de

rayos X, el modelaje molecular, el fotomarcage y el acoplamiento molecular (Sieghart, 2014). La existencia de todos ellos en un mismo receptor tiene como consecuencia una elevada complejidad farmacológica y funcional, ya que varias de las sustancias moduladoras son endógenas. 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.

Pero antes de entrar en el análisis de algunas de las drogas que tienen como blanco a los GABA<sub>A</sub>Rs, fundamentalmente de aquellas que se emplean en este trabajo, debemos definir qué es un modulador alostérico.

A las sustancias que, al unirse al receptor, cambian su conformación y operan su apertura, se les denomina sustancias agonistas. El sitio al que se une el agonista se le denomina ortostérico, a los demás sitios de unión se les denomina alostéricos. En contraste, se les llama sustancias antagonistas, a aquellas que, al unirse al receptor, impiden que el agonista active al canal por lo que la respuesta es inhibida. Estos efectos pueden ser mediados tanto por la unión del antagonista al sitio ortostérico como por la unión a sitios alostéricos.

Los moduladores alostéricos regulan el efecto del agonista al unirse a un sitio alostérico sobre el receptor. La unión de un modulador alostérico al GABA<sub>A</sub>R, en ausencia de un agonista, no afecta la actividad del canal. Si el efecto del modulador alostérico sobre la actividad del receptor es incrementado, a este se le denomina modulador alostérico positivo (PAM), mientras que un modulador alostérico negativo (NAM) la disminuye (Monod et al., 1965). Además, existen los llamados agonistas inversos, que en el caso específico del sitio a BZDs, son sustancias que se unen a este sitio, pero a diferencia de las BZDs inducen una respuesta farmacológica opuesta inhibiendo la actividad del GABA<sub>A</sub>R, el ejemplo clásico de esta acción son varias  $\beta$ -carbolinas actuando sobre el receptor neuronal (Lees et al., 2004).

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<sub>A</sub>Rs contienen dos subunidades  $\alpha$  y dos  $\beta$ , 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 et al., 2013) sugieren que receptores que contienen una subunidad  $\delta$  presentan un tercer sitio de unión a GABA, ya que la combinación  $\alpha 4\beta 1\delta 3$  presenta afinidad a GABA tanto en el rango micromolar como nanomolar.

Un sitio que ha sido muy bien caracterizado en este tipo de receptores es el de unión a moduladores alostéricos positivos del tipo de las benzodiazepinas (BZDs), el cual se ubica en la vecindad de las subunidades  $\alpha$  y  $\gamma$ . Las BZDs, comenzaron a ser usadas clínicamente en los años 60 del siglo pasado debido a sus importantes propiedades ansiolíticas, sedativas, anticonvulsivas y de relajación muscular, a tal punto que rápidamente se han convertido en las drogas de mayor uso psicoterapéutico (Sieghart, 2014). Entre estas sustancias se encuentra el diazepam, la benzodiazepina clásica, que actúa como agonista sobre el sitio de BZDs provocando un potente efecto alostérico potenciador de la respuesta a GABA de este tipo de receptores. En el receptor neuronal  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  a bajas concentraciones de GABA, el diazepam produce una potenciación bifásica de la respuesta del receptor, con diferentes componentes una en el rango nanomolar y otra en el micromolar de concentración, lo cual indicó la existencia de dos sitios diferentes para este modulador, el sitio de alta afinidad corresponde al sitio clásico de unión a las BZDs (Walters et al., 2000).

Existen diferentes drogas que ejercen sus efectos a través de la unión al sitio de BZDs, tal es el caso del indiplon. Esta sustancia es una pirazolopirimidina y actúa como modulador alostérico positivo de  $GABA_A$ Rs al unirse al sitio de BZDs, cuando el receptor contiene la subunidad  $\gamma 2$  (Petroski et al., 2006). Las  $\beta$ -carbolinas son otro grupo de sustancias moduladoras, en este caso han sido descritas como agonistas inversos sobre el sitio de BZDs del receptor neuronal. Estas sustancias tienen propiedades ansiogénicas y proconvulsivas entre estas encontramos a la butil- $\beta$ -carbolina-3-carboxilato ( $\beta$ -CCB), que ha sido propuesta como un modulador endógeno (Peña et al., 1986; Rigo et al., 1994).

Los  $GABA_A$ Rs también son sensibles a algunos iones, particularmente a cationes divalentes 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 (Frederickson & Bush, 2001). Los iones de  $Zn^{2+}$  inhiben a los receptores GABA de tipo A, a través de dos mecanismos, el bloqueo del canal, y mecanismos alostéricos que son dependiente de la composición estequiométrica del receptor. Cuando está presente una subunidad  $\gamma$  la sensibilidad a este catión es menor que cuando está ausente. Se sabe que la inhibición por  $Zn^{2+}$  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  $\alpha$  y  $\beta$ . De modo particular, la nula o baja sensibilidad a  $Zn^{2+}$  que presentan los receptores en cuya estructura tienen la subunidad  $\gamma$  se debe a que estas subunidades alteran dos de los tres sitios de unión de  $Zn^{2+}$  (Hosie et al., 2003).

## 2.7 Estructura y Función de los Receptores GABA<sub>A</sub>

La identidad molecular de cada receptor a GABA determina sus propiedades funcionales y farmacológicas, por ejemplo, la combinación de subunidades define el efecto que tienen sobre él los moduladores alostéricos tales como las BZDs, los barbitúricos, los esteroides, y los cationes polivalentes, así como algunas sustancias pro-convulsivantes como la bicuculina, las  $\beta$ -carbolinas, y el etanol. Sin embargo, la combinación específica también define los parámetros que identifican a cada receptor tales como las cinéticas de apertura y su desensibilización, así como su sensibilidad al GABA.

A través de estudios en los que se emplean diferentes técnicas de inmunotinción, en rebanadas de cerebro (Klausberger et al., 2002; Pirker et al., 2000), los resultados de experimentos de co-inmunoprecipitación (Pörtl et al., 2003) y 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, donde hasta ahora los GABA<sub>A</sub>Rs tampoco están por completo definidos molecularmente, Whiting y colaboradores (2000) encontraron evidencias que indican que su principal GABA<sub>A</sub>R tiene la combinación de subunidades,  $\alpha 2\beta 1\gamma 1$ , y estos son potenciados por la  $\beta$ -

carbolina llamada ácido carboxílico metil éster 4-etil-6,7-dimetoxi-9H-pirido[3,4- b]indol-3 (DMCM).

Existen al menos cuatro trabajos previos sobre las características del GABA<sub>A</sub>R en diferentes preparaciones de OPCs en condiciones *in vitro*. 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  $\beta$ -carbolina DMCM un agonista inverso en neuronas, pero que en astrocitos potencia la respuesta, mientras que en OLs de cerebro de ratones (E14-E16) la inhibe. Otra diferencia con el 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 que llevó a sugerir a los autores la participación de la subunidad  $\gamma$ 2.

En un segundo estudio, (Williamson et al., 1998) fue reportado que en las OPCs de cerebro de rata (P1-P2) los receptores son insensibles a BZDs y a DMCM, y que el EC<sub>50</sub> para GABA es de 100  $\mu$ M. Además, en un análisis de la expresión de secuencias por RT-PCR se mostró la amplificación de los mensajeros que codifican para las subunidades  $\alpha$ 2-5,  $\gamma$ 2-3, pero no de  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 6 y  $\delta$ .

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<sub>A</sub>R insensibles a diazepam, y son bloqueados por Zn<sup>2+</sup>. La determinación de las subunidades GABA expresadas por PCR muestra la amplificación de  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 4,  $\beta$ 1 y  $\delta$ . Las subunidades  $\alpha$  (1, 3, 5 y 6) así como las  $\gamma$  (1-3) no fueron detectadas.

Por último, un trabajo electrofisiológico realizado recientemente por Arellano y colaboradores (2016) en cultivos primarios de OLs del nervio óptico P11, y prosencéfalo en P0, de rata, demuestran la participación de  $\beta$ 2 ó  $\beta$ 3 pero no de las subunidades  $\gamma$ 2 y  $\delta$ , puesto que las drogas THIP (agonista sobre receptores que contienen la subunidad  $\delta$ ) e indiplon (agonista del sitio de benzodiazepinas) no tuvieron los efectos esperados, mientras que el Zn<sup>2+</sup> constituyó un potente inhibidor, indicando claramente la ausencia de la subunidad  $\gamma$ 2.

Sin embargo, la expresión de subunidades  $\gamma$  fue evidenciado por el hecho de que diazepam, una BZD clásica, provocó potenciación de la respuesta, por lo que la participación de subunidades  $\gamma 1$  ó  $\gamma 3$  son necesarias, esto también está reforzado por la observación de que las  $\beta$ -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; Hartiadi et al., 2016; Karim et al., 2013). 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  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ ,  $\beta 2$  y  $\beta 3$ , así como  $\gamma 1$  y  $\gamma 3$  (Cahoy et al., 2008; Larson et al., 2016; Ordaz et al., 2021).

El conocimiento relacionado con la identidad molecular de los receptores GABA<sub>A</sub> expresados en los OLs es una pieza fundamental para lograr su control específico, y con ello avanzar en la determinación de sus funciones en la comunicación neurona-OL, así como su posible uso como herramienta terapéutica en el tratamiento de enfermedades que atacan a la sustancia blanca en el SNC.

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El descubrimiento y estudio de las moléculas que modulan la comunicación entre los oligodendrocitos y las neuronas, es esencial para entender el funcionamiento del SNC. En esta comunicación la señalización GABAérgica juega un papel fundamental, y es por eso que la caracterización de sustancias que modulen los receptores a GABA que se expresan en la membrana de los oligodendrocitos constituye una herramienta farmacológica de mucha utilidad. Las  $\beta$ -carbolinas son un grupo sustancias endógenas que actúan sobre la respuesta a GABA de sus receptores de tipo A. El estudio de los efectos de estas sustancias en dichos receptores ionotrópicos permitiría encontrar moléculas dentro de esta familia, que regulen específicamente a los receptores expresados en la membrana de las células del linaje oligodendroglial. Los estudios más detallados sobre las características farmacológicas del receptor GABA<sub>A</sub> oligodendroglial, fueron realizados en preparaciones de OLs aislados del nervio óptico de rata, y más recientemente utilizando un modelo de expresión heteróloga de las subunidades clonadas de los OLs, en ovocitos de *Xenopus laevis*. Es por ello necesario, que lo descrito hasta ahora, pueda ser confirmado utilizando preparaciones *in situ*, y analizando la participación de las subunidades propuestas de manera directa, ya sea que se pueda influir sobre su expresión de manera específica o afectando su función utilizando moduladores específicos. Para lograr esto, se requiere de confirmar directamente la composición del receptor oligodendroglial, al mismo tiempo que se estudien las consecuencias del silenciamiento de las subunidades que lo conforman. Esta información, permitirá avanzar en el análisis de la participación del receptor GABA<sub>A</sub> en el proceso de mielinización y sus mecanismos.

Tomando en cuenta lo anterior, se plantearon las siguientes preguntas de investigación: ¿Cuál es el sitio de unión para la  $\beta$ -carbolina  $\beta$ -CCB en el GABA<sub>A</sub>R oligodendroglial? ¿Qué efecto tienen diferentes  $\beta$ -carbolinas sobre la respuesta a GABA en oligodendrocitos y neuronas? ¿Cuál es la identidad molecular del principal receptor GABA<sub>A</sub> que se expresa en los oligodendrocitos? ¿Qué funciones tiene este receptor a GABA en el linaje oligodendroglial?

#### 4. HIPÓTESIS

*El principal receptor GABA<sub>A</sub> expresado en el linaje oligodendroglial es modulado diferencialmente por las  $\beta$ -carbolinas y contiene a las subunidades  $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ . Su expresión y función son requeridos para el proceso de diferenciación hacia oligodendrocitos mielinizantes.*

## 5. OBJETIVOS GENERALES

- I. Analizar el sitio de unión de  $\beta$ -CCB y el efecto de diferentes  $\beta$ -carbolinas sobre la respuesta a GABA en oligodendrocitos y neuronas.
  
- II. Determinar los cambios provocados por el silenciamiento de las subunidades  $\alpha 3$  y  $\gamma 1$  del receptor GABA<sub>A</sub> oligodendroglial en la expresión y las características fármaco-funcionales de la respuesta a GABA en OPCs en cultivo, y sobre su proceso de diferenciación hacia oligodendrocitos maduros.

## 6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Definir la participación de los sitios de unión a BZDs en los efectos de la  $\beta$ -CCB sobre el GABA<sub>A</sub>R oligodendroglial endógeno.
- II. Analizar el efecto de varias  $\beta$ -carbolinas sobre la respuesta a GABA de oligodendrocitos y neuronas.
- III. Caracterizar por inmunocitoquímica y electrofisiología a las OPCs aisladas en cultivo primario.
- IV. Confirmar la expresión de las subunidades GABA<sub>A</sub>R propuestas en las OPCs por medio de biología molecular e inmunocitoquímica.
- V. Silenciar la expresión de las subunidades GABA<sub>A</sub>R propuestas con el uso de siRNAs específicos y evaluar su efecto sobre las características de la respuesta a GABA oligodendroglial.
- VI. Estudiar la expresión de las proteínas de andamiaje sináptico colibistina y gefirina en las OPCs y su interacción con subunidades GABA<sub>A</sub>R.
- VII. Evaluar el efecto del silenciamiento específico de las subunidades GABA<sub>A</sub>R propuestas en la diferenciación del linaje oligodendroglial.
- VIII. Medir la presencia de GABA en medios de cultivo condicionados de oligodendrocitos.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los procedimientos, el manejo de los animales y la disposición de residuos biológicos se llevaron a cabo de acuerdo con el Manual de Usuarios del Bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, campus Juriquilla, aprobado por su Comité de Bioética; el cual está basado en la “Norma 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”. También fueron seguidas las recomendaciones de la guía internacional ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*).

### 7.1 Cultivos primarios de OPCs y neuronas corticales de ratas neonatas

Los cultivos celulares son de gran utilidad en la investigación básica. Cuando las células son extraídas de un tejido fresco, y son cultivadas en el sustrato y con los medios de cultivo adecuados para mantener sus propiedades básicas, a éste se le denomina cultivo primario de células. De forma general se requieren cuatro pasos para su obtención: (1) la extracción del tejido de interés, (2) la disección del tejido, (3) su disgregación y (4) la siembra de las células en un recipiente de cultivo idóneo.

Las OPCs fueron aislados de cultivos primarios mixtos de células gliales. Estos fueron obtenidos a partir de la corteza cerebral de crías de ratas Sprague-Dawley (SD) de 0 a 2 días postnatales (P<sub>0</sub>-P<sub>2</sub>) (Sánchez-Gómez et al., 2018). Para cada cultivo los animales fueron usados independientemente de su sexo y decapitados con material quirúrgico estéril. Los cerebros se extrajeron y colocaron en placas de Petri (35 mm de diámetro) en las que previamente fueron añadidos 2 mL de medio HBSS (*Hank's balanced salt solution*, Gibco) sin Ca<sup>2+</sup> y sin Mg<sup>2+</sup>, a 37°C. Las cortezas cerebrales fueron disecadas y disgregadas utilizando enzimas y medios mecánicos. Para la disgregación enzimática las cortezas fueron incubadas (15 min, 37°C) en medio HBSS que contenía tripsina (0.25%) y desoxirribonucleasa (DNAsa, 0.004%) (ambo de Sigma-Aldrich). La reacción enzimática se detuvo al añadir medio IMDM (*Iscove's*

*modified Dulbecco's medium*, Gibco) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, Hyclone) y la suspensión de células se centrifugó durante 5 min a 1000 rpm. El sobrenadante fue descartado y el concentrado de células fue suspendido en 1 mL del medio antes mencionado. Esta suspensión celular fue disgregada mecánicamente haciéndola pasar por agujas hipodérmicas de diferente calibre, primero de calibre 21G y después 23G. La preparación fue centrifugada nuevamente, y el sobrenadante fue descartado. La pastilla de células fue resuspendida con medio IMDM + 10% FBS. Las células fueron sembradas en frascos de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> previamente tratados con Poli-D-Lysina (PDL) con medio IMDM + 10% FBS y se mantuvieron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en una incubadora humidificada. El medio de cultivo fue renovado cada tres días. Después de 7-10 días en cultivo, se inició el aislamiento de las OPCs. Primero, los frascos de cultivo fueron agitados con ayuda de un agitador orbital (400 rpm, 1 h, a 37°C) para eliminar la microglía presente. Después, las OPCs que permanecen en el frasco de cultivo sobre una monocapa de astrocitos, fueron despegadas, nuevamente mediante la agitación de los frascos (400 rpm, 2 h, a 37°C). La suspensión de células obtenida se filtró a través de una membrana de 10 µm de diámetro de poro y se incubó en placas de Petri (100 mm de diámetro) por 30 min a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, lo que permite que la microglía se adhiera firmemente a la superficie de la placa y las OPCs permanezcan principalmente en la suspensión. Esta suspensión enriquecida con las OPCs se colectó y se filtró a través de una membrana plástica de 10 µm diámetro del poro. Por último, se estimó el número total de células en la suspensión con la ayuda de una cámara de Neubauer, en la que se aplicaron 10 µL de suspensión de células teñidas con azul de tripano (Sigma-Aldrich). El resto de la suspensión celular fue centrifugada a 1000 rpm durante 10 min y el precipitado fue resuspendido en medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, Gibco) (con glucosa 4.5 g/L y piruvato de sodio 0.11 g/L) libre de suero.

Las OPCs aisladas fueron sembradas sobre cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro tratados con PDL y colocados en placas de 24 pocillos. Las células fueron sembradas a diferentes densidades en función del experimento a realizar, entre 15000 y 100000 células por pocillo y se mantuvieron en una incubadora humidificada, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> hasta su uso. El medio de cultivo utilizado fue descrito para células de la

estirpe oligodendroglial suplementado para expandir el número de células y prevenir su diferenciación con medio denominado medio de proliferación (MP; Tabla 1) (Barres et al., 1992; Behar et al., 1988; Y. Chen et al., 2007; Dugas & Emery, 2013; Zhu et al., 2014), que contenía los factores mitogénicos: 5 ng/mL PDGF-AA (*platelet derived growth factor-AA*, Gibco) y 5 ng/mL bFGF (*basic fibroblast growth factor*, Gibco). O dependiendo del experimento, las células fueron incubadas en medio suplementado con factores que favorecen la supervivencia y la maduración de los oligodendrocitos, a este medio se le denominó de diferenciación (MD, Tabla 1) (Barres et al., 1992; Behar et al., 1988; Chen et al., 2007; Martel-Gallegos et al., 2020; Zhu et al., 2014).

**Tabla 1. Composición de los medios de proliferación (MP) y de diferenciación (MD) de OPCs. La presencia del reactivo en el medio se indica con la letra X.**

<b>Reactivo</b>	<b>Concentración</b>	<b>Casa Comercial</b>	<b>MP</b>	<b>MD</b>
<i>DMEM</i>	Medio base	Gibco	X	X
<i>Insulina</i>	5 µg/mL	Sigma-Aldrich	X	X
<i>Penicilina/estreptomicina</i>	100 U/mL	Gibco	X	X
<i>Albúmina de suero bovino (BSA)</i>	100 µg/mL	Sigma-Aldrich	X	X
<i>N-acetil-cisteína</i>	63 µg/mL	Sigma-Aldrich	X	X
<i>L-glutamina</i>	2 mM	Sigma-Aldrich	X	X
<i>Transferrina</i>	100 µg/mL	Sigma-Aldrich	X	X
<i>Progesterona</i>	62.5 ng/mL	Sigma-Aldrich	X	X
<i>Selenito de sodio</i>	40 ng/mL	Sigma-Aldrich	X	X
<i>Putrescina</i>	16 µg/mL	Sigma-Aldrich	X	X
<i>Triyodotironina (T3)</i>	30 ng/mL	Sigma-Aldrich		X
<i>Tiroxina (T4)</i>	40 ng/mL	Sigma-Aldrich		X
<i>Factor neurotrófico ciliar (CNTF)</i>	10 ng/mL	Peprtech		X
<i>Neurotrofina-3 (NT3)</i>	1 ng/mL	Peprtech		X

<i>Factor de crecimiento básico para fibroblastos (bFGF)</i>	5 ng/mL	Gibco	X
<i>Factor de crecimiento derivado de plaquetas-AA (PDGF-AA)</i>	5 ng/mL	Gibco	X

Para el cultivo primario de neuronas corticales se hicieron algunas modificaciones al protocolo establecido previamente (Larm et al., 1996). En este, las cortezas cerebrales de ratas de la cepa Wistar, de edad embrionaria E18, fueron disecadas y se disociaron enzimáticamente (con DNAsa al 0.25% y Tripsina al 0.4%) y mecánicamente (haciendo pasar la suspensión de células por agujas hipodérmicas de diferente calibre primero 21G, después 23G y por último 27G), después se procedió a su centrifugación. Las neuronas obtenidas se resuspendieron en medio Neurobasal (Gibco, Thermo Scientific) suplementado con B27 (Gibco, Thermo Scientific) y 10% FBS (Gibco, Thermo Scientific) y se sembraron sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro, tratados con poli-L-ornitina (30 µg/mL), puestos en placas de cultivo de 24 pocillos, a una densidad de 10<sup>5</sup> células/cubreobjeto. El medio se reemplazó por medio neurobasal complementado con B27 sin suero (con antibiótico-antimicótico y glutamina 2 mM) 24 h después. Los cultivos se mantuvieron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

## 7.2 Inmunocitoquímica

La inmunocitoquímica es un método de laboratorio que emplea la alta especificidad de la reacción antígeno-anticuerpo para determinar la presencia de moléculas (marcadores moleculares) expresadas en una muestra de células. En ésta, se utiliza un anticuerpo primario (monoclonal o policlonal) que reconoce, con alta afinidad, al marcador molecular de interés que se localiza en las células estudiadas. Esta reacción queda revelada, al aplicar otro anticuerpo (anticuerpo secundario) que se caracteriza por una alta afinidad por la región constante del anticuerpo primario y por estar acoplado a una etiqueta fluorescente. Esta etiqueta fluorescente permite, con la ayuda

de un microscopio de fluorescencia, observar la presencia de los marcadores moleculares que se deseen explorar.

Para caracterizar los cultivos primarios de OPCs, verificar la expresión de las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub>, y explorar la expresión de las proteínas de andamiaje, gefirina y colibistina, la técnica de inmunomarcaje fue realizada de la siguiente manera:

Primero, las células se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Los cultivos fijados se permeabilizaron con Tween-20 al 0.1%, se bloquearon con suero de cabra al 5% en PBS durante 30 min y se incubaron durante la noche a 4°C con los anticuerpos primarios (Tabla 2) diluidos en PBS que contenía suero de cabra al 5% y Tween-20 al 0.1%.

**Tabla 2. Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de inmunocitoquímica.**

<b><i>Anticuerpo</i></b>	<b><i>Dilución de trabajo</i></b>	<b><i>Casa Comercial</i></b>	<b><i>Hospedero</i></b>	<b><i># de Catálogo</i></b>
<i>anti-GABA<sub>A</sub>α2</i>	1:100	Alomone Labs	conejo	AGA002
<i>anti-GABA<sub>A</sub>α3</i>	1:100	Alomone Labs	conejo	AGA003
<i>anti-GABA<sub>A</sub>β2</i>	1:100	Abcam	conejo	ab186875
<i>anti-GABA<sub>A</sub>γ1</i>	1:100	Alomone Labs	conejo	AGA016
<i>anti-GABA<sub>A</sub>γ2</i>	1:100	Alomone Labs	conejo	AGA005
<i>anti-O4</i>	10 µg/mL	Millipore	ratón	MAB345
<i>anti-PDGFRα</i>	1:200	Santa Cruz	ratón	sc-398206
<i>anti-NG2</i>	1:300	Millipore	conejo	AB5320
<i>anti-Olig2</i>	1:500	Millipore	conejo	AB9610
<i>anti-MBP</i>	1:1000	Covance	ratón	SMI-99P
<i>anti-GFAP</i>	1:200	Santa Cruz	ratón	sc-33673
<i>anti-Gefirina</i>	1:500	Synaptic Systems	ratón	147011

<i>anti-Colibistina</i>	1:500	Synaptic Systems	conejo	261003
-------------------------	-------	------------------	--------	--------

Las células fueron lavadas e incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (Tabla 3). Después de cinco lavados con PBS, las muestras se tiñeron con diclorhidrato de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI 14 mM, de Molecular Probes; Eugene, OR, USA), este es un compuesto fluorescente que se une a regiones de los ácidos nucleicos ricas en adenina y timina. Es muy amplio su uso en microscopía de fluorescencia ya que permite marcar a los núcleos celulares, debido a la alta concentración de ácidos nucleicos que posee este orgánulo celular. Cuando se une al DNA bicatenario, tiene su máximo de absorción en  $\lambda = 358$  nm (ultravioleta) y su máximo de emisión en  $\lambda = 461$  nm (azul). Por lo tanto, los núcleos de las células presentes en las preparaciones tratadas con DAPI, pueden ser visualizados en color azul si se incide luz ultravioleta.

**Tabla 3. Anticuerpos secundarios utilizados en los experimentos de inmunocitoquímica.**

<b>Anticuerpo</b>	<b>Dilución de trabajo</b>	<b>Casa Comercial</b>	<b>Hospedero</b>	<b># de Catálogo</b>
<i>IgG anti-ratón FITC</i>	1:200	Invitrogen	cabra	81-6511
<i>IgG anti-conejo Alexa Fluor 514</i>	1:200	Invitrogen	cabra	A-31558
<i>IgG anti-conejo Alexa Fluor 594</i>	1:200	Abcam	cabra	ab150080
<i>IgG anti-ratón Alexa Fluor 647</i>	1:200	Invitrogen	cabra	A-21235

La ausencia de interacciones inespecíficas de anticuerpos secundarios fue verificada en todos los casos omitiendo los anticuerpos primarios en muestras preparadas en paralelo. Las muestras se montaron en Mowiol (Vector Laboratories; Burlingame, CA, USA), y las preparaciones se visualizaron bajo los microscopios confocales, Zeiss LSM

510 o Zeiss LSM 780, o bajo un microscopio de fluorescencia de corte óptico Apotome Zeiss (Oberkochen, DE).

### 7.3 Silenciamiento con siRNAs

Los pequeños RNA interferentes (siRNA) son un tipo de RNA con una longitud de 20 a 25 nucleótidos que presenta una alta especificidad por la secuencia de nucleótidos de su RNA mensajero diana, de tal manera interfiere con la expresión del gen correspondiente (Fig. 9).

Los siRNAs utilizados en este trabajo se adquirieron comercialmente (Dharmacon, Inc.; Lafayette, CO, USA). Para  $\alpha 3$  (siGENOME Rat Gabra3 (24947) siRNA-SMARTpool) y  $\gamma 1$  (siGENOME Rat Gabrg1 (140674) siRNA-SMARTpool), las secuencias objetivo fueron NM\_017069.3 y NM\_080586.1, respectivamente.

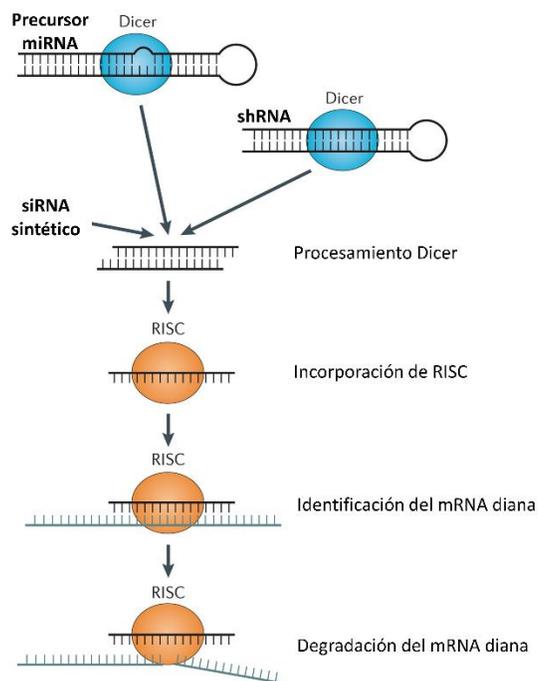


Figura 9. **Mecanismo general de silenciamiento de genes por siRNAs.** Los pequeños RNA de interferencia administrados exógenamente a la célula (siRNA; moléculas de RNA de doble cadena de

~22 nucleótidos de largo con salientes de 2 nucleótidos en los extremos 3') utilizan la maquinaria de interferencia de RNA endógena. En la vía endógena, Dicer genera microRNA (miRNA) a partir de horquillas de ARN codificadas por genes miRNA. La maquinaria Dicer también procesa secuencias exógenas de ARN de doble cadena (dsRNA) que contienen bucles llamados ARN de horquilla corta (shRNA). Los siRNA sintéticos eluden el procesamiento de Dicer y pueden asociarse directamente con el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) para mediar en el reconocimiento de los mRNA diana a través de la complementariedad entre los pares de bases nitrogenadas. *Argonaute 2* en el complejo RISC, escinde enzimáticamente el mRNA diana, por lo que no se produce la proteína, lo que lleva al silenciamiento del gen de interés. (Modificado de Wittrup & Lieberman, 2015).

---

Las OPCs se sembraron a una densidad de  $4 \times 10^4$  células por pozo en placas de 24 pozos, y se transfectaron con 270 ng por pozo de  $\alpha 3$ -siRNA o  $\gamma 1$ -siRNA usando Lipofectamina 3000 (Invitrogen; Grand Island, NY, USA) siguiendo el método indicado por el fabricante. En el grupo control (Control), las células se transfectaron en la misma condición con el siRNA ON-TARGETplus (SO-2686908G) (Dharmacon, Inc.; Lafayette, CO, USA). Entre 48 y 72 h después de la transfección, las OPCs tratadas con cada siRNA mantenidas en cultivo se usaron para: 1) ensayos de inmunocitoquímica usando los métodos descritos anteriormente, 2) ensayos de diferenciación de las OPCs, ó 3) monitoreo electrofisiológico. Las unidades arbitrarias de fluorescencia (AUF) se estimaron como densidad utilizando el software ImageJ (versión 1.52i). Para ello, se obtuvo la intensidad del color verde de cinco regiones de interés (ROIs) en cada preparación de OPCs. La AUF se calculó normalizando los valores de intensidad de cada ROI contra el valor de la intensidad de fondo en cada preparación, aplicando la siguiente relación: (intensidad del fondo – intensidad media de color verde medida en los ROIs)/intensidad del fondo (Cisneros-Mejorado et al., 2020).

Para las OPCs transfectadas con  $\alpha 3$ -siRNA y  $\gamma 1$ -siRNA y sus correspondientes grupos Control, las AUF se normalizaron frente a los respectivos grupos no tratados. La respuesta eléctrica a GABA provocada en las OPCs transfectadas con  $\alpha 3$ -siRNA o  $\gamma 1$ -siRNA se compararon con las de los grupos de control correspondientes; las OPCs se identificaron en el cultivo por su morfología bipolar típica y su perfil I/V rectificante, así

como las características básicas de la respuesta GABA: tales como su baja sensibilidad a GABA, la inhibición por  $Zn^{2+}$ , y la potenciación por  $\beta$ -CCB.

#### **7.4 Fijación de voltaje con un electrodo (*patch-clamp*)**

Para medir el flujo de iones a través de los canales expresados en la membrana de las células se empleó la técnica fijación de voltaje con un electrodo (*patch-clamp*) desarrollada por Neher y Sakmann a finales de los años 70 (Neher & Sakmann, 1976)(Fig. 10A). Esta es una variante de la técnica de control de voltaje con dos electrodos (*voltage-clamp*), que explicaremos más adelante, y que hace posible el estudio de las corrientes que fluyen a través de la membrana de células pequeñas.

El sistema es un circuito de retroalimentación (Fig. 10B) constituido por un microelectrodo sellado a la membrana de la célula bajo monitoreo, que permite el registro del voltaje (V) y/o de la corriente (I) que fluye a través de la membrana de una célula, ya sea por uno o por múltiples canales iónicos. El electrodo se conecta a un amplificador diferencial. La señal se compara con un voltaje comando o de mantenimiento ( $V_c$ ) que es el valor de voltaje al que se desea controlar la membrana, la diferencia entre ellos es compensada por la inyección de corriente, a través del electrodo cuya magnitud es determinada a través de un circuito de retroalimentación. En el baño se encuentra un segundo electrodo que mide, a través de un amperímetro, la corriente (I) que cruza la membrana de la célula. La modalidad estándar de célula completa (*whole-cell*) permite el acceso eléctrico a toda la membrana celular, aunque tiene como inconveniente la diálisis del citoplasma.

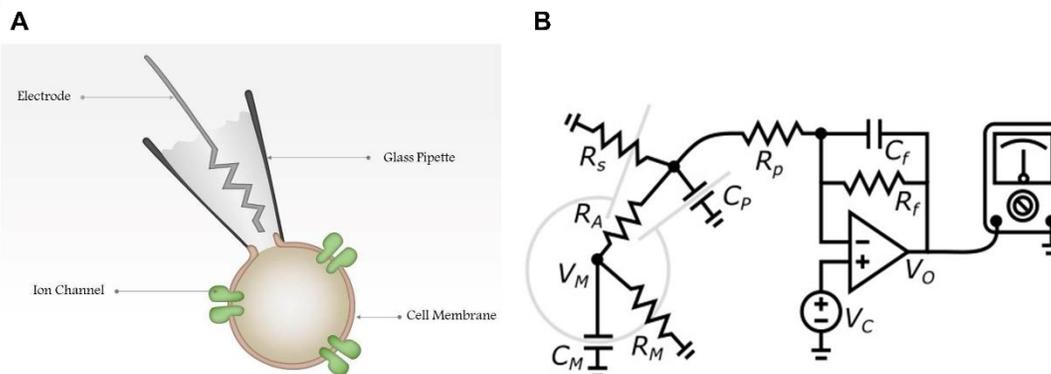


Figura 10. **Técnica de control de voltaje con un electrodo (*patch-clamp*) en la configuración estándar de célula completa (*whole-cell*).** (A) Se ilustra una célula en la que se indican canales iónicos expresados en su membrana. Además, se observa una pipeta de vidrio que en su interior contienen una solución y un electrodo. Dicha pipeta, está sellada en su extremo a la membrana de la célula, donde se provoca una perforación que permite el acceso al citoplasma celular. Esta modalidad de registro electrofisiológico con un electrodo se le denomina: célula completa (*whole-cell*). (B) El esquema representa a los elementos del circuito que permite realizar este tipo de registros. Los elementos del circuito son: ( $C_M$ ) capacitancia de la membrana, ( $R_M$ ) resistencia de la membrana, ( $V_M$ ) es el potencial de membrana, ( $R_A$ ) resistencia de acceso, ( $R_S$ ) resistencia del sello, ( $C_P$ ) capacitancia de la pipeta, ( $R_P$ ) resistencia de la pipeta de vidrio, ( $C_f$ ) capacitancia de retroalimentación, ( $R_f$ ) resistencia de retroalimentación, ( $V_O$ ) voltaje de salida del amplificador, ( $V_C$ ) voltaje comando o de mantenimiento. El esquema representado en (A) fue tomado de: <https://www.slideteam.net/0614-whole-cell-recording-medical-images-for-powerpoint.html> y el esquema mostrado en (B) fue tomado de: <https://sw Harden.com/blog/2020-10-11-model-neuron-itspice/>.

Para el registro de las características eléctricas, las OPCs fueron colocadas en una cámara de registro instalada en un microscopio invertido (Olympus IX71; Tokio, JP). Se perfundieron continuamente y se mantuvieron a temperatura ambiente (22-25°C). La solución externa estándar (SEA) que se empleó fue ajustada a pH 7.3 y contenía (en mM): 140 NaCl, 5.4 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub> y 10 HEPES (Attali et al., 1997). La aplicación de las diferentes drogas se logró mediante un intercambiador de solución RSC-200 (BioLogic; Seyssinet-Pariset, FR) controlado por una computadora. Los experimentos de electrofisiología se realizaron con un amplificador Axopatch 200B (Molecular Devices; Sunnyvale, CA, USA) utilizando la configuración estándar de célula completa (*whole-cell patch-clamp*) controlando el potencial de membrana a -80 mV,

además se utilizó el convertidor analógico-digital DigiData 1440 (Molecular Devices; Sunnyvale, CA, USA) y los registros se visualizaron y se analizaron con ayuda del software pClamp (v.10, Molecular Devices; Sunnyvale, CA, USA). Las pipetas de registro tuvieron una resistencia entre 3-5 MΩ y se llenaron con una solución interna de Atalli (SIA) que contenía (en mM): 140 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 11 EGTA, 2 Na-ATP y 0.2 GTP, ajustada a pH 7.3 con KOH. Tanto los agonistas como las drogas para su aplicación a las células fueron disueltos en la SEA, a partir de alícuotas concentradas. Cuando fue requerido para diluir drogas se utilizó como disolvente dimetilsulfóxido (DMSO), la concentración máxima final de este fue de 0.1% en todos los casos.

Para la construcción de las curvas dosis-respuesta (D-R) a GABA (a partir de los registros electrofisiológicos realizados en células en cultivo primario y en ovocitos) las respuestas fueron normalizadas con respecto a la respuesta máxima (*I<sub>max</sub>*), obtenida a 1 mM de GABA, mediante la fórmula:  $I_{norm} = I/I_{max}$  donde *I* es el valor de corriente al 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 D-R, dicha curva fue ajustada por el método de mínimos cuadrados ordinarios, a la siguiente ecuación logística:

$$I/I_{max} = [(A1 - A2)/1 + ([GABA] / EC_{50})^{nH}] + A2$$

Donde *nH* es el factor de pendiente (coeficiente de Hill); *A1* y *A2* son los valores de *I* (corriente) normalizados inicial y final, respectivamente; *EC<sub>50</sub>* es la concentración que se requiere de GABA para obtener el 50% de la respuesta de activación, y *[GABA]* es la concentración del neurotransmisor.

### **7.5 Determinación de la expresión génica por reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), clonación y mutagénesis sitio-dirigida de subunidades GABA<sub>A</sub>**

Para verificar la expresión de los genes de las subunidades GABA<sub>A</sub> y de las proteínas de andamiaje sináptico gefirina y colibistina, se extrajo el RNA total a partir de cultivos primarios de OPCs y OLs aislados de las cortezas cerebrales de ratas neonatas

utilizando trizol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); a partir del RNA purificado, se sintetizó el cDNA llevando a cabo una transcripción reversa utilizando la enzima SuperScript™ II (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). El cDNA sintetizado se usó como molde para amplificar un fragmento de las correspondientes secuencias codificantes por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los siguientes oligonucleótidos:  $\alpha 3$ , sentido: 5'-ACC ACA CAA ATG TGG CAC TTC-3', anti-sentido: 5'-AGT CAC TGC ATC TCC AAG CC-3';  $\beta 2$ , sentido: 5'-ATG TGG AGA GTC CGG AAA AG-3', anti-sentido: 5'-TTT CAG TTG GGA GGC ACG TC-3';  $\beta 3$ , sentido: 5'-CAC CCT GAT GGA ACA GTG CT-3', anti-sentido: 5'-ATG AGA GGA TTG TGA TCA TGA TTG-3';  $\gamma 1$ , sentido: 5'-TAG GCG TGA GAC CCA CAG TA-3', anti-sentido: 5'-GCG ATT GGG CGT TGT TAT CC-3';  $\gamma 3$ , sentido: 5'-ACC ATC AAT GCA GAG TGC CA-3', anti-sentido: 5'-GCT GAG TGT GGT CAT GGT TA-3'; gefirina, sentido: 5'-TTC GGG ACA GCA ATC GAT CA-3', anti-sentido: 5'-GGG TCC AGC TTT ACG TCA CAT-3'; colibistina, sentido: 5'-ACT ACA GAA CCG GGA CCA GA-3' y anti-sentido: 5'-CTC GGC CAA TTG TAA GGG GT-3'. La amplificación de un fragmento de la secuencia codificante para la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa fue utilizado como control, y se realizó con los oligonucleótidos: sentido, 5'-TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA-3', y anti-sentido, 5'-AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT-3'. Las condiciones de la PCR fueron una desnaturalización inicial a 98°C durante 30 s seguida de 35 ciclos a 98°C durante 10 s, 55-60°C durante 20 s, 72°C durante 30 s y finalmente 72°C durante 5 min usando la enzima Phusion DNA Polimerasa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Los cRNAs correspondientes a las subunidades GABA<sub>A</sub>  $\alpha 3$ ,  $\beta 2$ , y  $\gamma 1$  se obtuvieron de la siguiente manera. Primero, fueron amplificadas las secuencias codificantes completas mediante PCR y para ello se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:  $\alpha 3$ , sentido: 5'-ATG ATA ACC ACA CAA ATG TGG C-3', anti-sentido: 5'-CTA CTG TTT GCG GAT CAT G-3';  $\beta 2$ , sentido: 5'-ATG TGG AGA GTC CGG AAA-3', anti-sentido: 5'-TTA GTT CAC ATA GTA AAG CCA AT-3';  $\gamma 1$ , sentido: 5'-ATG GGT TCT GGG AAA GTC-3', y anti-sentido: 5'-TTA TAA GTA TAG ATA TCC AAC CCA-3'. Las condiciones de la PCR fueron una desnaturalización inicial a 98°C durante 30 s seguida de 35 ciclos a 98°C durante 10 s, 55-60°C durante 20 s, 72°C durante 70 s y finalmente 72°C

durante 5 min. Cada fragmento obtenido se clonó en el vector pXENEX1 en los sitios NcoI, BamHI y NotI (Pérez-Samartín et al., 2017).

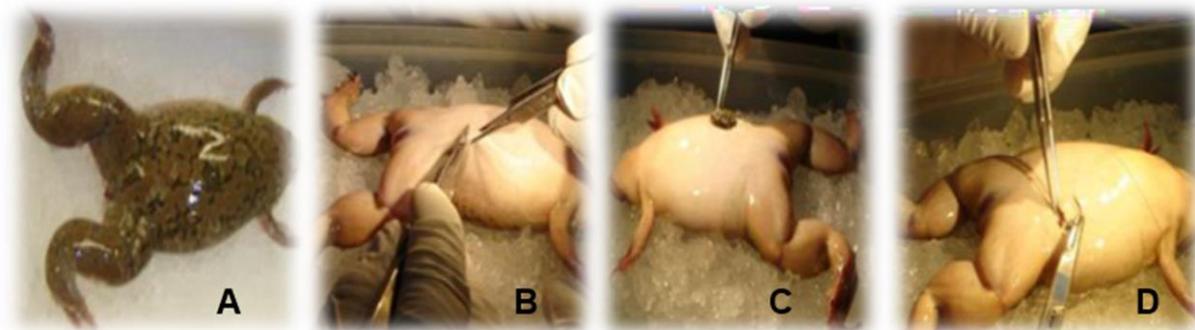
Estos plásmidos se usaron como plantillas para hacer la mutagénesis sitio-dirigida de las secuencias codificantes de las subunidades GABA<sub>A</sub> empleando los siguientes oligonucleótidos:  $\alpha$ 3(H126R), sentido: 5'-GGA CTC CAG ATA CCT TCT TCA GAA ACG G-3', anti-sentido: 5'-GTG AGC CAC TGA TTT TTT ACC GTT TCT GAA G-3';  $\alpha$ 3(S294I), sentido: 5'-GTT CTC ACC ATG ACC ACC TTG ATC ATC AG-3', anti-sentido: 5'-GGT AAA GAG TTT CTG GCA CTG ATG ATC AAG G-3';  $\beta$ 2(N265I), sentido: 5'-CCT GAC GAT GAC CAC AAT CAT CAC CC-3', anti-sentido: 5'-GAG TCT CCC GGA GAT GGG TGA TGA TT-3';  $\gamma$ 1 (S282I), sentido: 5'-CGG TTT TGA CTA TGA CAA CCC TCA TCA CA-3', anti-sentido: 5'-GAA ACC TTA GGT AAA GAT TTT CTA GCG ATT GTG ATG AG-3' y la polimerasa Pfu (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Los plásmidos se linealizaron con la enzima Hind III y se utilizaron como molde para la síntesis *in vitro* de RNA utilizando el kit T7 mMESSAGE mMACHINE siguiendo su protocolo estándar (Ambion; Invitrogen, Grand Island, Nueva York). Los cRNA obtenidos se usaron para la expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis*.

## 7.6 Expresión heteróloga funcional en ovocitos de *Xenopus laevis*

Ranas hembra de la especie *Xenopus laevis* fueron obtenidas de Xenopus I (Ann Arbor, Michigan, USA) o de Aquanimals (Querétaro, México). Para la cirugía en la que fueron extraídos entre 3 a 4 lóbulos ováricos, las ranas fueron previamente inmovilizadas por hipotermia y anestesiadas con benzocaína al 0.1% (Sigma-Aldrich).

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 (Fig. 11) 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 NaHCO<sub>3</sub>, 0.33 Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 0.41 CaCl<sub>2</sub>, 0.82 MgSO<sub>4</sub>, 5 HEPES y 0.07 mg/mL de gentamicina, suplementada con 0.2% de 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 11. **Cirugía de extracción de lóbulos ováricos 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 pinzas finas, fueron disecados folículos (1-1.2 mm) de los lóbulos ováricos en el estadio VI de desarrollo (Dumont, 1972) (Fig. 12). Una vez separados, los folículos fueron colocados en una placa Petri con solución de Barth, a una temperatura de 16-18°C.

Los folículos sanos fueron microinyectados a las 24 h posteriores a su extracción, con una solución que contenía una mezcla ( $\alpha\beta\gamma$ ; en una proporción 1:1:1) de cRNAs de las subunidades GABA<sub>A</sub> clonadas; o del receptor GABA Rho1. A cada folículo se le inyectó un volumen aproximado de 50 nL (50 pg) de cRNA. Para este proceso se mantuvo el cRNA a baja temperatura para evitar su degradación, y una pipeta (WPI, FI, USA) de microinyección fue cargada con 1  $\mu$ 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 12. **Aislamiento de folículos de *Xenopus laevis***. (A) Lóbulo ovárico. (B) Folículos unidos al epitelio ovárico. (C) Folículo aislado.

---

Los folículos microinyectados, fueron mantenidos en una placa Petri con solución de Barth normal a una temperatura de 18°C. Después de 24 h de inyectados los ovocitos fueron defoliculados. Para esto, los ovocitos fueron tratados enzimáticamente, con 0.5 mg/mL de colagenasa (C2674-500MG, Sigma Aldrich) por 45 min a temperatura ambiente (Arellano & Miledi, 1993). Después con ayuda de pinzas finas y un microscopio estereoscópico, las capas celulares que envuelven al folículo fueron removidas conservando la capa vitelina. Los ovocitos defoliculados fueron mantenidos en solución de Barth a una temperatura de 18°C hasta su uso en los registros electrofisiológicos.

Las respuestas eléctricas de los ovocitos fueron registradas utilizando la técnica de control de voltaje con dos electrodos (Arellano & Miledi, 1993; Miledi, 1982) (Fig. 13). La técnica de control de voltaje (*voltage-clamp*) fue ideada por Cole y Marmont en el año 1947 (Moore, 2007). 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 ésta se encuentra determinada por la apertura y cierre de los canales iónicos (Hille, 2001).

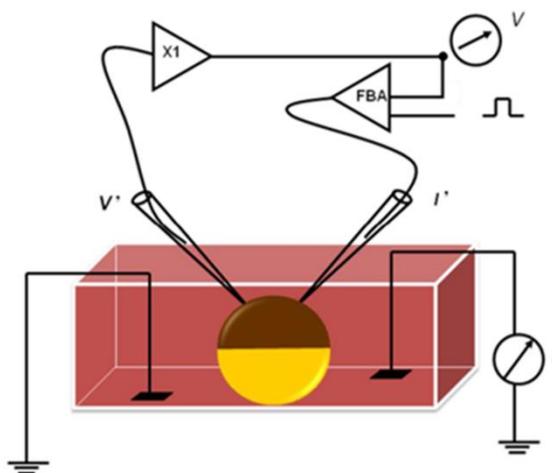


Figura 13. **Técnica de control de voltaje con dos electrodos.** ( $V'$ ) electrodo de voltaje, ( $X1$ ) amplificador, ( $V$ ) voltaje de mantenimiento, ( $FBA$ ) amplificador de retroalimentación negativa, ( $I'$ ) electrodo intracelular de corriente, ( $I$ ) amperímetro que se encuentra en el baño y censa la corriente transmembranal (Modificada de Hille, 2001).

El sistema es un circuito de retroalimentación (Fig. 13) 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 $\Omega$ .

Fue utilizado el amplificador de control de voltaje GeneClamp 500B (Axon Inst., CA, EUA), y la señal de corriente fue monitoreada utilizando un osciloscopio marca Gould (D50-602), al mismo tiempo 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 (0.025 Hz) el voltaje de mantenimiento con pulsos breves (1 s) que permiten el monitoreo continuo de la conductancia de membrana.

El registro electrofisiológico de los ovocitos se realizó dentro de un periodo de 48 hasta 72 h después de su microinyección. Las respuestas de corriente provocadas por la aplicación de GABA, o de los medios de cultivos condicionados de las OPCs o los OLs, fueron monitoreadas de manera rutinaria utilizando un protocolo de registro que consistió en el control de voltaje de los ovocitos a un potencial de  $-60$  mV. Los ovocitos bajo registro fueron mantenidos bajo perfusión continua (10 mL/min) con solución Ringer normal (RN) que contenía en mM: 115 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 5 HEPES, ajustada a pH 7.4 con NaOH, a temperatura ambiente. Las drogas utilizadas fueron disueltas en RN, a partir de alícuotas concentradas, y aplicadas a través de la perfusión.

Para evaluar la concentración de GABA en los medios condicionados de las OPCs y los OLs, fueron utilizados dos métodos, el primero fue usando un ensayo de ELISA (GABA ELISA kit, Aviva Systems Biology, CA, USA) (Colom-Casasnovas et al., 2022) siguiendo las instrucciones del fabricante, en este ensayo competitivo los estándares de la curva patrón de GABA y las muestras diluidas se colocaron en una placa de 96 pozos, previamente recubierta con un anticuerpo anti-GABA. Después se les añadió el complejo GABA-biotina a cada pocillo y la placa se incubó durante 60 min a temperatura ambiente. Después de la incubación, se lavó la placa y se añadió el conjugado de avidina-HRP a cada pozo y se incubó durante 45 min a temperatura ambiente. Finalmente, para revelar la reacción se añadió a cada pozo el sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) se incubó durante 30 min a 37°C. Las muestras se

leyeron a 450 nm en un lector de microplacas de ELISA. Un segundo método de detección de GABA fue mediante el uso de ovocitos inducidos a expresar al receptor homomérico GABA Rho1, utilizado en este caso como sensor del neurotransmisor, el receptor  $\rho 1$  que presenta una sensibilidad en el rango nanomolar al GABA (Martínez-Torres & Miledi, 2001) por lo que representa un método sensible de detección. Para esto la aplicación de los medios condicionados se realizó de manera controlada cerca de la superficie del ovocito a través de la eyección del medio contenido en una micropipeta, método que como ha sido descrito permite la administración de nanolitros de la solución de prueba (Colom-Casasnovas et al., 2022).

También, se emplearon ovocitos para evaluar la especificidad de los anticuerpos primarios con los que realizamos los experimentos de expresión de subunidades GABA<sub>A</sub> en las OPCs. Para esto, ovocitos fueron microinyectados con los cRNAs correspondientes a las subunidades GABA<sub>A</sub>:  $\alpha 3$ ,  $\beta 2$  y  $\gamma 1$  en una proporción 1:1:1. Después de pasadas 72 h de la microinyección se verificó la expresión funcional de la combinación  $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ , mediante la técnica antes mencionada, monitoreando su respuesta a la aplicación de 100  $\mu\text{M}$  de GABA. Los ovocitos con respuesta a GABA, fueron fijados y posteriormente procesados en cortes de 50  $\mu\text{m}$  para realizar inmunotinciones específicas contra las subunidades  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  y  $\gamma 1$  del receptor GABA<sub>A</sub>.

## 7.7 Análisis estadístico

Los resultados se presentaron como la media  $\pm$  S.D., con el número de células evaluadas indicado en cada figura. La significancia estadística de las diferencias entre dos grupos de datos se probó con la prueba “t” de Student para datos no pareados. Para comparaciones múltiples, utilizamos ANOVA de una vía (*post hoc* de Tukey). En todos los casos, los valores con  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. El análisis estadístico se realizó utilizando R (v.3.2.3) con RStudio (Free Software Foundation, Inc.; Boston, MA, USA) o GraphPad Prism (v.6.00; La Jolla, CA, USA).

## 8. RESULTADOS

Los antecedentes directos al presente trabajo indican que la conformación más probable del receptor GABA<sub>A</sub> oligodendroglial es  $\alpha 3\beta 2\gamma 1$  (Arellano et al., 2016; Ordaz, 2017), conformación que reproduce la mayoría de las características farmacológicas y funcionales del nuevo receptor. Los resultados descritos aquí están englobados en tres principales ejes que serán descritos en las secciones siguientes en el mismo orden: I) Caracterización del efecto de la  $\beta$ -CCB sobre el GABA<sub>A</sub>R endógeno y el expresado heterológamente ( $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ ), II) Efecto de la disminución de la expresión de subunidades específicas del GABA<sub>A</sub>R oligodendroglial sobre la respuesta a GABA en OPCs, y III) Efecto de la disminución de la expresión de subunidades específicas del GABA<sub>A</sub>R oligodendroglial sobre la maduración del linaje oligodendroglial

### 8.1 Caracterización del efecto de la $\beta$ -CCB sobre el GABA<sub>A</sub>R endógeno y el expresado heterológamente ( $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ )

#### 8.1.1 Efecto de $\beta$ -carbolinas en la respuesta a GABA endógena de oligodendrocitos y neuronas

Una de las principales características distintivas del GABA<sub>A</sub>R oligodendroglial es su potenciación por la  $\beta$ -carbolina  $\beta$ -CCB. Aquí se indica que este efecto potenciador de la  $\beta$ -CCB sobre la respuesta endógena, fue debida principalmente a un aumento en la sensibilidad a GABA, esto se muestra en la Figura 14, donde curvas D-R para GABA fueron construidas tanto en la ausencia como en la presencia de  $\beta$ -CCB (10  $\mu$ M). Así, en ausencia del modulador, la EC<sub>50</sub> fue de  $83.3 \pm 8.6 \mu$ M (n = 5 células), mientras que en presencia de  $\beta$ -CCB, la EC<sub>50</sub> fue de  $18.5 \pm 3.4 \mu$ M (n = 6 células), las diferencias de EC<sub>50</sub> fueron estadísticamente significativas (\**P* < 0.001 para comparaciones entre la media de los valores de -logEC<sub>50</sub> de cada grupo).

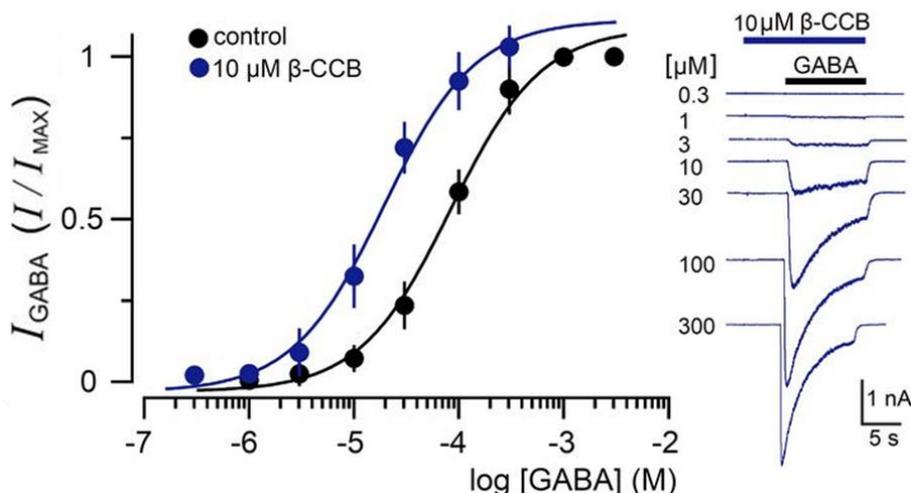


Figura 14. **Curva dosis-respuesta a GABA y efecto de  $\beta\text{-CCB}$  en oligodendrocitos.** La gráfica muestra la curvas D-R para GABA en OL en ausencia (negro) y presencia de 10  $\mu\text{M}$   $\beta\text{-CCB}$  (azul). Cada punto representa el promedio de la respuesta a GABA en ocho OLs en ambas condiciones. Los datos se ajustaron a una curva D-R. Los trazos a la derecha ilustran la corriente respuesta a GABA en presencia de  $\beta\text{-CCB}$  10  $\mu\text{M}$ ; en este registro y en los subsiguientes en células neurales, los fármacos se aplicaron como indican las barras superiores y las células fueron mantenidas a un potencial de membrana de -80 mV.

Este efecto de la  $\beta\text{-CCB}$  recuerda al obtenido por la modulación con BZDs, particularmente con DZP en otros receptores (Benson et al., 1998; Middendorp et al., 2015; Walters et al., 2000), por lo que fue importante explorar la participación del sitio clásico de BZDs. En la Figura 15 se ilustran resultados de experimentos en los que la respuesta endógena a 10  $\mu\text{M}$  GABA en OLs fue potenciada por coaplicación con  $\beta\text{-CCB}$  (10  $\mu\text{M}$ ) o por DZP (10  $\mu\text{M}$ ), esta potenciación probada en presencia de 10  $\mu\text{M}$  flumazenil (FMZ), un potente antagonista del sitio clásico de unión a DZP (a BZD en general). Como se puede observar (Fig. 15), la potenciación provocada por DZP en los oligodendrocitos fue inhibida de manera efectiva por el FMZ, mientras que la potenciación por  $\beta\text{-CCB}$  no se vio afectada ( $n = 7$  células). Estos resultados sugirieron que la  $\beta\text{-CCB}$  no actuó a través de la interacción con el sitio clásico de unión a DZP del  $\text{GABA}_A\text{R}$  oligodendroglial.

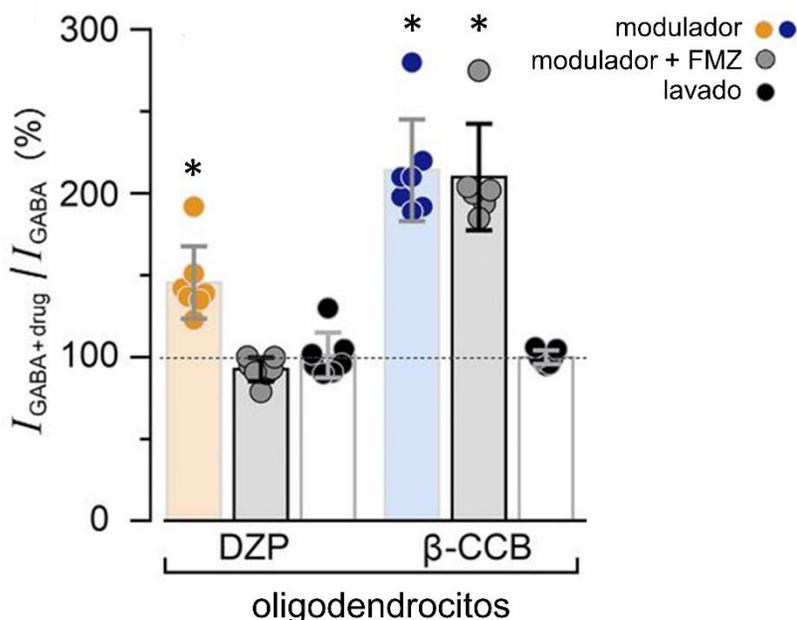


Figura 15. **Efecto farmacológico de  $\beta$ -CCB en oligodendrocitos sobre el sitio de BZDs.** Se monitoreó la respuesta a GABA electrofisiológicamente en OLs mantenidos a -80 mV. La potenciación mediada por DZP 10  $\mu$ M (columna naranja) o  $\beta$ -CCB 10  $\mu$ M (columna azul), en presencia y ausencia de FMZ 10  $\mu$ M, se analizó como se resume en el gráfico de barras. La línea discontinua muestra la respuesta a GABA control (10  $\mu$ M) en ausencia de fármacos; las columnas grises indican el efecto del modulador coaplicado con FMZ. El efecto del lavado de los fármacos estudiados está señalado en las columnas de color blanco. FMZ fue muy eficaz en la eliminación del efecto potenciador de DZP, sin embargo no antagonizó la respuesta a  $\beta$ -CCB en estas células. \* $P < 0.001$ , prueba "t" de Student para datos pareados.

Esta diferencia en el sitio de acción de la  $\beta$ -CCB comparado con el de DZP, parece ser congruente con el efecto potenciador que tiene esta  $\beta$ -carbolina sobre el receptor oligodendroglial (Arellano et al., 2016), en comparación con el efecto inhibitorio sobre los receptores neuronales (principalmente los conformados por  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ ,  $\alpha 2\beta 2\gamma 2$  y  $\alpha 2\beta 3\gamma 2$ ). Esto representa una oportunidad farmacológica para distinguir los dos tipos de receptores, por ello decidimos explorar diferentes  $\beta$ -carbolinas con la finalidad de conocer la generalidad de su interacción con el receptor oligodendroglial, al mismo tiempo comparamos los efectos de las  $\beta$ -carbolinas probadas sobre respuestas

generadas por la activación de los GABA<sub>A</sub>R expresados en neuronas corticales mantenidas en cultivo.

La Figura 16 ilustra la respuesta endógena a GABA (EC<sub>10</sub> para cada tipo celular) generada en OLS o neuronas que fue monitoreada en la ausencia (respuesta de control) o en la presencia de distintas β-carbolinas (10 μM). Las seis β-carbolinas exploradas mostraron modulación diferencial cuando comparamos su efecto sobre oligodendrocitos *versus* neuronas. Las respuestas a GABA en OLS fueron moduladas de manera positiva por cuatro diferentes β-carbolinas con la siguiente secuencia de potencia: β-CCB > β-CCA > β-CCE > β-CCT, mientras que β-CHM no tuvo efecto y DMCM inhibió la respuesta. En cambio, la mayoría de las β-carbolinas (misma concentración) presentaron una inhibición como efecto neto sobre el receptor neuronal activado por GABA (3 μM) o no tuvo un efecto claro sobre la amplitud de esta respuesta, como se observa para β-CCB y para β-CCE (Fig. 16). Por lo tanto, distintas β-carbolinas presentaron un efecto diferencial sobre el GABA<sub>A</sub>R oligodendroglial comparado con el neuronal.

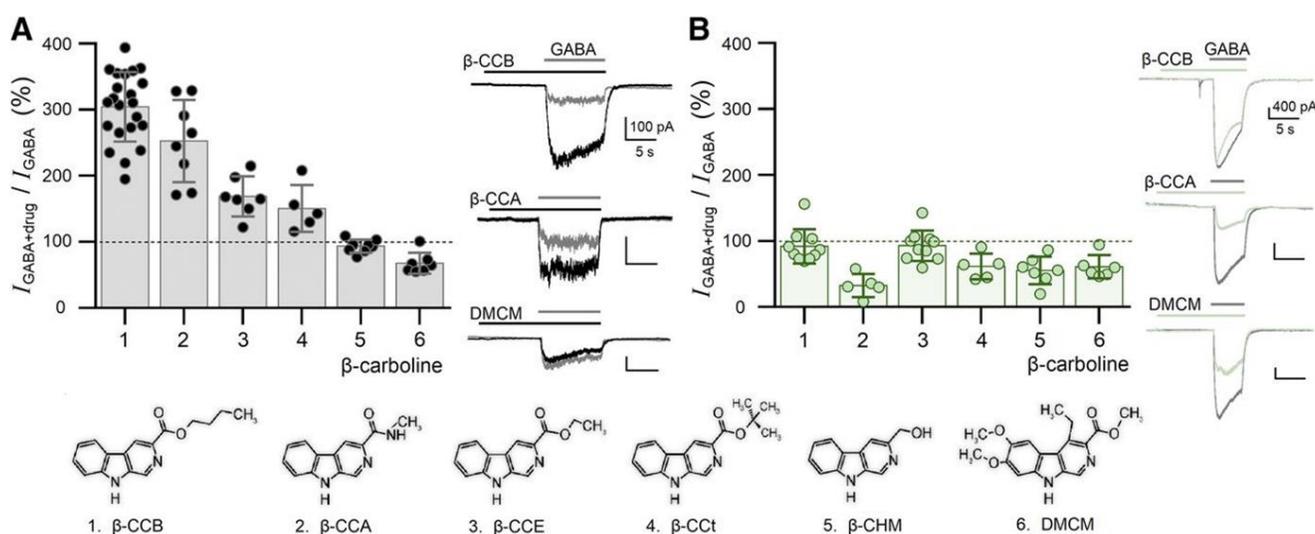


Figura 16. **Efecto farmacológico de β-carbolinas sobre la amplitud de la respuesta a GABA en OLS y neuronas corticales en cultivo.** (A) La respuesta a GABA 10 μM se probó en la ausencia y en la presencia de β-carbolinas (10 μM) en OLS. Cada fármaco enumerado del 1 al 6 corresponde a las estructuras en el

parte inferior de la figura, y los trazos ilustran la respuesta obtenida para tres fármacos probados como se indica. Las barras son el promedio de las respuestas normalizadas con respecto a la respuesta del control sin  $\beta$ -carbolina (línea del 100% en el gráfico) para cada una de las células registradas (6-21 células en cada caso). Los trazos en color gris corresponden a las respuestas control, mientras que los trazos en color negro son las respuestas a GABA en presencia de una  $\beta$ -carbolina. (B) A modo de comparación, se realizó un análisis de la respuesta de GABA provocada en las neuronas corticales (de 6-8 células en cada caso) mediante la aplicación de GABA 3  $\mu$ M y el mismo conjunto de  $\beta$ -carbolinas. Los trazos ilustran las respuestas obtenidas para los tres fármacos indicados, en color gris se muestran las respuestas control, mientras que los trazos en color verde son las respuestas de GABA en presencia de una  $\beta$ -carbolina. Todos los efectos del fármaco fueron estadísticamente significativos frente al grupo control con la excepción de  $\beta$ -CHM en OL, así como  $\beta$ -CCB y  $\beta$ -CCE en las neuronas ( $P < 0.001$  para las comparaciones entre las células de control frente a las células tratadas con  $\beta$ -carbolina, prueba "t" de Student).  $\beta$ -CCA, N-metilamida del ácido  $\beta$ -carbolina-3-carboxílico;  $\beta$ -CCt,  $\beta$ -carbolina-3-carboxilato de terc-butilo.

---

### 7.1.2 Efecto de $\beta$ -CCB sobre la respuesta a GABA del receptor $GABA_A \alpha 3\beta 2\gamma 1$

Los resultados descritos hasta aquí, parecen indicar que el efecto de las  $\beta$ -carbolinas, y en especial de la  $\beta$ -CCB, sobre el  $GABA_A$ R oligodendroglial podría ser explicado por la expresión de un sitio de modulación positiva que es diferente al sitio clásico de unión a BZD. Dado que las características moleculares de este sitio potenciador son de importancia para distinguir y utilizar farmacológicamente el efecto de  $\beta$ -carbolinas en los OLs, aquí exploramos los determinantes moleculares del efecto, y analizamos de manera directa dos de los sitios descritos para la unión de este tipo de moléculas (Baur et al., 2008; Ramerstorfer et al., 2011; Varagic et al., 2013). En general estos sitios propuestos corresponden con el sitio de alta afinidad para DZP, así como su sitio de baja afinidad (Walters et al., 2000). Para estos experimentos el receptor  $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ , que mimetiza las propiedades del receptor oligodendroglial (Ordaz, 2017), fue expresado heterológicamente en ovocitos de *Xenopus laevis* y la respuesta a GABA fue monitoreada aplicando la técnica de control de voltaje con dos electrodos. Inicialmente, semejante a lo mostrado en el receptor endógeno, para explorar si la interacción de  $\beta$ -CCB con el receptor  $\alpha 3\beta 2\gamma 1$  fue a través del sitio clásico de unión a BZD, se utilizó el FMZ como antagonista específico del sitio. Como puede observarse en la Figura 17, el

efecto potenciador de  $\beta$ -CCB (30  $\mu$ M) tampoco fue bloqueado por FMZ (10  $\mu$ M) en el receptor expresado heterológamente. De hecho, la coaplicación de FMZ con  $\beta$ -CCB provocó una mayor respuesta potenciadora del receptor  $\alpha 3\beta 2\gamma 1$  (Fig. 17), ya que, como se observa la potenciación causada por  $\beta$ -CCB sin FMZ fue de  $324.1 \pm 74\%$ , mientras que en presencia de FMZ fue de  $446.9 \pm 65\%$  (17-20 ovocitos en cada caso).

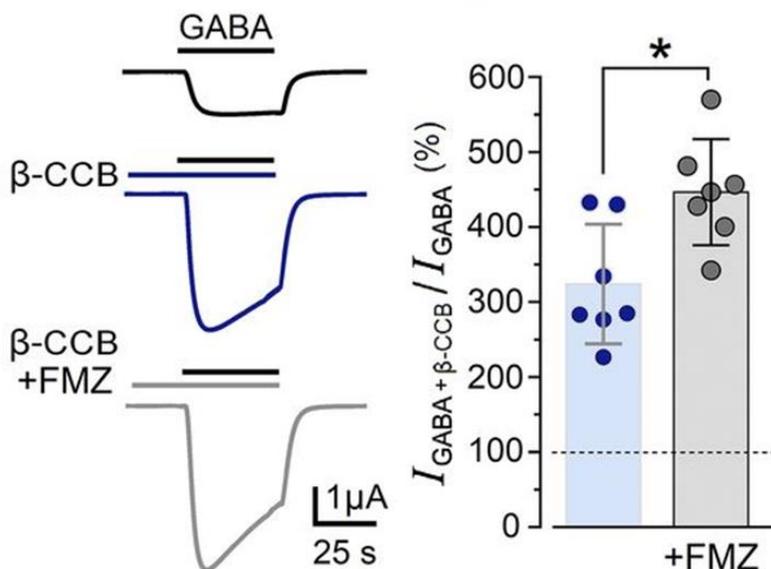


Figura 17. **Efecto farmacológico de  $\beta$ -CCB sobre la respuesta a GABA del receptor  $\alpha 3\beta 2\gamma 1$  expresado en ovocitos de *Xenopus laevis*.** Los trazos ilustran el efecto de FMZ 10  $\mu$ M, un antagonista específico para el sitio de unión de BZP de alta afinidad. Se muestra la respuesta a 10  $\mu$ M GABA sólo, seguido del efecto de 30  $\mu$ M  $\beta$ -CCB en ausencia y presencia de FMZ que no antagonizó la potenciación causada por  $\beta$ -CCB. La amplitud de la respuesta promedio del efecto obtenida en siete ovocitos se muestra en el gráfico de barras. El aumento en la respuesta de GABA por  $\beta$ -CCB más FMZ fue estadísticamente significativo contra el grupo sin FMZ (\* $P < 0.001$ , prueba "t" de Student para datos pareados).

Este resultado sugirió que el sitio de unión de  $\beta$ -CCB no correspondía al clásico sitio de unión de BZD, una observación que fue apoyada por experimentos de coaplicación similares con  $\beta$ -CCB y GABA en receptores  $\alpha 3\beta 2\gamma 3$  y especialmente  $\alpha 3\beta 2$  en los que la  $\beta$ -carbolina también provocó un aumento importante de la respuesta (Fig. 18).

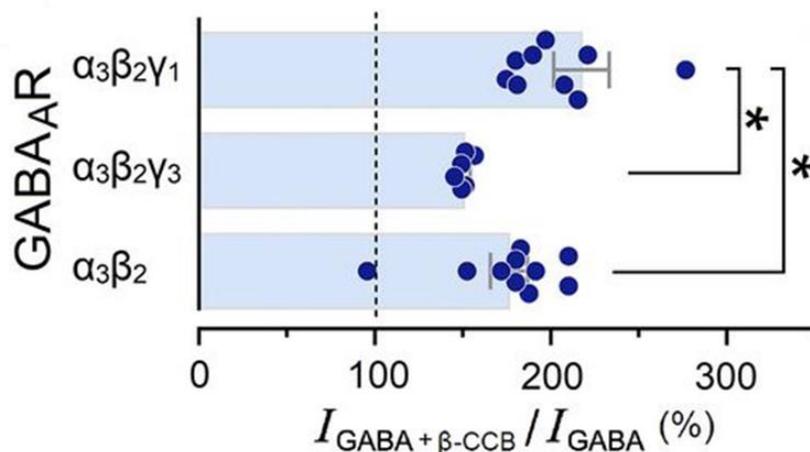


Figura 18. **Efecto farmacológico de  $\beta$ -CCB sobre la respuesta a GABA de los receptores  $\alpha_3\beta_2\gamma_1$ ,  $\alpha_3\beta_2\gamma_3$  y  $\alpha_3\beta_2$  expresados en ovocitos de *Xenopus laevis*.** La gráfica muestra el efecto de  $\beta$ -CCB (3  $\mu$ M) en la respuesta a GABA activada en receptores  $\alpha_3\beta_2$  sin subunidad  $\gamma$ , o aquellos que contienen  $\gamma_1$  o  $\gamma_3$ . Las respuestas promedio (6-10 ovocitos de tres ranas) fueron estadísticamente diferentes para los tres receptores, en comparación con la respuesta de control provocada por GABA (10  $\mu$ M) sólo, además la potenciación de  $\beta$ -CCB en la respuesta del receptor  $\alpha_3\beta_2\gamma_1$  fue diferente a todos los demás. \* $P < 0.001$ , ANOVA de una vía seguido de una prueba *post hoc* de Tukey.

Para confirmar estos resultados de manera directa, los sitios de unión específicos de alta y baja afinidad para BZD fueron mutados en las subunidades  $\alpha_3$ ,  $\beta_2$  y/o  $\gamma_1$ . Por lo tanto, la sensibilidad del receptor  $\alpha_3\beta_2\gamma_1$  a DZP fue eliminada o fuertemente disminuida de manera similar a la mostrada previamente para el receptor neuronal (Benson et al., 1998; Middendorp et al., 2015; Walters et al., 2000). Los resultados de estos experimentos se ilustran en la Figura 19. Primero, la mutación H126R en la subunidad  $\alpha_3$  eliminó la sensibilidad a DZP 1  $\mu$ M (Benson et al., 1998). Sin embargo, la modulación positiva provocada por  $\beta$ -CCB (1  $\mu$ M) sobre la respuesta a GABA (10  $\mu$ M) no se vio afectado, siendo  $144.8 \pm 18\%$  en los ovocitos expresando el receptor nativo y  $202.4 \pm 17.4\%$  en el receptor mutado  $\alpha_3(\text{H126R})\beta_2\gamma_1$  (5-6 ovocitos de dos ranas; Fig. 19).

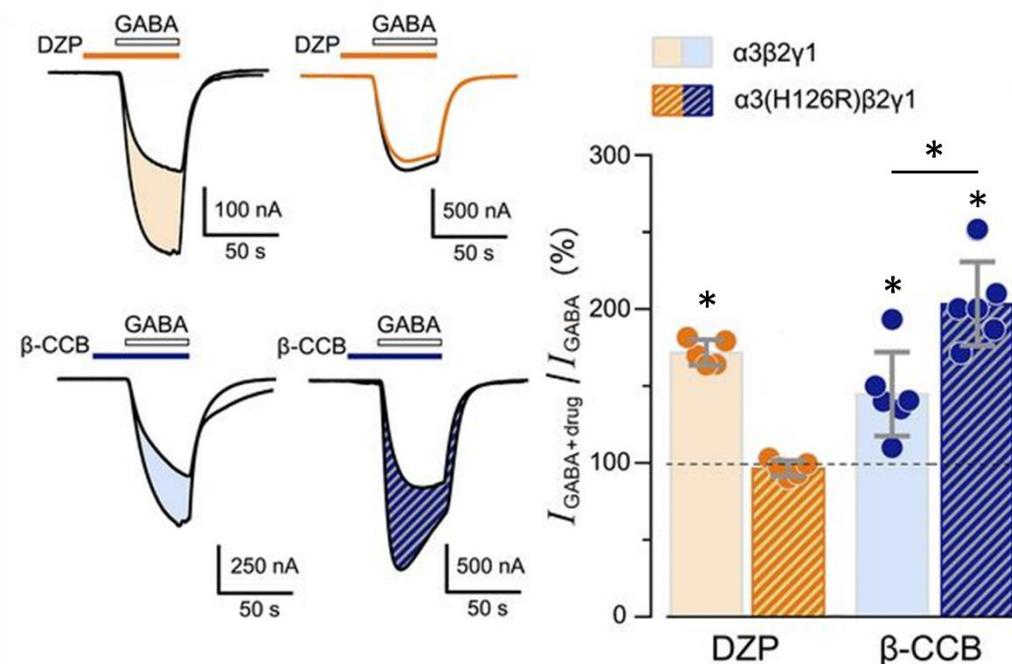


Figura 19. **Sitio clásico de unión a BZDs en el receptor  $\alpha 3\beta 2\gamma 1$  y la potenciación por  $\beta$ -CCB.** Se coaplicaron  $1 \mu\text{M}$  de DZP o  $3 \mu\text{M}$  de  $\beta$ -CCB con  $10 \mu\text{M}$  de GABA para analizar su efecto sobre el sitio de alta afinidad para BZDs. Los trazos ilustran las respuestas obtenidas en los ovocitos a los que se les inyectó el cRNA de las subunidades del receptor nativo  $\alpha 3\beta 2\gamma 1$  (columna izquierda), y en ovocitos inyectados con el mutante  $\alpha 3(H126R)\beta 2\gamma 1$  (columna derecha). Las respuestas promedio obtenidas en 5-6 ovocitos se muestran en el gráfico de barras que indica que se eliminó la potenciación por DZP, mientras que la potenciación por  $\beta$ -CCB se mantuvo en la combinación mutada (la línea al 100% indica la respuesta control de GABA). Todos los efectos de los moduladores fueron estadísticamente significativos frente al grupo de control, con la clara excepción del mutante probado con DZP.  $*P < 0.001$  para las comparaciones entre los valores de amplitud de control frente a los tratados con moduladores, prueba "t" de Student para datos pareados.

Las mutaciones  $\alpha 3(S294I)\beta 2(N265I)\gamma 1(S282I)$  fueron hechas para eliminar los sitios de baja afinidad a BZD ubicados en la región transmembranal (Walters et al., 2000), y este receptor fue expresado heterológamente para explorar su sensibilidad a DZP  $60 \mu\text{M}$  y a  $\beta$ -CCB  $3 \mu\text{M}$ . Estos resultados son ilustrados en la Figura 20, como se observa la potenciación de la respuesta a GABA ( $10 \mu\text{M}$ ) en coaplicación con DZP  $60 \mu\text{M}$  se redujo considerablemente en el receptor  $\alpha 3(S294I)\beta 2(N265I)\gamma 1(S282I)$  en comparación

con la respuesta del receptor nativo  $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ . Los valores observados fueron de  $281.1 \pm 25\%$  para este último y de  $172.3 \pm 10\%$  para el receptor mutado, en este caso la potenciación que persistió probablemente fue debida a la interacción del DZP con el sitio de alta afinidad. Sin embargo, la aplicación de  $\beta$ -CCB al receptor  $\alpha 3(S294I)\beta 2(N265I)\gamma 1(S282I)$  mantuvo el efecto modulador positivo y potenció la respuesta por  $251.6 \pm 10.5\%$  frente al receptor nativo que presentó un aumento de  $160.1 \pm 8\%$  (10 ovocitos). Estos datos apoyan la idea de que en el efecto potenciador de la respuesta a GABA por  $\beta$ -CCB no intervino el sitio clásico de BZD del receptor GABA<sub>A</sub>  $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ , pero tampoco los sitios transmembranales descritos como de baja afinidad para BZD.

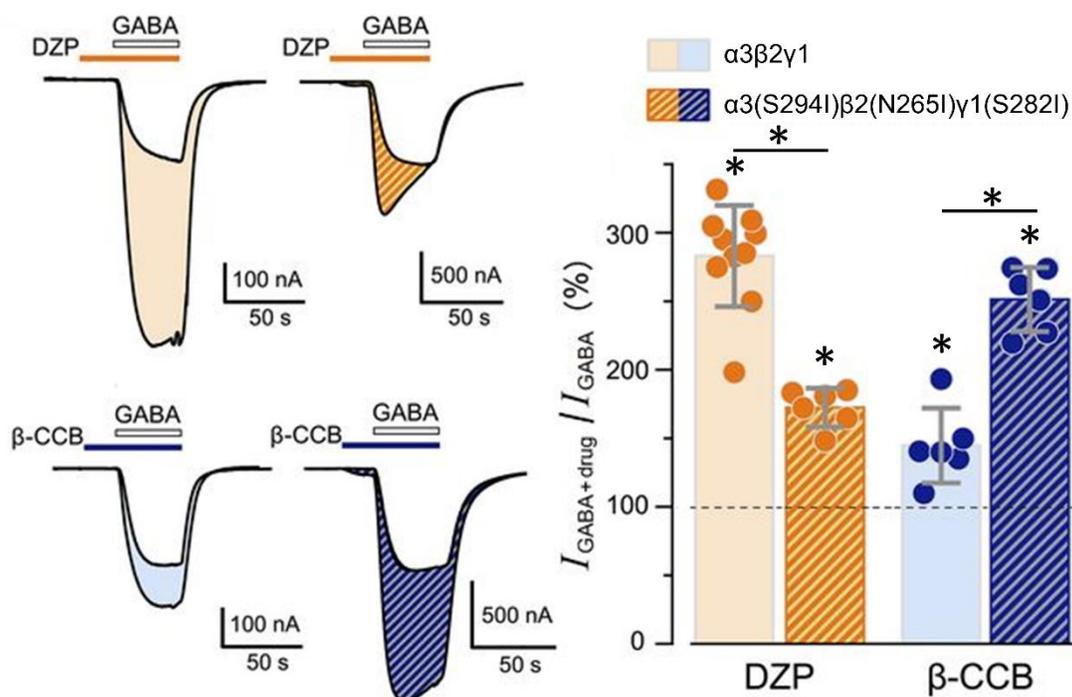


Figura 20. **Sitio de unión de baja afinidad para DZP en el receptor  $\alpha 3\beta 2\gamma 1$  y la potenciación por  $\beta$ -CCB.** Se estudió el efecto de DZP  $60 \mu M$  o  $\beta$ -CCB  $3 \mu M$  coaplicado con GABA  $10 \mu M$  para analizar su efecto en uno de los sitios para DZP de baja afinidad. En la columna de la izquierda, los trazos ilustran las respuestas obtenidas en ovocitos que expresan las subunidades  $\alpha 3\beta 2\gamma 1$  nativas, mientras que el segundo grupo expresa el mutante  $\alpha 3(S294I)\beta 2(N265I)\gamma 1(S282I)$ . Los promedios de las respuestas obtenidas en 10 ovocitos (tres ranas) se muestran en el gráfico de barras que indica que la potenciación por DZP se redujo fuertemente, mientras que el efecto potenciador generado por  $\beta$ -CCB se mantuvo en

la combinación mutada. Todos los efectos de los moduladores fueron estadísticamente significativos frente al grupo donde se aplicó solamente GABA (respuesta 100% señalada por la línea punteada) . \* $P < 0.001$  para las comparaciones entre los valores de amplitud de control frente a los tratados con moduladores, prueba “t” de Student para datos pareados.

---

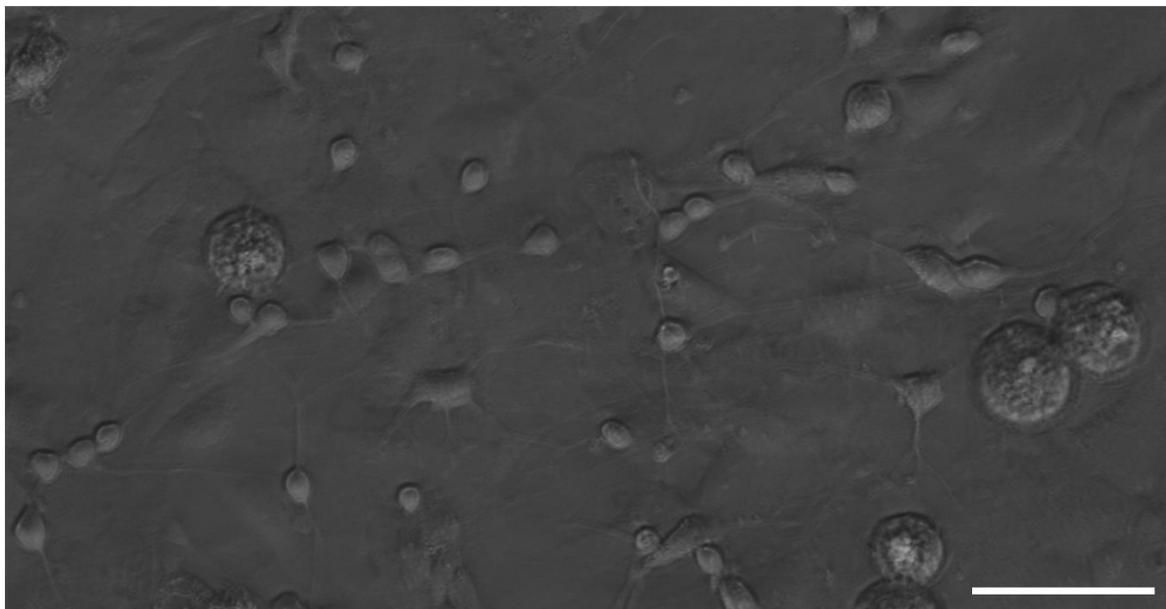
## **7.2 Efecto de la disminución de la expresión de subunidades específicas del GABA<sub>A</sub>R oligodendroglial sobre la respuesta a GABA en OPCs**

Los resultados mostrados hasta ahora confirman la similitud de las características del GABA<sub>A</sub>R endógeno oligodendroglial y el GABA<sub>A</sub>R conformado por las subunidades  $\alpha 3\beta 2\gamma 1$  expresado heterológamente. En los resultados de la sección anterior esta semejanza incluyó una de las características farmacológicas más importantes que presentan estos receptores en los OLs, esto es, que la acción de la  $\beta$ -CCB como potenciador alostérico positivo no requiere del sitio clásico de unión a BZD; aunado a las propiedades en común, mostradas anteriormente (Ordaz, 2017), estos datos apoyan la idea de que el principal GABA<sub>A</sub>R oligodendroglial está conformado por las subunidades  $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ . Otra evidencia que también apoya esta idea, es el hecho de que el análisis transcriptómico de las subunidades expresadas en las células del linaje oligodendroglial también se encuentran en concordancia con la composición propuesta (Cahoy et al., 2008; Larson et al., 2016; ver Fig. 1A y Discusión en Ordaz et al., 2021). Con esta información los resultados que a continuación se describen tienen la finalidad de explorar en los OLs, de manera directa, el efecto que tiene sobre su respuesta a GABA el interferir específicamente la expresión de las subunidades  $\alpha 3$  y  $\gamma 1$ .

Un análisis previo fue requerido para caracterizar las propiedades básicas de las células utilizadas para llevar a cabo los experimentos de interferencia de la expresión utilizando siRNA, esto es necesario porque la metodología requiere del cultivo de las células oligodendrogiales hasta por 4 días, debido a esto, la serie de resultados que se describen a continuación corresponden a experimentos control diseñados para conocer los probables cambios que sufren las células y su respuesta a GABA durante este tiempo en cultivo.

### 7.2.1 Cultivo mixto de células gliales

Las células oligodendrogliales que se utilizaron en este trabajo provienen de un cultivo mixto de células gliales extraídas de las cortezas cerebrales de ratas neonatas. Dicho cultivo mixto está compuesto, principalmente, por una monocapa de astrocitos sobre los que se ubican las OPCs y la microglía (Fig. 21).



---

Figura 21. **Cultivo mixto de células gliales de corteza de rata neonatales.** En la imagen se puede observar OPCs, microglía y la monocapa de astrocitos (7 DIV). Imagen obtenida con un microscopio de contraste de fases. Barra = 50  $\mu\text{m}$ .

---

La microglía fue identificada por su forma redondeada y la presencia de numerosas vacuolas en su citoplasma. Las OPCs fueron las células que en mayor número se observaron en este cultivo, después de los astrocitos, y se caracterizaron por presentar una morfología bipolar, con un soma pequeño y redondeado del que parten dos o tres proyecciones en extremos opuestos del soma. En estas condiciones de cultivo mixto fue posible detectar marcadores moleculares específicos mediante inmunocitoquímica para cada tipo de célula glial. Así, se observó al DIV 5 la presencia predominante de astrocitos (GFAP<sup>+</sup>) y OPCs (NG2<sup>+</sup>) (Fig. 22).

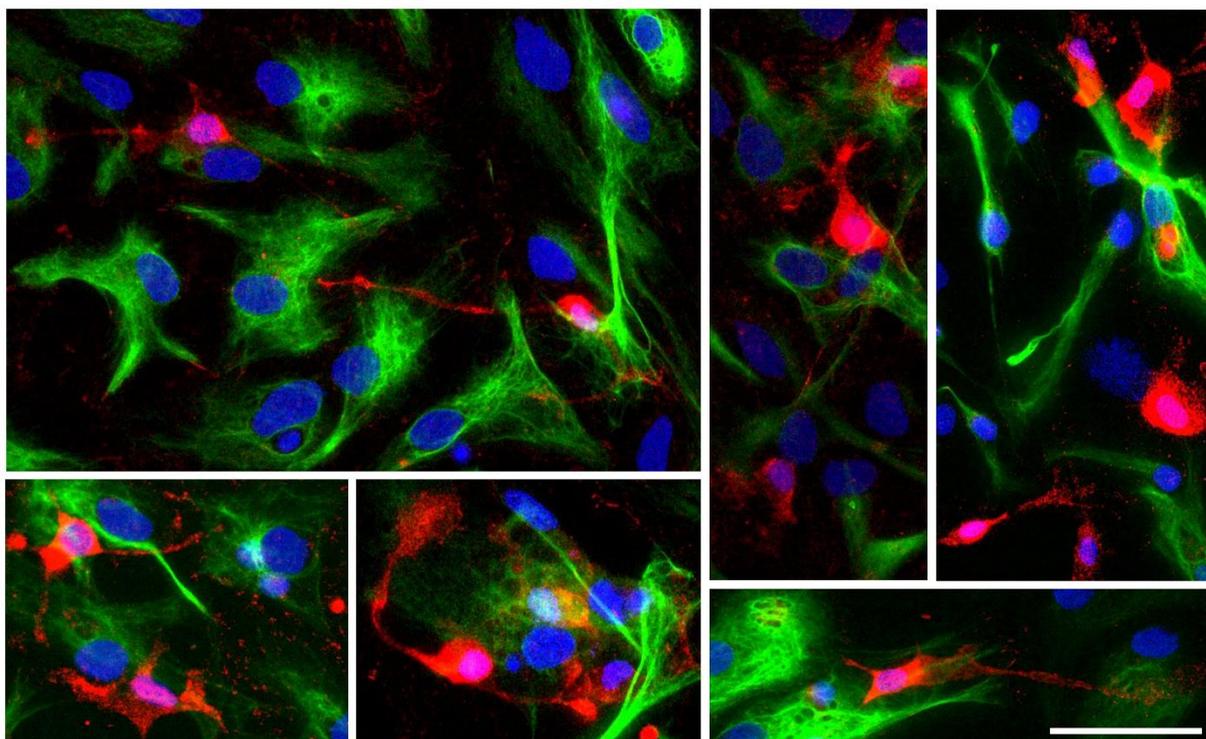
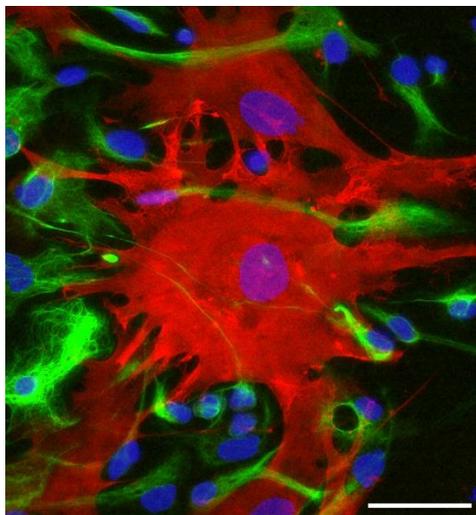


Figura 22. **Imágenes de inmunofluorescencia del cultivo mixto de células gliales de corteza de rata neonatales.** En las imágenes se observan astrocitos (GFAP<sup>+</sup>; color verde), y OPCs (NG2<sup>+</sup>; color rojo). Los núcleos celulares en todas las imágenes están teñidos con DAPI (color azul). La edad de los cultivos es de 5 DIV. Las imágenes fueron adquiridas con un microscopio de epifluorescencia Apotome Zeiss. Barra = 50  $\mu$ m.

También, en estos cultivos fueron observados frecuentemente ( $16 \pm 4.3\%$  del total de células observadas) células NG2<sup>+</sup> que correspondieron con las características descritas para pericitos (Stallcup, 2018). Estas son células contráctiles que se asocian con los capilares, y son parte de la unidad neurovascular, junto con los OLs, los astrocitos y las neuronas, contribuyendo con la regulación del flujo sanguíneo en el SNC y la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (Brown et al., 2019; Girolamo et al., 2019; Palhol et al., 2022)(Fig. 23).



---

Figura 23. **Pericitos en cultivo mixto de células gliales de corteza de rata neonatales.** En la imagen se observan astrocitos (GFAP<sup>+</sup>; color verde), y varios pericitos (NG2<sup>+</sup>; color rojo). Los núcleos celulares están teñidos con DAPI (color azul). La edad de los cultivos es de 5 DIV. Esta imagen fue adquirida en un microscopio de epifluorescencia Apotome Zeiss. Barra = 50  $\mu$ m.

---

En el cultivo mixto, las células con morfología tipo OPC, fueron analizadas para su respuesta a GABA así como la relación dosis-respuesta para el mismo, esto con la finalidad de comparar estas características con las reportadas en células aisladas a partir de otras preparaciones (e.g., Arellano et al., 2016). En cada caso analizado se registró la respuesta a diferentes concentraciones de GABA (3, 10, 30, 100, 300 y 1000  $\mu$ M). Cada aplicación del agonista tuvo una duración de 5 s y se comenzó por la de menor concentración de GABA. Entre una aplicación y la siguiente las células fueron lavadas (30 s) con SEA. Como se muestra en los trazos ilustrados en la Figura 24A, las OPCs en los cultivos mixtos presentaron respuesta a GABA en un rango de 0.98-4.07 nA (con una media =  $1.91 \pm 0.80$  nA) en una concentración del neurotransmisor de 1 mM, la respuesta mostró desensibilización en concentraciones mayores a 30  $\mu$ M de GABA. La  $EC_{50}$  estimada a partir de la curva D-R para GABA fue de  $64 \pm 1.64$   $\mu$ M (15 células) (Fig. 24B).

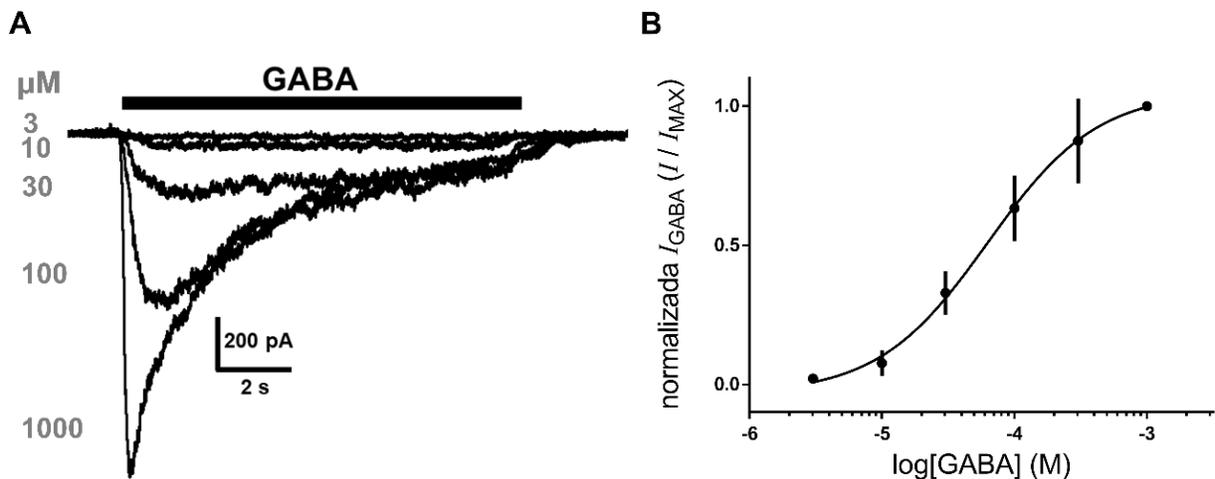


Figura 24. **Relación dosis-respuesta a GABA del receptor endógeno expresado en células tipo OPCs en cultivo mixto de células gliales.** (A) Trazos de las respuestas a diferentes concentraciones de GABA del receptor GABA<sub>A</sub>, expresado en las células con morfología tipo OPCs. En este y subsiguientes trazos las barras de color negro (o gris), encima de cada registro indica la aplicación de GABA (u otras sustancias) en las diferentes concentraciones indicadas. (B) Curva dosis-respuesta a GABA del receptor endógeno. Los puntos representan el promedio de la corriente normalizada para cada concentración de GABA y las barras representan la S.D. (n = 15 células).

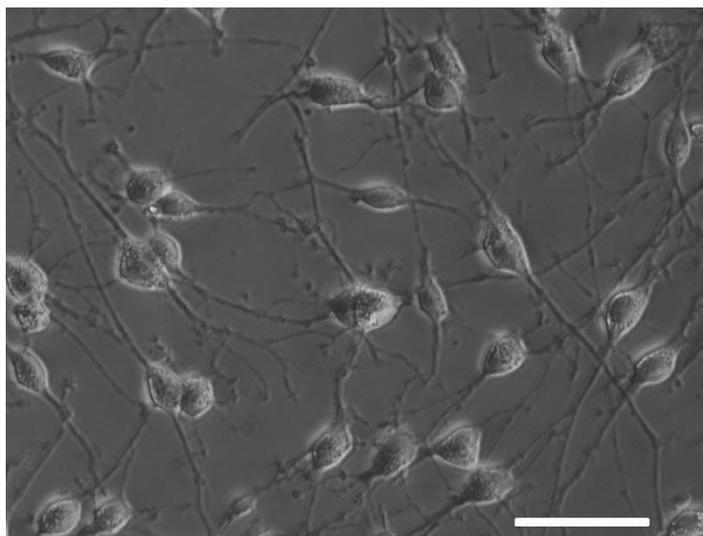
### 7.2.2 Caracterización de las OPCs aisladas

Una vez demostrada la expresión de la respuesta a GABA desde las condiciones iniciales de aislamiento, las OPCs fueron purificadas a partir del cultivo mixto y mantenidas durante cuatro días en medio de proliferación, tiempo en el cual sus características fueron seguidas para monitorear su estadio de desarrollo y su capacidad de mantener la expresión de la respuesta a GABA.

Las OPCs mantenidas *in vitro* en medio de proliferación fueron caracterizadas utilizando varios parámetros. Primero, fue medida la capacidad de proliferación de las células del linaje en estas condiciones *in vitro*, segundo, fue analizada la expresión de marcadores moleculares para caracterizar los diferentes estadios de diferenciación de las células oligodendrogiales y en conjunto con su perfil electrofisiológico, que en general, coincidió con el descrito para células con el mismo grado de diferenciación

celular (Agathou & Káradóttir, 2019; Arellano et al., 2016; Kamen & Káradóttir, 2021; Lin & Bergles, 2004a; Moura et al., 2022; Spitzer et al., 2019). Dicha caracterización se realizó entre 1 DIV y 4 DIV una vez que las células fueron aisladas e incubadas en medio de proliferación, esto permitió definir una ventana de tiempo de cuatro días en la que las características monitoreadas de las OPCs *in vitro* permanecieron sin cambios.

El grado de proliferación de las OPCs aisladas mantenidas en medio de proliferación (Fig. 25), fue cuantificado entre DIV 2 al 4 a partir del número de núcleos celulares teñidos con DAPI presentes (Fig. 26). Como se ilustra en la Figura 26, la densidad total de núcleos (i.e. densidad de células) se incrementó de manera significativa, así a 4 DIV la densidad de núcleos aumentó de 265 /mm<sup>2</sup> en 2 DIV a más de 1200 /mm<sup>2</sup> (Fig. 26).



---

Figura 25. **Cultivo primario de célula precursoras de oligodendrocitos corticales.** En la imagen de pueden observar a los OPCs mantenidos en medio de proliferación (2 DIV). Imagen obtenida con un microscopio de contraste de fases. Barra = 50  $\mu$ m.

---

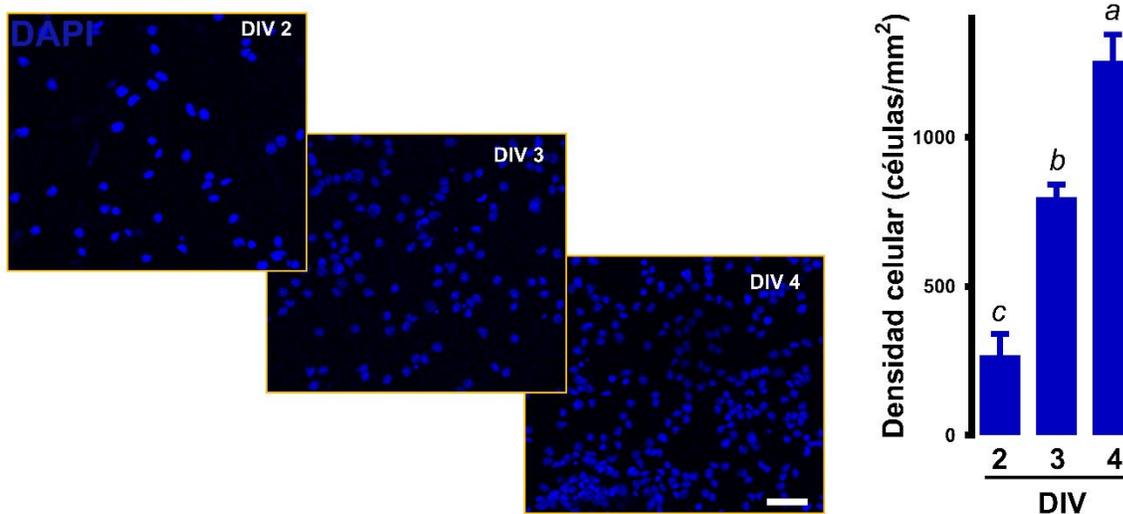


Figura 26. **Proliferación de OPCs en cultivo.** En azul (DAPI) se muestran los núcleos de OPCs corticales en cultivo, entre los días 2 y 4 *in vitro*. La gráfica muestra la densidad celular correspondientes a cada día analizado. Los valores aparecen representados como media  $\pm$  S.D. (desviación estándar). El análisis de varianza (ANOVA de una vía) muestra que entre los DIV analizados hay diferencias estadísticamente significativas. La prueba *post hoc* de Tukey muestra que hay tres grupos diferentes (a, b y c) entre sí que corresponden con cada DIV. Barra = 50  $\mu$ m.

Para definir la proporción de células del linaje oligodendroglial en diferentes estadios de maduración fue realizado un análisis de expresión de marcadores específicos mediante inmunocitoquímica. Los marcadores que fueron empleados incluyeron: PDGFR $\alpha$ , NG2, Olig2, O4, MBP y GFAP. Las preparaciones teñidas fueron entonces visualizadas con microscopía confocal o con epifluorescencia desde 2 DIV a 4 DIV. Para cada marcador fue cuantificado el total de células positivas y expresado como el porcentaje (media  $\pm$  S.D.) con respecto al total de células que fueron observadas en cada campo (cuantificadas por la tinción con DAPI). El análisis de expresión (% de células positivas) indicó que los marcadores PDGFR $\alpha$ , NG2 y Olig2, mantuvieron niveles de expresión cercanos al 85% durante el período en cultivo analizado, mientras que MBP y GFAP, no fueron detectados. Además, el porcentaje de células O4<sup>+</sup>, mostró un aumento, que fue estadísticamente significativo hacia 4 DIV (Fig. 27).

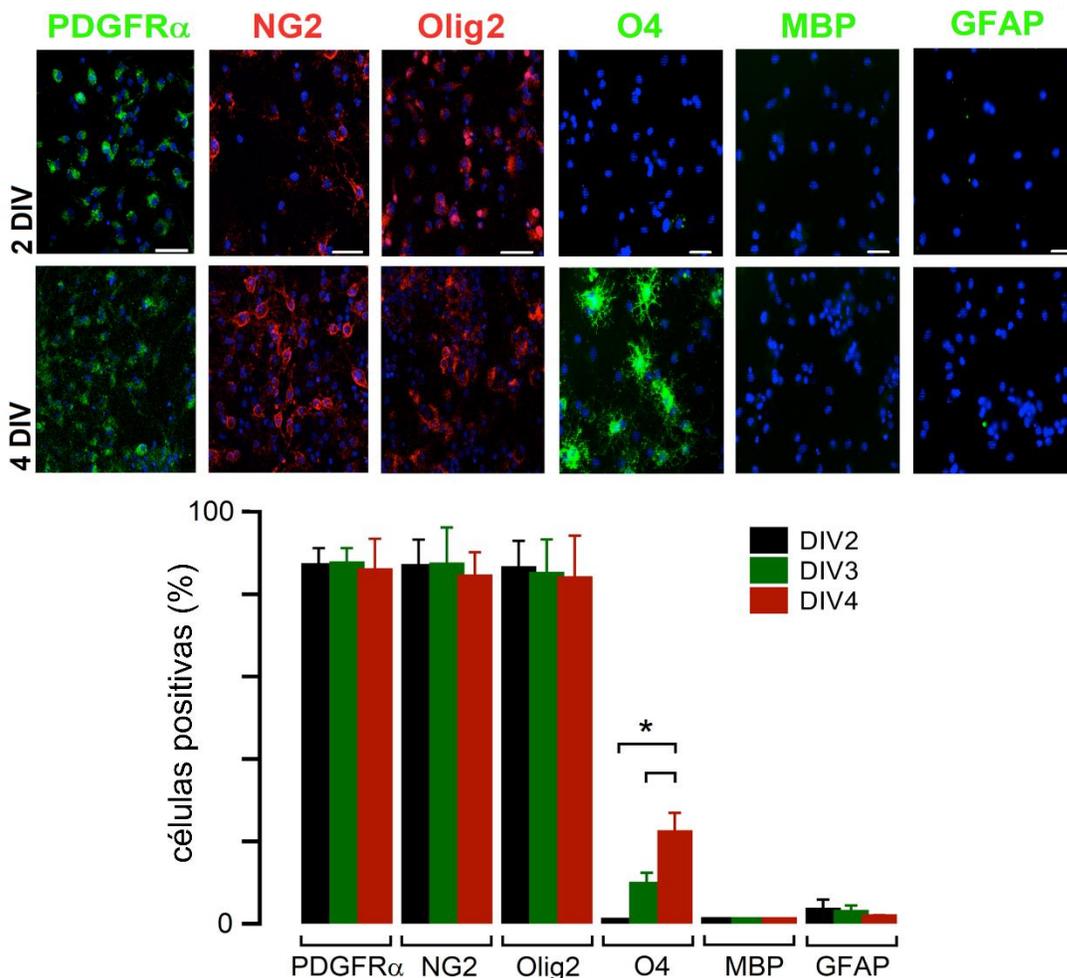


Figura 27. **Expresión de marcadores gliales en OPCs de 2 DIV a 4 DIV en medio de proliferación.**

Las imágenes en los paneles superiores muestran campos representativos de OPC mantenidos en cultivo y procesados inmunocitoquímicamente a 2 DIV (primera fila) o 4 DIV (segunda fila). Se visualizaron los marcadores utilizados (indicados en la parte superior) (ya sea en rojo o verde) por microscopía confocal o epifluorescencia. Las células positivas para cada marcador se contaron y expresaron como % de células (media  $\pm$  S.D.) con respecto al número total de células (núcleos marcados con DAPI) en los campos representativos. El análisis de expresión (% de células) de 2 DIV a 4 DIV en el gráfico de columnas indicó que los marcadores específicos para los OPC, como PDGFR $\alpha$ , NG2 y Olig2, mantuvieron niveles de expresión cercanos al 85% durante todo el período en cultivo, mientras que MBP y GFAP, marcadores de OL mielinizantes y astrocitos, respectivamente, no fueron detectados. Además, el O4 mostró un aumento en su expresión que se volvió estadísticamente significativa hacia 4 DIV. \* $P < 0,0001$  4 DIV en comparación con 2 DIV y 3 DIV, análisis de varianza (ANOVA de una vía) seguido de una prueba *post hoc* de Tukey. Barras = 50  $\mu$ m.

Las características eléctricas de estas células fueron monitoreadas mediante la técnica de control de voltaje mantenidas a un potencial de membrana de -80 mV, y aplicando un protocolo de pulsos de voltaje de -140 a +60 mV en incrementos de 20 mV. En la Figura 28 se muestran trazos representativos de la respuesta eléctrica de las células a este tipo de estimulación, se observa la generación de corrientes entrantes de baja amplitud en potenciales hiperpolarizantes y la presencia de corrientes salientes robustas en potenciales despolarizantes. Esto se muestra cuantificado en la curva I/V construida con la corriente máxima normalizada con respecto a la capacitancia de cada célula ( $I_m / C_m$ ) ( $\pm$  S.D.) y medida para cada pulso de voltaje aplicado en 30 células entre los 2 DIV y 4 DIV (Fig. 28).

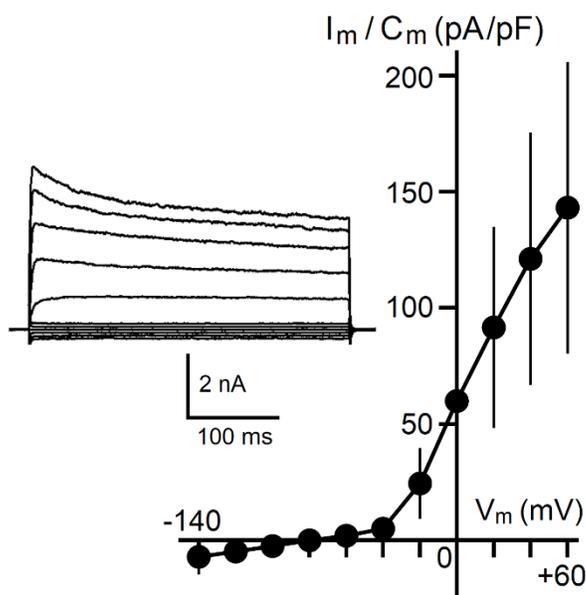


Figura 28. **Perfil electrofisiológico de OPCs en medio de proliferación.** Relación I/V de OPC a 2-4 DIV en medio de proliferación. Los trazos ilustran la respuesta eléctrica de las células a la aplicación de un protocolo de pulsos de voltaje de -140 a +60 mV, aplicados en pasos crecientes de 20 mV, y mantenidas a un potencial de membrana de -80 mV. Los puntos representan la corriente máxima normalizada ( $I_m/C_m$ ) ( $\pm$  S.D.) en cada potencial registrada en 30 células.

Estos resultados indican que las células aisladas a partir del cultivo mixto glial, y mantenidas en medio de proliferación entre 2 DIV y 4 DIV, corresponden

eléctricamente con células precursoras de oligodendrocitos apoyando los resultados del análisis realizado con inmunocitoquímica. La ventana de tiempo hasta el día 4 *in vitro* proporcionaría entonces el tiempo necesario para seguir los posibles cambios inducidos por la aplicación de la técnica de interferencia de genes, por lo que a continuación fue realizado un análisis detallado de la expresión de subunidades del receptor GABA<sub>A</sub>, así como de las características farmacológicas y funcionales de la respuesta a GABA de las OPCs mantenidas en el medio de proliferación.

### 7.2.3 Respuesta a GABA de OPCs mantenidas *in vitro*

Con el fin de analizar la expresión de los mRNA que codifican para los genes correspondientes a las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\gamma 1$  y  $\gamma 3$  del receptor GABA<sub>A</sub> en células oligodendrogliales, se extrajo el RNA de OPC DIV4 y por medio de una RT-PCR con oligonucleótidos específicos para las subunidades, se determinó dicha expresión.

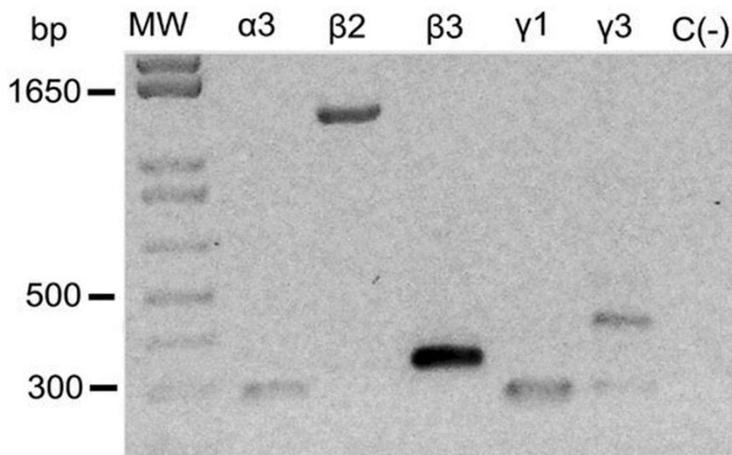


Figura 29. **Expresión de mRNAs de subunidades GABA<sub>A</sub> en OPCs en medio de proliferación.** El gel muestra los productos obtenidos de la amplificación de secuencias codificantes de las subunidades indicadas a partir de cDNA de OPCs DIV4. Las longitudes de los fragmentos esperados son de 266, 1311, 354, 231 y 404 pares de bases, y corresponden a las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\gamma 1$  y  $\gamma 3$ , respectivamente. bp, pares de bases; MW, marcador de peso molecular; C(-), control negativo de la reacción (sin cDNA).

Los resultados de este análisis por RT-PCR mostraron que los mRNAs que codifican para las subunidades antes mencionadas se expresan en las OPCs aisladas. Las secuencias obtenidas fueron idénticas al mRNA expresado en otros tipos celulares, incluyendo el de neuronas. Así, la subunidad  $\alpha 3$  fue idéntica a la secuencia NP\_058765.3 (Malherbe et al., 1990). Las secuencias para  $\beta 2$  y  $\beta 3$  fueron idénticas a NP\_037089.1 (Ymer et al., 1989) y NP\_058761.1 (Ymer et al., 1989), respectivamente, mientras que  $\gamma 1$  y  $\gamma 3$  fueron idénticas a las secuencias NP\_542153.1 (Ymer et al., 1990) y NP\_077346.3 (Knoflach et al., 1991), respectivamente.

A continuación, por medio de inmunocitoquímica fue analizada la expresión de las proteínas de las subunidades  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$  y  $\gamma 2$  del receptor GABA<sub>A</sub> en las OPCs en medio de proliferación (3 DIV). Fue incluida en este análisis  $\alpha 2$  ya que se ha reportado que su secuencia codificante está entre las  $\alpha$  que más nivel de expresión tiene, junto a la  $\alpha 3$  en las células NG2<sup>+</sup> (Larson et al., 2016) y  $\gamma 2$  ya que es la subunidad  $\gamma$  que generalmente está presente en los receptores neuronales sinápticos (Essrich et al., 1998; Schweizer et al., 2003) y fue mostrada su expresión en las células NG2<sup>+</sup> corticales de ratones neonatos (Balía et al., 2015). Los resultados mostraron que las OPCs expresaron todas las subunidades antes mencionadas, con la excepción de la subunidad  $\gamma 2$  (Fig. 30). Previamente, la especificidad de los anticuerpos primarios utilizados en este estudio fue confirmada por medio de inmunocitoquímicas realizadas tanto en ovocitos que expresaban heterológicamente al receptor  $\alpha 3\beta 2\gamma 1$  como en cultivos primarios de neuronas corticales. Ambas preparaciones fueron utilizadas como controles positivos de la expresión de las proteínas a las que están dirigidos los anticuerpos primarios estudiados (ver Anexos 2 y 3).

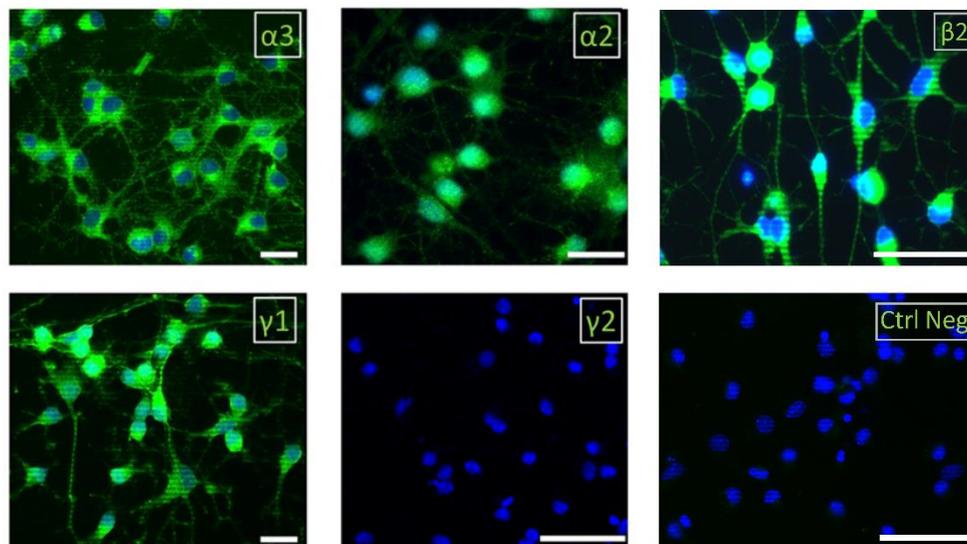


Figura 30. **Expresión de subunidades GABA<sub>A</sub>R en OPCs mantenidos en medio de proliferación.**

Las imágenes muestran campos representativos de OPCs mantenidas en cultivo y procesadas inmunocitoquímicamente donde se observa la señal de fluorescencia donde se localiza un anticuerpo específico dirigido contra las proteínas de la subunidad GABA<sub>A</sub>R (en verde) como se indica en cada panel, y los núcleos celulares están marcados con DAPI (azul). Barras = 50  $\mu$ m.

Una vez comprobada la expresión de subunidades GABA<sub>A</sub> se procedió al estudio de las características de la respuesta al neurotransmisor. Primero, fue caracterizada la relación D-R para GABA y posteriormente se llevó a cabo un análisis de su perfil farmacológico, con la finalidad de poder comparar estas propiedades con las reportadas previamente en OLs (Arellano et al., 2016). El perfil farmacológico fue definido por los efectos observados de 4 moduladores sobre la respuesta a GABA, estos fueron: 1) El Zn<sup>2+</sup>, se sabe que el receptor oligodendroglial a GABA de tipo A es sensible a este catión, de tal forma que en una concentración de alrededor de 10  $\mu$ M, inhibe el 50% de la respuesta a 10-30  $\mu$ M GABA en oligodendrocitos; 2) El indiplon (PAM cuando se une al sitio de benzodiazepinas si está presente la subunidad  $\gamma$ 2) que no afecta al GABA<sub>A</sub>R oligodendroglial; 3) La benzodiazepina clásica diazepam, un potenciador de la respuesta a GABA en oligodendrocitos y, por último; 4) la  $\beta$ -carbolina,  $\beta$ -CCB, que se ha descrito que actúa como agonista inverso en el receptor neuronal,

pero que en el receptor endógeno oligodendroglial actúa como potenciadora de la respuesta a GABA.

Primero, fue realizado el análisis de la relación D-R a GABA en estas células en cultivo. Para esto la respuesta a GABA fue monitoreada en las OPCs (2-4 DIV) en diferentes concentraciones del neurotransmisor tal y como se ilustra en los trazos de la Figura 31A. En general, fue monitoreada la respuesta en las concentraciones de GABA de 1, 10, 30, 100, 300 y 1000  $\mu\text{M}$  ( $n = 31$  células).

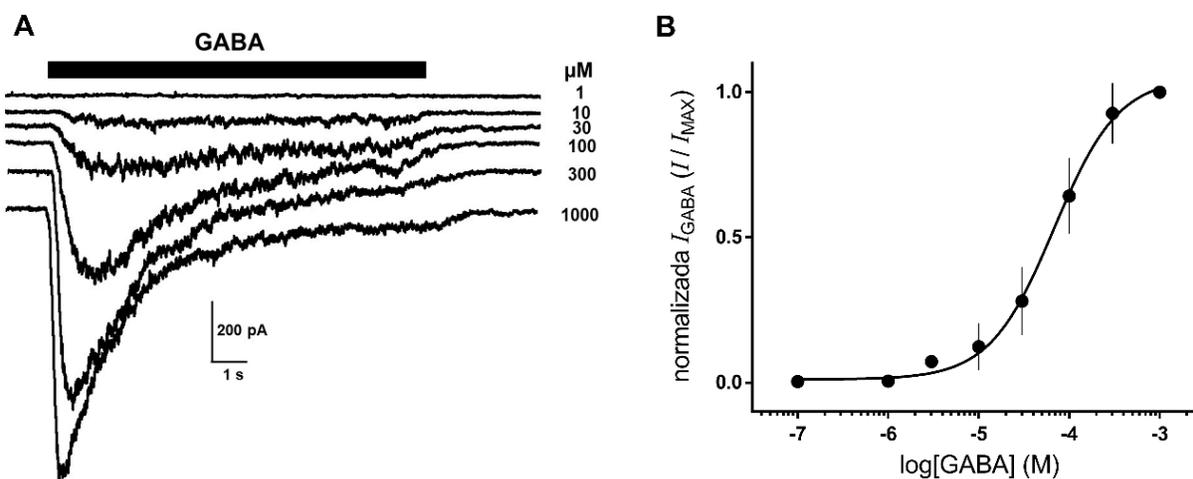


Figura 31. **Relación dosis-respuesta a GABA del receptor endógeno expresado en OPCs mantenidas entre 2 y 4 DIV en medio de proliferación.** (A) Trazos de las respuestas a diferentes concentraciones, como se indica, de GABA del receptor  $\text{GABA}_A$ , expresado en las OPCs. (B) Curva dosis-respuesta a GABA del receptor endógeno. Los puntos representan el promedio de la corriente normalizada para cada concentración de GABA y las barras representan la S.D. ( $n = 31$  células).

Como se observa las células presentaron respuesta a las diferentes concentraciones de GABA, el umbral de la respuesta parece estar cercano a 1  $\mu\text{M}$ , y la respuesta mostró desensibilización a partir de concentraciones cercanas a 30  $\mu\text{M}$  de GABA. La curva D-R obtenida permitió estimar un valor de  $\text{EC}_{50}$  a GABA de  $85.2 \pm 4.42 \mu\text{M}$  (Fig. 31B). Estas características concuerdan con las observadas previamente en otros estudios (Arellano et al., 2016; Ordaz, 2017).

Posteriormente, fue evaluado el efecto del  $Zn^{2+}$  sobre la respuesta a GABA de las OPCs. Para eso se construyó la curva de la relación D-R para la inhibición por  $Zn^{2+}$  coaplicando una de diferentes concentraciones de este catión (0.1, 1, 10, 30, 100 y 1000  $\mu M$ ) junto con GABA en una concentración de 80  $\mu M$  cercana a la  $EC_{50}$  del receptor. Después de una aplicación de GABA control en ausencia de  $Zn^{2+}$ , la célula bajo registro fue lavada por 30 s con SEA, y una segunda aplicación consistió en una breve preincubación por 2 s perfundiendo la menor concentración de  $Zn^{2+}$ , inmediatamente después fue perfundida la coadministración de  $Zn^{2+}$  (a la misma concentración que la preincubación) con 80  $\mu M$  GABA durante 10 s tal y como se ilustra en los trazos de la Figura 32A. Este protocolo se repitió de forma sucesiva para las restantes cinco concentraciones de  $Zn^{2+}$  que fueron utilizadas en este análisis.

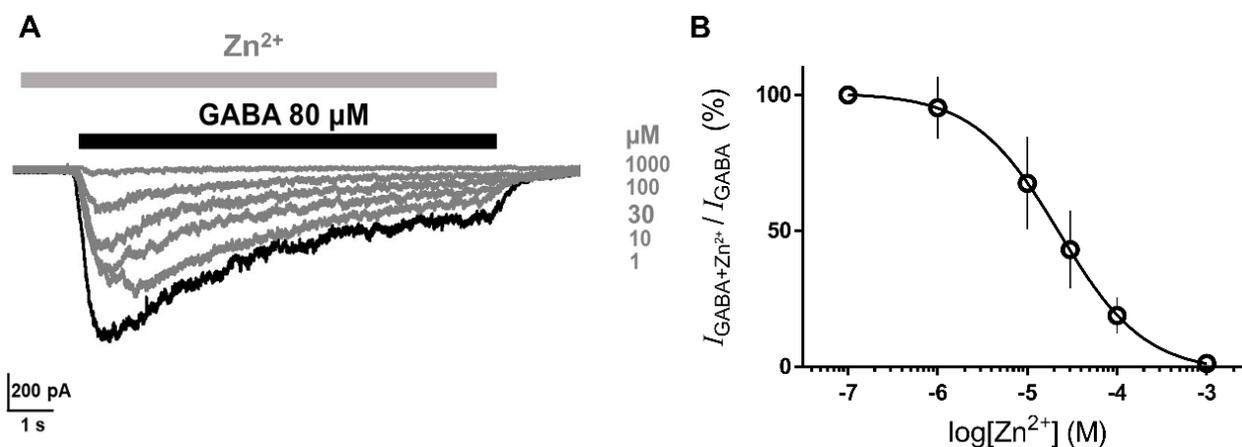


Figura 32. **Curvas dosis-respuesta a  $Zn^{2+}$  de OPCs mantenidos en medio de proliferación.** (A) Registros representativos obtenidos con la técnica de control de voltaje. (B) La curva de inhibición de la respuesta a GABA provocada por  $Zn^{2+}$  se realizó mediante la aplicación simultánea de diferentes concentraciones de  $Zn^{2+}$ , como se indica (trazos en gris), con 80  $\mu M$  de GABA (trazo en negro), y la corriente medida en cada caso fue normalizada a la obtenida en ausencia de  $Zn^{2+}$ . Los puntos representan el promedio de la corriente normalizada para cada concentración de  $Zn^{2+}$  y las barras representan la desviación estándar. La  $IC_{50}$  de  $Zn^{2+}$  obtenida es de  $20.1 \pm 4.24 \mu M$  (n=10 células).

En cada una de ellas, las respuestas fueron normalizadas con respecto a la respuesta obtenida en ausencia de  $Zn^{2+}$  ( $I_{GABA}$ ) mediante la siguiente fórmula:  $I_{GABA+Zn^{2+}}/I_{GABA}$ , donde  $I_{GABA+Zn^{2+}}$  es el valor de la amplitud de la corriente en las diferentes concentraciones de  $Zn^{2+}$ . Con estos datos normalizados se procedió a ajustar los puntos experimentales a una curva D-R (Fig. 32B), que proporcionó un valor de  $IC_{50}$  para  $Zn^{2+}$  de  $20.1 \pm 4.24 \mu M$ .

Para los restantes tres moduladores fue evaluado su efecto sobre la respuesta a GABA de la siguiente manera: Primero fue medida la amplitud de la respuesta control provocada por  $10 \mu M$  de GABA. Después, las células fueron lavadas de 30 a 60 s con SEA, en una aplicación subsecuente, la célula fue preincubada por 2 s con uno de los moduladores ( $10 \mu M$ ) probados, e inmediatamente después fue perfundida la coaplicación del modulador (a la misma concentración que la preincubación) con  $10 \mu M$  GABA durante 10 s (Fig. 33A). Este protocolo fue utilizado para estudiar el efecto de los 4 moduladores (indiplon, DZP,  $\beta$ -CCB, y  $Zn^{2+}$ ) en cada célula registrada. La respuesta monitoreada en presencia de cada modulador, fue normalizada con respecto a su respuesta control ( $10 \mu M$  GABA sin modulador).

Como puede ser observado en la Figura 33B, el receptor endógeno de las OPCs mantenidas *in vitro* mostró una baja o nula sensibilidad a indiplon ( $121.8 \pm 17.3\%$ ). Sin embargo, su respuesta a GABA fue potenciada tanto por la benzodiazepina clásica ( $202.2 \pm 21.8\%$ ), como también por la  $\beta$ -carbolina  $\beta$ -CCB ( $227.3 \pm 59.1\%$ ). Además, fue inhibida la respuesta a su agonista por  $Zn^{2+}$  (al  $67.2 \pm 5.4\%$ ).

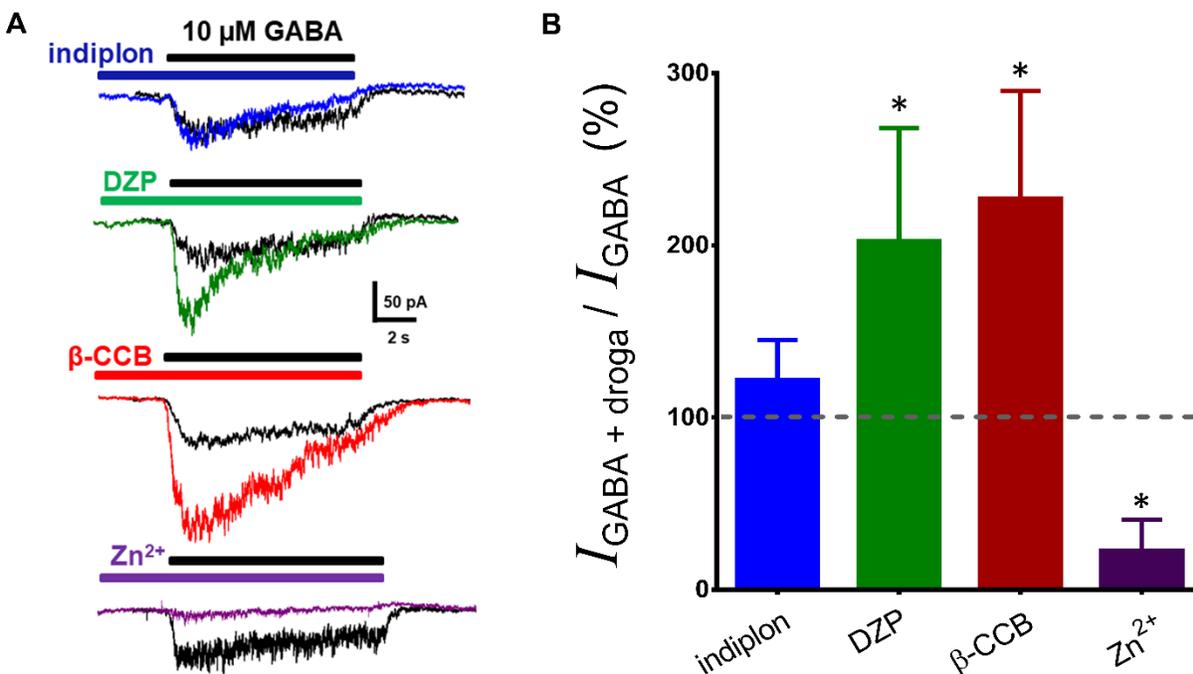


Figura 33. Patrón funcional y farmacológico del receptor  $GABA_A$  expresado en OPCs mantenidas en medio de proliferación entre 2 y 4 DIV. (A) Los trazos indican el efecto provocado en la respuesta del receptor cuando se aplican de forma simultánea GABA (10  $\mu$ M) y diferentes moduladores alostéricos (10  $\mu$ M) del receptor de tipo A. Para cada modulador ( $n =$  entre 15 y 18 células por modulador) se muestra la respuesta control inducida por GABA (trazo de color negro) y el efecto de la aplicación simultánea. (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. \* $P < 0.001$  para las comparaciones entre los valores de amplitud de control frente a los tratados con moduladores, prueba “t” de Student para datos pareados.

Este perfil farmacológico correspondió con el que se conoce del receptor a  $GABA_A$  endógeno de oligodendrocitos reportado previamente (Arellano et al., 2016). Los experimentos descritos fueron realizados en células oligodendrogiales mantenidas durante 2, 3 y 4 DIV. En este espacio de tiempo no se encontraron diferencias estadísticas en el perfil farmacológico y funcional de las respuestas a GABA.

### 7.2.4 Silenciamiento específico de las subunidades GABA<sub>A</sub>R endógenas $\alpha 3$ ó $\gamma 1$ en OPCs

Una vez que el análisis de la expresión del GABA<sub>A</sub>R en las células aisladas y mantenidas en medio de proliferación mostraron que las respuestas a GABA parecen estables por 4 días, y que, además, sus características fueron esencialmente las mismas en este lapso, los siguientes experimentos fueron desarrollados para interferir específicamente con la expresión de subunidades del GABA<sub>A</sub>R. Dado que las subunidades  $\alpha 3$  y  $\gamma 1$  podrían definir varias características importantes del receptor, fueron realizados los siguientes experimentos para confirmar de manera directa su participación en la conformación del receptor. Para ello, se realizaron transfecciones con siRNAs específicos para cada subunidad en las OPCs que fueron aisladas del prosencéfalo de ratas neonatas, y mantenidas en medio de proliferación como lo describimos arriba. La ventana de tiempo de 4 días *in vitro* fue adecuada para realizar este análisis, ya que el efecto de silenciamiento máximo de la proteína respectiva tuvo una temporalidad de 48 h. Por lo tanto, las OPCs en el día 1 *in vitro* fueron transfectadas con el siRNA específico contra las subunidades  $\alpha 3$  ó  $\gamma 1$ , y se comparó el efecto de esta manipulación con respecto a las células que fueron transfectadas con un siRNA no específico (Control), y utilizando a células no tratadas como referencia.

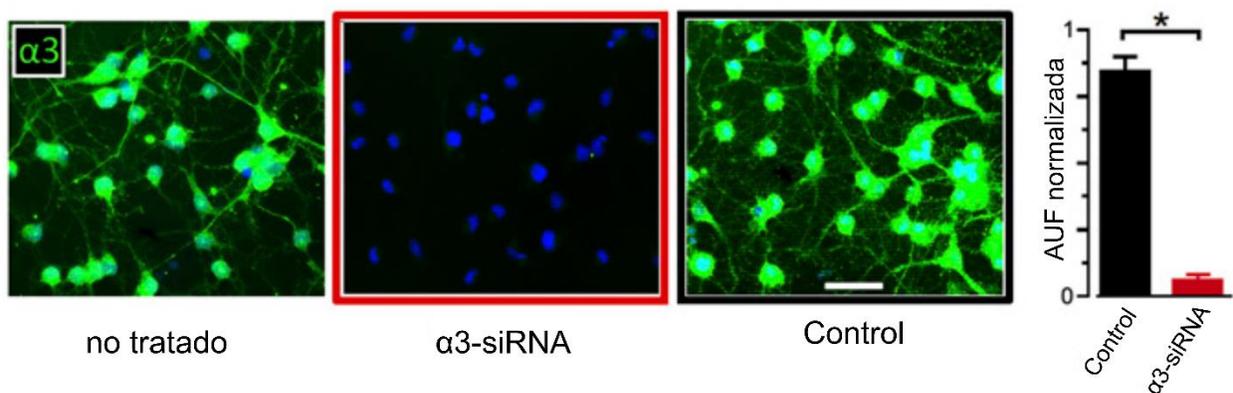


Figura 34. **Silenciamiento de la expresión de la subunidad GABA<sub>A</sub>R  $\alpha 3$  en OPCs.** Las imágenes ilustran la inmunodetección de la subunidad  $\alpha 3$  (en verde, núcleos en azul) en OPC mantenidas en cultivo. El primer panel representa células sin tratamiento (no tratado). Las células designadas como  $\alpha 3$ -siRNA se transfectaron con secuencias de interferencia específicas contra la subunidad, mientras que las células control se transfectaron con secuencias que no son complementarias a ninguna secuencia de

RNA en una célula de mamífero. Todos los grupos corresponden a las células 72h después del proceso de transfección. La expresión estimada de  $\alpha 3$  en AUF se normalizó con respecto al grupo no tratado como se muestra en la gráfico de barras (promedio de siete campos de tres cultivos transfectados) (media  $\pm$  S.D.). \* $P < 0.001$  para comparaciones entre las células del control frente a las células tratadas con  $\alpha 3$ -siRNA, prueba "t" de Student. Barra = 50  $\mu$ m.

Como se ilustra en las imágenes de la Figura 34, en verde indica la expresión de la subunidad  $\alpha 3$  en las OPCs, la transfección de  $\alpha 3$ -siRNA redujo fuertemente ( $93.7 \pm 2\%$ ) la marca verde en las células y por consiguiente, la expresión de la subunidad respectiva tal y como lo muestra la inmunodetección correspondiente, mientras que la transfección control con siRNA inespecífico no provocó una disminución notable de la expresión de la subunidad  $\alpha 3$ .

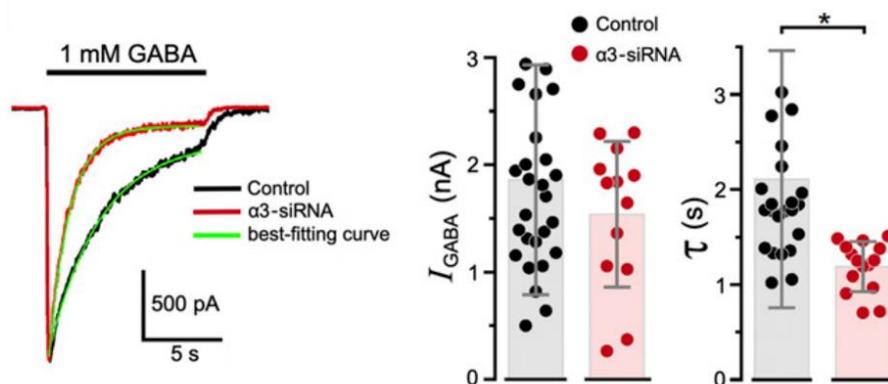


Figura 35. **Efecto del silenciamiento de la subunidad  $GABA_A R \alpha 3$  sobre la amplitud y la cinética de la respuesta a GABA en OPCs.** Se muestra el análisis de las respuestas provocadas por 1mM GABA en células de control y tratadas con  $\alpha 3$ -siRNA. Los trazos corresponden a registros típicos en ambas condiciones donde la cinética de desensibilización se ajustó a una curva exponencial para estimar la constante de decaimiento ( $\tau$ ), y los gráficos muestran la respuesta de amplitud y los valores  $\tau$  para cada grupo, donde cada punto de datos representa la respuesta de una célula. La media  $\pm$  S.D. se muestra en gris en cada caso. \* $P < 0.001$  para comparaciones entre las células del control frente a las células tratadas con  $\alpha 3$ -siRNA, prueba "t" de Student.

La amplitud de corriente generada por GABA 1 mM no mostró cambios significativos entre estos grupos de células ( $1795.4 \pm 1393$  pA en el control, vs.  $1539.3 \pm 653$  pA en el grupo  $\alpha 3$ -siRNA), sin embargo, la respuesta de GABA mostró tres cambios importantes. Primero, las células tratadas con  $\alpha 3$ -siRNA mostraron un aumento en la tasa de desensibilización de la respuesta a GABA, como se ilustra en la Figura 35. Esta muestra que las células de control mostraron una respuesta de desensibilización ajustada a un decaimiento exponencial con una constante de tiempo media de  $2109.2 \pm 1321$  ms, mientras que las células transfectadas presentaron constantes de tiempo de desensibilización con un promedio de  $1190 \pm 253$  ms (15-25 células en cada grupo; de 4 transfecciones distintas).

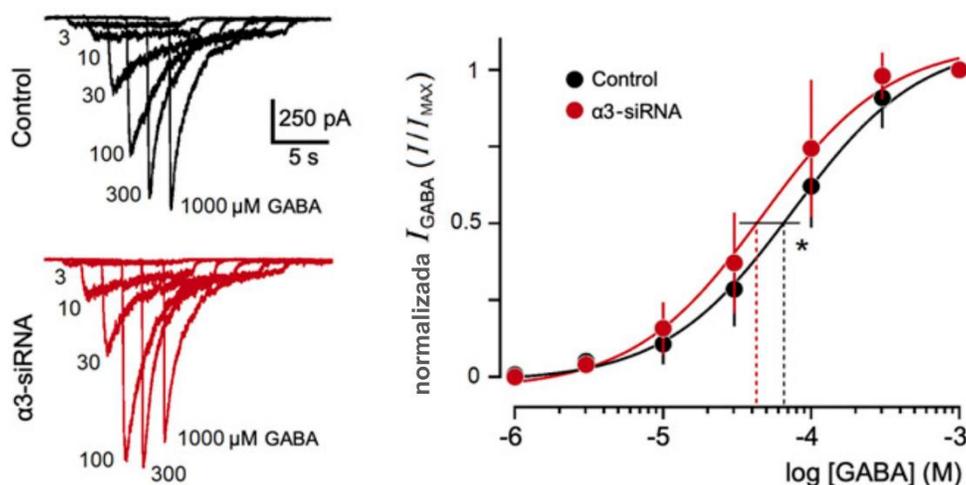


Figura 36. **Efecto del silenciamiento de la subunidad GABA<sub>A</sub>R  $\alpha 3$  sobre la sensibilidad a GABA en OPCs.** Los trazos ilustran la respuesta eléctrica de células (control y tratadas con  $\alpha 3$ -siRNA) ante la aplicación de diferentes concentraciones de GABA (como se indica); en el gráfico, cada punto representa la media  $\pm$  S.D. de la respuesta normalizada en 10 células. Las líneas son las que mejor se ajustan a las curvas D-R y las líneas discontinuas indican el EC<sub>50</sub> correspondiente a cada grupo experimental. \* $P < 0.001$  para comparaciones entre las células del control frente a las células tratadas con  $\alpha 3$ -siRNA, prueba "t" de Student.

Una segunda diferencia fue que las curvas dosis-respuesta construidas para estos dos grupos experimentales (Fig. 36) mostraron que la interferencia en la expresión de la subunidad  $\alpha 3$  provocó un aumento en la sensibilidad del receptor expresado y la  $EC_{50}$  control disminuyó de  $75.1 \pm 4.12 \mu\text{M}$  a  $46.6 \pm 3.8 \mu\text{M}$  en las células transfectadas con  $\alpha 3$ -siRNA ( $n = 10$  células), diferencia que fue estadísticamente significativa.

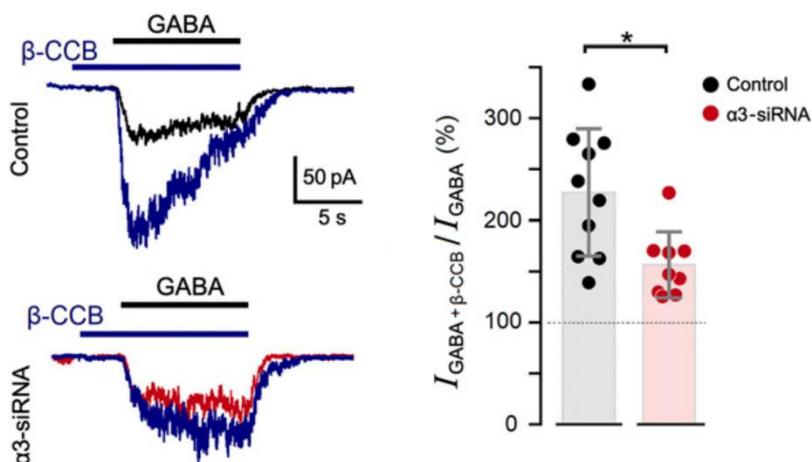


Figura 37. **Efecto del silenciamiento de la subunidad  $GABA_A R \alpha 3$  sobre la sensibilidad a  $\beta$ -CCB en OPCs.** Los trazos ilustran la respuesta típica de células control (negro) y células tratadas con  $\alpha 3$ -siRNA (rojo) provocada por GABA ( $10 \mu\text{M}$ ) sólo, o coaplicado con  $10 \mu\text{M}$  de  $\beta$ -CCB (trazo azul). El gráfico de barras muestra los valores de la amplitud de la respuesta (media  $\pm$  S.D., en gris) para cada grupo, donde cada punto de datos representa la respuesta en una sola célula.  $*P < 0.001$  para comparaciones entre las células del control frente a las células tratadas con  $\alpha 3$ -siRNA, prueba “t” de Student.

Y tercero, las células transfectadas con  $\alpha 3$ -siRNA mostraron también una disminución de la sensibilidad a  $\beta$ -CCB ( $10 \mu\text{M}$ ) coaplicada con GABA ( $10 \mu\text{M}$ ), y generaron un aumento de la respuesta a GABA de  $156.4 \pm 32.2\%$  (9 células) en comparación con el efecto control de  $227.26 \pm 62.2\%$  (10 células) como se ilustra en la Figura 37.

Una serie de experimentos similares fueron realizados provocando el silenciamiento de la subunidad  $\gamma 1$ . En este caso la transfección de  $\gamma 1$ -siRNA no redujo la expresión de la proteína  $\gamma 1$  con igual potencia a aquella diseñada contra  $\alpha 3$ , sin embargo, el efecto

alcanzó una disminución del  $71 \pm 1.6\%$  en 3 DIV como lo muestra el análisis de inmunodetección en la Figura 38.

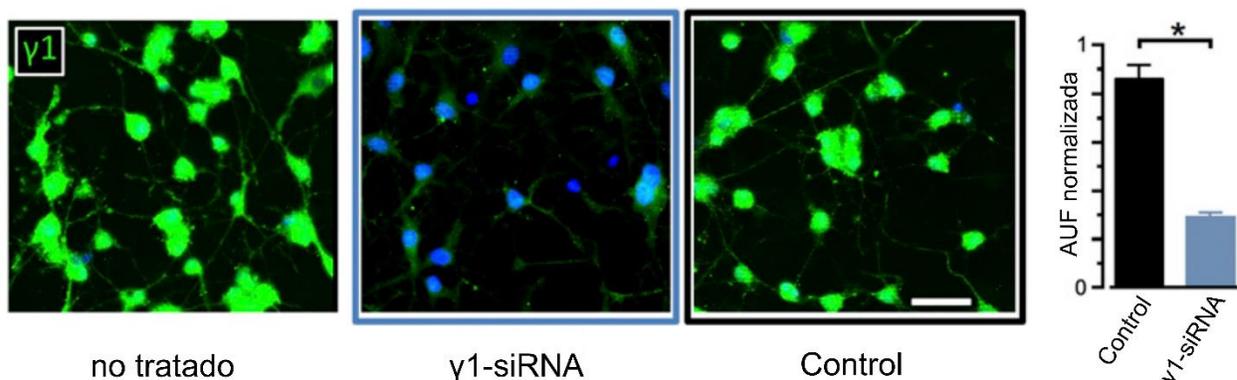


Figura 38. **Silenciamiento de la expresión de la subunidad GABA<sub>A</sub>R  $\gamma$ 1 en OPCs.** Las imágenes ilustran la inmunodetección de la subunidad  $\gamma$ 1 (en verde, núcleos en azul) en OPC mantenidas en cultivo. El primer panel muestra las células no tratadas. El grupo  $\gamma$ 1-siRNA representa a células transfectadas con interferencia específica secuencias contra la subunidad. Las células control se procesaron para la transfección con secuencias aleatorias. Después de 72h, la expresión de  $\gamma$ 1 fue estimado en AUF, y los valores se normalizaron con respecto al grupo no tratado (promedio de siete campos de tres cultivos transfectados) (media  $\pm$  S.D.). \* $P < 0.001$  para comparaciones entre las células control frente a las células tratadas con  $\gamma$ 1-siRNA, prueba "t" de Student. Barra = 50  $\mu$ m.

La disminución de la expresión de  $\gamma$ 1 fue acompañada de una importante disminución de la amplitud promedio de la respuesta máxima de GABA (1 mM) de  $55.1 \pm 1.5\%$  ( $1795.4 \pm 1393$  pA frente a  $805.6 \pm 463$  pA en el control respectivo) (Fig. 39).

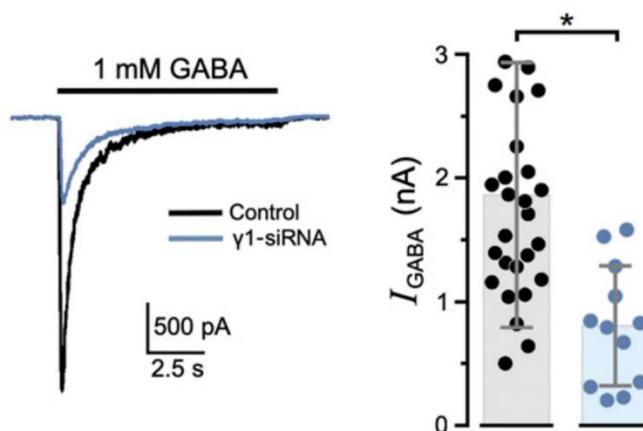


Figura 39. **Efecto del silenciamiento de la subunidad GABA<sub>A</sub>R  $\gamma$ 1 sobre la amplitud de la respuesta a GABA en OPCs.** Los trazos ilustran las respuestas provocadas por GABA 1 mM en células control y tratadas con  $\gamma$ 1-siRNA. La amplitud de respuesta para cada grupo se representa en la gráfica. Cada punto es la amplitud obtenida en una sola célula, y la media  $\pm$  S.D. se indica en gris. \* $P < 0.001$  para comparaciones entre las células control frente a las células tratadas con  $\gamma$ 1-siRNA, prueba "t" de Student.

En este caso, las  $EC_{50}$  estimadas para GABA en cada grupo no mostraron una diferencia estadísticamente significativa ( $75.1 \pm 4.12 \mu\text{M}$  para el grupo control vs.  $88.9 \pm 3.48 \mu\text{M}$  para el grupo  $\gamma$ 1-siRNA (17-20 células en cada caso, 4 diferentes transfecciones) (Fig. 40).

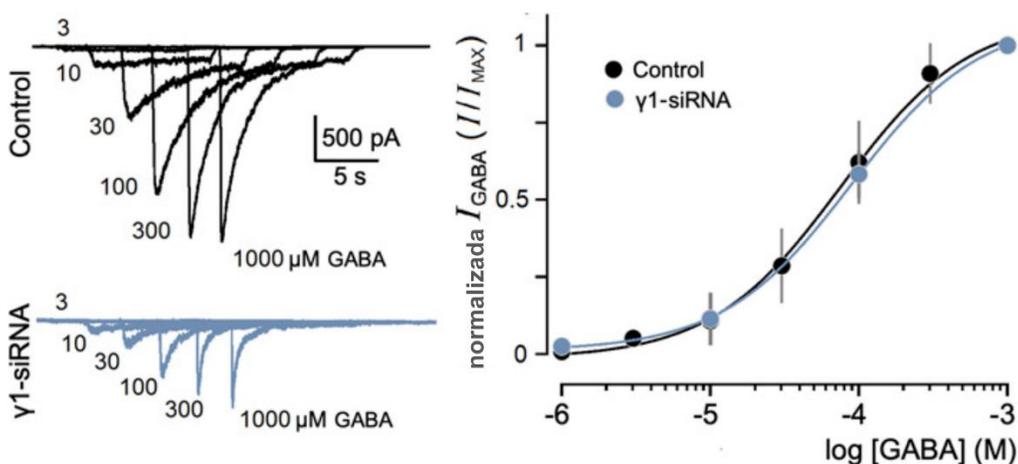


Figura 40. **Efecto del silenciamiento de la subunidad GABA<sub>A</sub>R  $\gamma$ 1 sobre la sensibilidad a GABA en OPCs.** Los trazos ilustran la respuesta a GABA de células (control y tratadas con  $\gamma$ 1-siRNA) frente a la aplicación de diferentes concentraciones de GABA como se indica, en el gráfico, cada punto de datos representa la media  $\pm$  S.D. de la respuesta normalizada en 17–20 células, las líneas son el mejor ajuste a las respectivas curvas D-R.

De manera similar a lo que se mostró para las células transfectadas con  $\alpha$ 3-siRNA, las células transfectadas con  $\gamma$ 1-siRNA fueron menos sensibles a  $\beta$ -CCB, y en presencia de  $\beta$ -carbolina, la respuesta a GABA se incrementó a  $113.2 \pm 16.6\%$  mientras que la

del grupo de control (igual que el control en la Figura 37) se incrementó  $227.26\% \pm 62.2\%$  (Fig. 41).

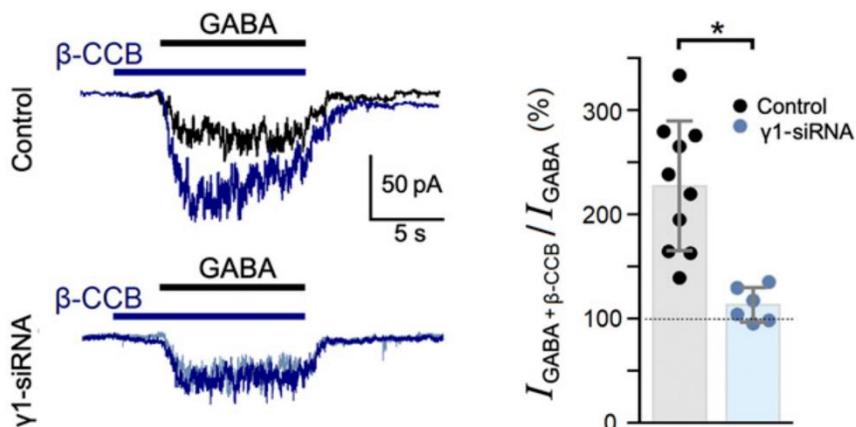


Figura 41. **Efecto del silenciamiento de la subunidad GABA<sub>A</sub>R  $\gamma 1$  sobre la sensibilidad a  $\beta$ -CCB en OPCs.** Los trazos ilustran la respuesta típica en células control (negro) y las células tratadas con  $\gamma 1$ -siRNA (azul claro) provocadas por GABA ( $10 \mu\text{M}$ ) sólo, o coaplicado con  $10 \mu\text{M}$  de  $\beta$ -CCB (trazo azul oscuro). El gráfico de barras muestra los valores de amplitud de la respuesta (media  $\pm$  S.D., en gris) para cada grupo, donde cada punto de datos representa la respuesta en una sola célula. \* $P < 0.001$  para comparaciones entre las células control frente a las células tratadas con  $\gamma 1$ -siRNA, prueba "t" de Student.

Estos resultados, de manera directa, apoyan la idea de que las subunidades,  $\alpha 3$  y  $\gamma 1$ , participan en la conformación del receptor endógeno. También sugirieron que ante la eliminación de la subunidad  $\alpha 3$ , su ausencia fue compensada por otra subunidad, mientras que la expresión de la subunidad  $\gamma 1$  fue esencial para el ensamblaje funcional del receptor oligodendroglial. Finalmente, ambas subunidades también parecen participar en su sensibilidad a  $\beta$ -CCB.

### 7.2.5 La expresión de la subunidad $\alpha 2$ del GABA<sub>A</sub>R en las OPCs

Las OPCs tratadas con el  $\alpha 3$ -siRNA, comparado con las OPCs en condiciones control, no mostraron cambios en la amplitud de la respuesta a  $1 \text{ mM}$  GABA. Sin embargo, los cambios observados en la  $EC_{50}$  para GABA y el aumento en la constante de tiempo de desensibilización de la respuesta, sugieren que la ausencia de la subunidad  $\alpha 3$  fue

compensada por otra subunidad. Proponemos que una candidata a ser reclutada en este efecto aparentemente compensatorio es la subunidad GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 2.

En esta serie de experimentos, por medio de inmunodetección y microscopía confocal, fue analizada la distribución de las subunidades  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3 en las OPCs. Como se observa en la Figura 42, la proteína  $\alpha$ 2 presentó una tendencia a localizarse en el área del soma, mientras que la subunidad  $\alpha$ 3 fue detectada de manera homogénea en toda la célula observando marca tanto en el soma como en los procesos de las OPCs. En experimentos realizados en paralelo utilizando los mismos cultivos, un grupo de OPCs fue transfectado con  $\alpha$ 3-siRNA. Los resultados de este tratamiento son ilustrados en la Figura 42A, donde puede ser observado que la eliminación de la subunidad  $\alpha$ 3 tuvo dos consecuencias importantes sobre la expresión de la subunidad  $\alpha$ 2. Primero, la distribución de la subunidad  $\alpha$ 2 parece cambiar, ya que alcanzó no solo el soma si no también algunos de los procesos celulares, segundo, la intensidad de la marca aumentó lo que sugiere un incremento en la expresión de la proteína. El cambio en la distribución de  $\alpha$ 2 fue cuantificado analizando el área marcada, tanto para la subunidad  $\alpha$ 2 como para la  $\alpha$ 3, en los grupos control y  $\alpha$ 3-siRNA. Como se puede observar en la gráfica de barras (Fig. 42B), en la condición control, la subunidad  $\alpha$ 3 ocupó un área mayor que la subunidad  $\alpha$ 2. Mientras que en las células tratadas, el área marcada que indica la expresión de la subunidad  $\alpha$ 2 aumentó con respecto a su correspondiente condición control. Este resultado apoya la idea de que la subunidad  $\alpha$ 2 compensó la ausencia de  $\alpha$ 3; y sugiere que en condiciones control  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3 podrían interactuar en el ensamblaje del GABA<sub>A</sub>R oligodendroglial. Un punto de coincidencia entre estas dos subunidades en otros tipos celulares es el uso preferencial de proteínas de andamiaje (Saiepour et al., 2010; Tretter et al., 2008, 2011, 2012). La sección siguiente describe un análisis de la expresión de estas proteínas en las OPCs.

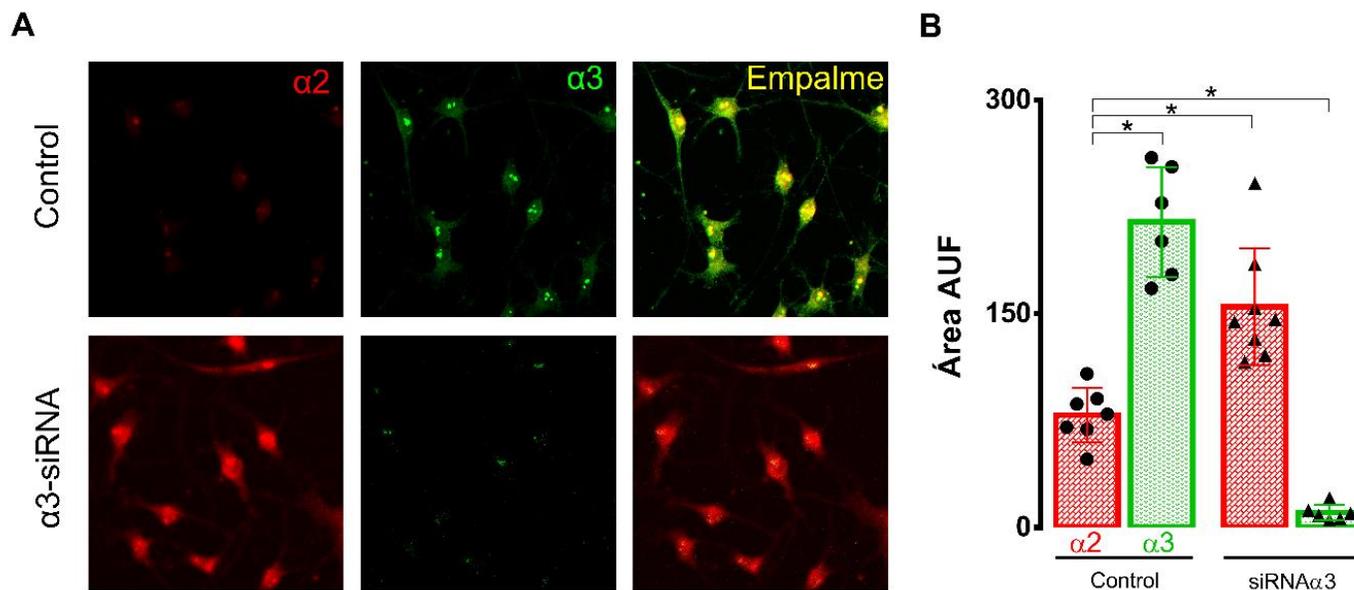


Figura 42. **Distribución celular de las subunidades GABA<sub>A</sub>R  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  en las OPCs *in vitro*.** (A) Las imágenes ilustran la inmunodetección de las subunidades  $\alpha 2$  (color rojo) y  $\alpha 3$  (en verde) en OPCs mantenidas en cultivo. Los paneles superiores corresponden a las células no interferidas, mientras que los paneles inferiores, son células transfectadas con  $\alpha 3$ -siRNA. (B) La gráfica muestra el área en AUF de la señal de fluorescencia para  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ , tanto en la condición control (círculos) como transfectadas con  $\alpha 3$ -siRNA (triángulos). Cada punto es el área obtenida en un campo representativo, las barras indican la media  $\pm$  S.D. para cada condición. \* $P < 0.001$ , análisis de varianza (ANOVA de una vía) seguido de una prueba *post hoc* de Tukey.

### 7.2.6 Proteínas de andamiaje y las subunidades GABA<sub>A</sub>R $\alpha 2$ y $\alpha 3$ en oligodendrocitos en condiciones *in vitro*

Las proteínas gefirina y colibistina son proteínas de andamiaje encargadas del ensamblaje y mantenimiento de GABA<sub>A</sub>Rs en la membrana postsináptica de neuronas (Choi & Ko, 2015; Harvey et al., 2004; Papadopoulos et al., 2008; Saiepour et al., 2010). Se sabe que la interacción de estas proteínas es, preferentemente, con las subunidades  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  de los GABA<sub>A</sub>R (Maric et al., 2011; Saiepour et al., 2010; Tretter et al., 2008, 2011). Dada la preponderancia de estas subunidades en las células oligodendrogiales, y su participación en el mantenimiento de la respuesta a GABA, el siguiente análisis inmunocitoquímico fue realizado para conocer sobre la expresión de

colibistina y gefirina tanto en las OPCs como en oligodendrocitos maduros, así como su posible co-localización con las subunidades  $\alpha$  mencionadas. Primero, fueron realizados experimentos en los que por la técnica de RT-PCR fueron amplificadas de manera específica fragmentos de las secuencias de mRNA que codifican para ambas proteínas, tal y como se ilustra en la Figura 43. Utilizando sondas específicas para cada secuencia se llevó a cabo la amplificación en preparaciones de mRNA proveniente tanto de OPCs como de OLs maduros, cada tipo celular fue procesado en dos grupos, el primero a las 24 h en cultivo, y otro a las 72 h (Figura 43A y B). Las bandas esperadas del producto correspondieron a 447 pb y 480 pb para gefirina y colibistina, respectivamente. Como puede observarse de los geles correspondientes en la Figura 43, el DNA de ambas proteínas fue amplificado en todas las condiciones analizadas.

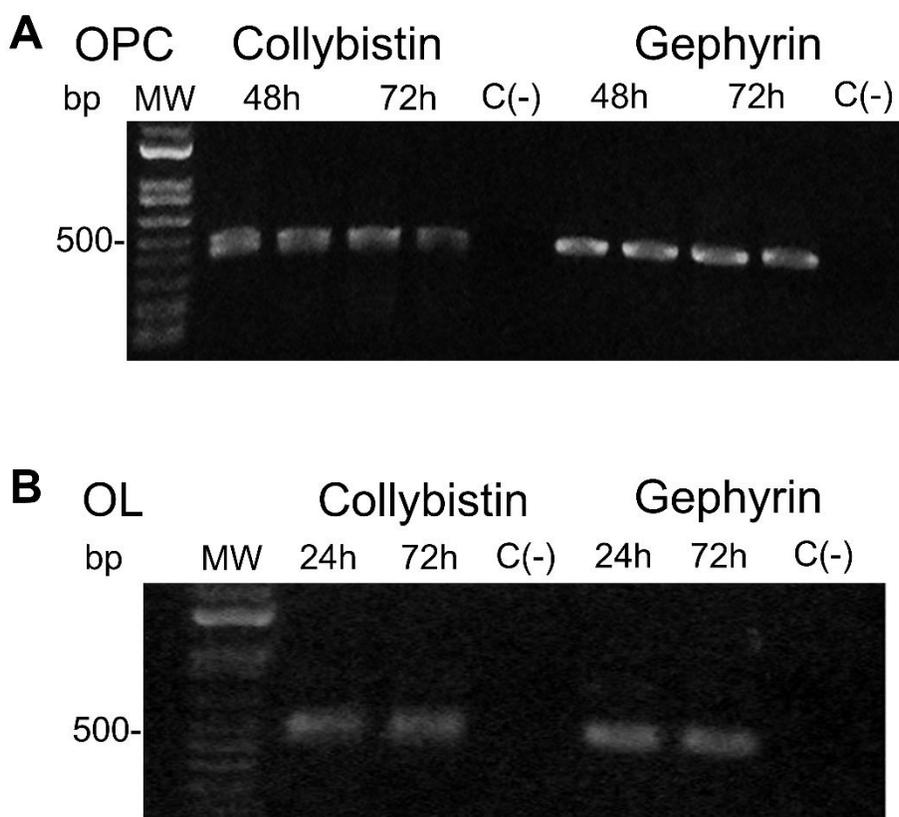
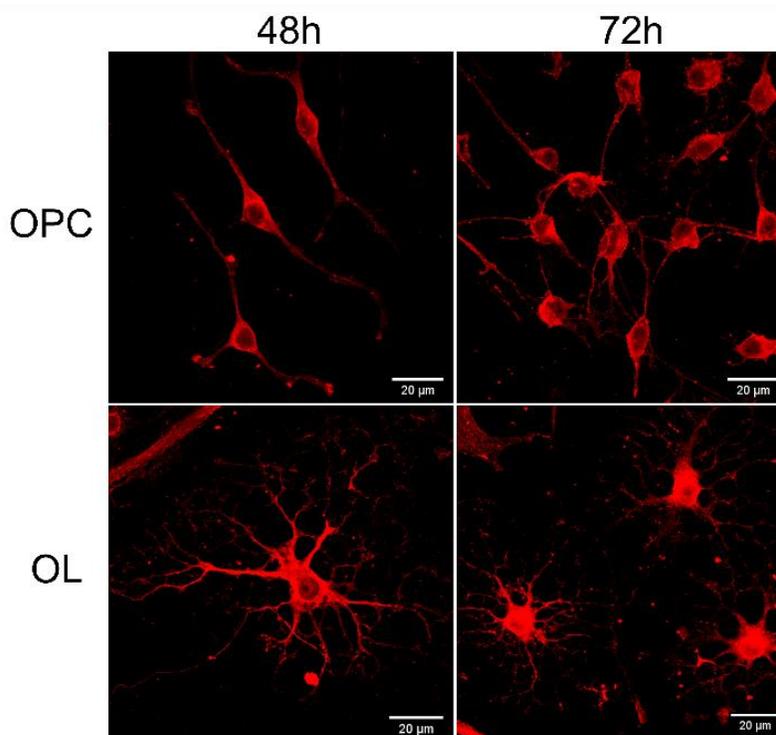


Figura 43. **Expresión de mRNA para gefirina y colibistina en células del linaje oligodendroglial.** Los geles muestran la amplificación por PCR de transcripción inversa (RT) de fragmentos de la secuencia de

DNA de gefirina y colibistina expresadas OPCs (A) y en OLs (B) en cultivo. Las longitudes de los productos esperados son de 447 pb y 480 pb para gefirina y colibistina, respectivamente. pb, pares de bases; MW, marcador de peso molecular; C(-), control negativo (sin cDNA).

---

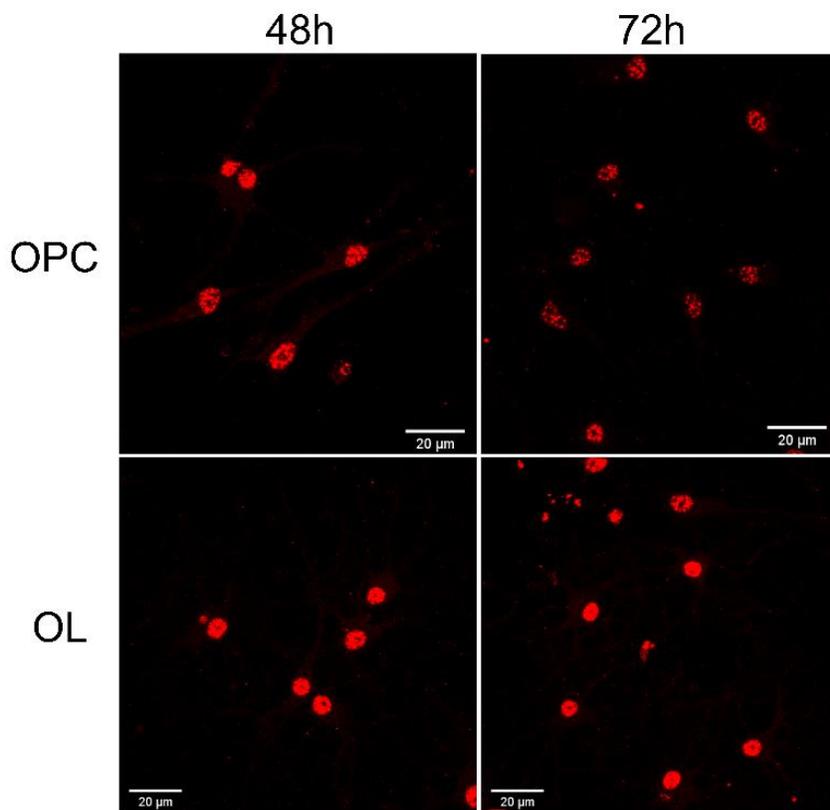
A continuación, procedimos a la detección de las proteínas correspondientes en las células estudiadas, utilizando para esto inmunocitoquímica y microscopía confocal. En las imágenes de las Figuras 44 y 45, se ilustra el resultado de la inmunodetección de colibistina (Fig. 44) o gefirina (Fig. 45) tanto en OPCs como en OLs maduros. La marca observada mostró una localización diferencial, por ejemplo, la marca de colibistina fue detectada de manera homogénea en toda la membrana plasmática, mientras que la de gefirina tuvo una localización preferencial en la zona perinuclear, formando pequeños cúmulos.



---

Figura 44. **Expresión de las proteínas de andamiaje colibistina en células oligodendrogiales.** Las imágenes muestran campos representativos de OPC y OL mantenidos en cultivo (48 h y 72 h) y procesados inmunocitoquímicamente donde observa la señal de fluorescencia de un anticuerpo específico contra las proteínas de la proteína de andamiaje colibistina (en rojo). Barra = 20 μm.

---



---

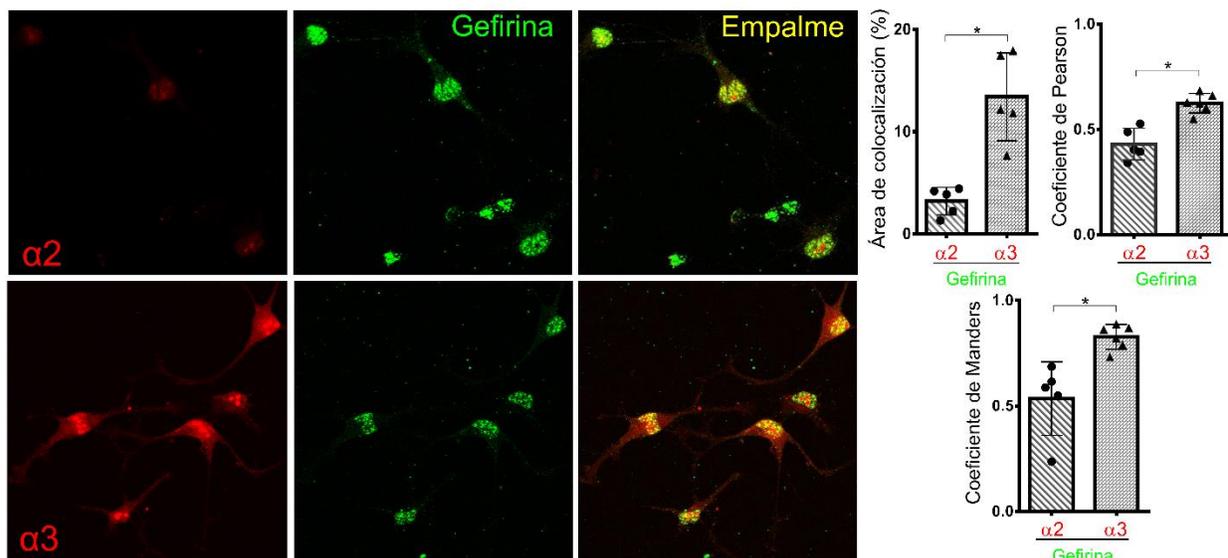
Figura 45. **Expresión de las proteínas de andamiaje gefirina en células oligodendrogliales.** Las imágenes muestran campos representativos de OPC y OL mantenidos en cultivo (48 h y 72 h) y procesados inmunocitoquímicamente donde observa la señal de fluorescencia de un anticuerpo específico contra las proteínas de la proteína de andamiaje gefirina (en rojo).

---

Ya que fue detectada la expresión de estas proteínas de andamiaje en las células oligodendrogliales y se sabe que interactúan en las neuronas con los receptores GABA<sub>A</sub> a través de las subunidades GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 2 y/o  $\alpha$ 3, entonces fue estudiada la localización celular de la proteína gefirina con estas subunidades en las OPCs, utilizando para esto inmunocitoquímica y microscopía confocal. Como se muestra en las imágenes de la Figura 46, la subunidad  $\alpha$ 2 tuvo una localización en forma de cúmulos principalmente en el soma, mientras que la  $\alpha$ 3 estuvo distribuida por toda la

membrana celular (como fue mostrado en los experimentos anteriores). Además, la gefirina mostró una distribución principalmente perinuclear. El empalme de la marca de las proteínas mencionadas indicó una coincidencia en regiones semejantes de la gefirina y la subunidad  $\alpha 2$ , sin embargo, menos de 3% del área total de distribución de  $\alpha 2$  coincide con la de gefirina, como se muestra en la gráfica de barras de la Figura 46, sin embargo, al analizar a gefirina con la subunidad  $\alpha 3$  se observó que cerca del 15% del área total de su ubicación celular coincide con la de gefirina. También, fue calculada la probabilidad de coincidencia espacial asociada a la señal de gefirina con  $\alpha 2$  y comparada con  $\alpha 3$ , a través de los coeficientes de Pearson y Manders. Estos coeficientes indican que mientras más cercano a 1 sea su valor, mayor es la probabilidad de co-localización de las dos señales estudiadas en el espacio celular. Así en el caso de gefirina y la subunidad  $\alpha 2$  ambos coeficientes tuvieron valores inferiores a 0.53, mientras que los valores de ambos coeficientes estimados para el caso de la señales de gefirina con la  $\alpha 3$  fueron de  $0.62 \pm 0.04$  y  $0.80 \pm 0.07$  para Pearson y Manders, respectivamente. Un futuro análisis similar será requerido para el caso de la proteína colibistina.

Estos resultados sugieren que la localización espacial de la proteína de andamiaje gefirina, coincidió con mayor probabilidad con la subunidad GABA<sub>A</sub>R  $\alpha 3$  que con la  $\alpha 2$  en las OPCs.



---

Figura 46. **Co-localización de gefirina y las subunidades GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3 en OPC.** Las imágenes ilustran la inmunodetección de las subunidades  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3 (color rojo) y de gefirina (en verde) y el empalme de ambas señales en OPC mantenidas en cultivo, como se indica. Las gráficas muestran; de forma comparativa; la media  $\pm$  S.D. (en color negro) de los parámetros: área de co-localización y los coeficientes de Pearson y Manders, asociados a la co-localización de gefirina y las subunidades  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3. \* $P < 0.005$ , prueba “t” de Student.

---

### **7.3 Efecto de la disminución de la expresión de subunidades específicas del GABA<sub>A</sub>R oligodendroglial sobre la maduración del linaje oligodendroglial**

#### **7.3.1 Maduración de OPCs en cultivo**

Sin duda, una de las preguntas fundamentales acerca de la señalización GABAérgica en el linaje oligodendroglial, es reconocer las posibles funciones específicas de este sistema a lo largo de la diferenciación (Angulo et al., 2008; Arellano et al., 2016; Balia et al., 2017; Cisneros-Mejorado et al., 2020; Habermacher et al., 2019; Hamilton et al., 2017; Maldonado et al., 2011; Serrano-Regal et al., 2020; Shaw et al., 2016, 2018, 2019; Vélez-Fort et al., 2012; Zonouzi et al., 2015). A lo largo del presente estudio se han desarrollado herramientas experimentales, que permiten abordar *in vitro* esta pregunta. Para esta serie de experimentos, primero, a las OPCs les fue evaluada su capacidad para madurar después de haberlas mantenido en medio de proliferación por cuatro días, que es la temporalidad necesaria para explorar la efectividad del siRNA. Esto estableció las condiciones control para evaluar el efecto que tiene la eliminación de las subunidades GABA<sub>A</sub>R  $\alpha$ 3 ó  $\gamma$ 1 sobre la maduración *in vitro* de las OPCs. Para esto, las OPCs fueron mantenidas durante 4 días en MP, desde su aislamiento, y pasado este tiempo a un grupo de células les fue cambiado el medio de cultivo a MD en el que se induce la maduración de las OPCs, ambos grupos, control y experimental, fueron entonces seguidos por 3 días más en el cultivo. Como se puede observar por medio de contraste de fases, las células control mantenidas en MP preservaron una morfología bipolar típica de las OPCs, mientras que aquellas incubadas en MD

presentaron mayor complejidad morfológica con un mayor número de proyecciones y un soma redondeado, características típicas de OLs más diferenciados (Fig. 47A). Los cambios morfológicos fueron notables desde las 24 h posteriores al cambio a MD. La cuantificación de células con morfología compleja (i.e. OLs maduros) (Fig. 47B) indicó que desde las primeras horas en MD, las OPCs comienzan a disminuir en número mientras el número de OLs aumenta hasta ser la principal morfología en el cultivo, que también continúa aumentando en complejidad (e.g., número y extensión de los procesos) hasta las 72 h.

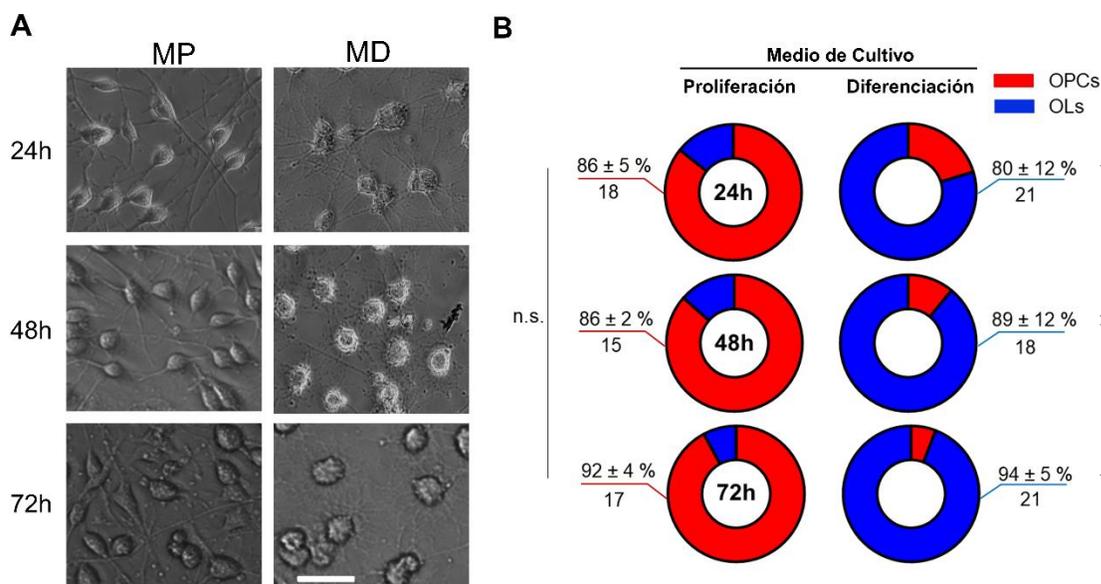


Figura 47. **Estudio de la maduración de OPC en cultivo primario.** Después de cuatro días en medio de proliferación (MP), un grupo de OPCs fueron mantenidas en este medio (A, columna izquierda) y otro grupos se incubó en medio de diferenciación (MD) (A, columna derecha). Las imágenes de contraste de fases muestran a las células en esas condiciones a las 24, 48 y 72 h. (B) Cuantificación entre 15 y 21 campos representativos, de cada condición analizada en A, en tres experimentos diferentes, de las células con morfología tipo OPC (color rojo) y de OL maduro (color azul). En cada caso se muestra el porcentaje de cada tipo celular (media ± S.D.) con respecto al total de célula observado en cada campo. Barra = 50  $\mu$ m. \* $P < 0.005$ , análisis de varianza (ANOVA de una vía) seguido de una prueba post hoc de Tukey. n.s.: diferencias estadísticas no significativas.

A continuación, fue evaluada la expresión de marcadores de maduración a través de inmunomarcaje, a las 24, 48 y 72 h en MD. Como es ilustrado en la Figura 48, a las 24

h en MD las células NG2<sup>+</sup> fueron menos del 12% mientras que a las 72 h no se detectaron células NG2<sup>+</sup> (comparar con la Figura 27). En cambio, la marca positiva a los marcadores O4 y MBP predominó en el cultivo celular desde las 24 h en MD, y aumentó hasta alcanzar el  $70 \pm 14.2\%$  y el  $83 \pm 10.4\%$ , respectivamente, del total de las células a las 72 h.

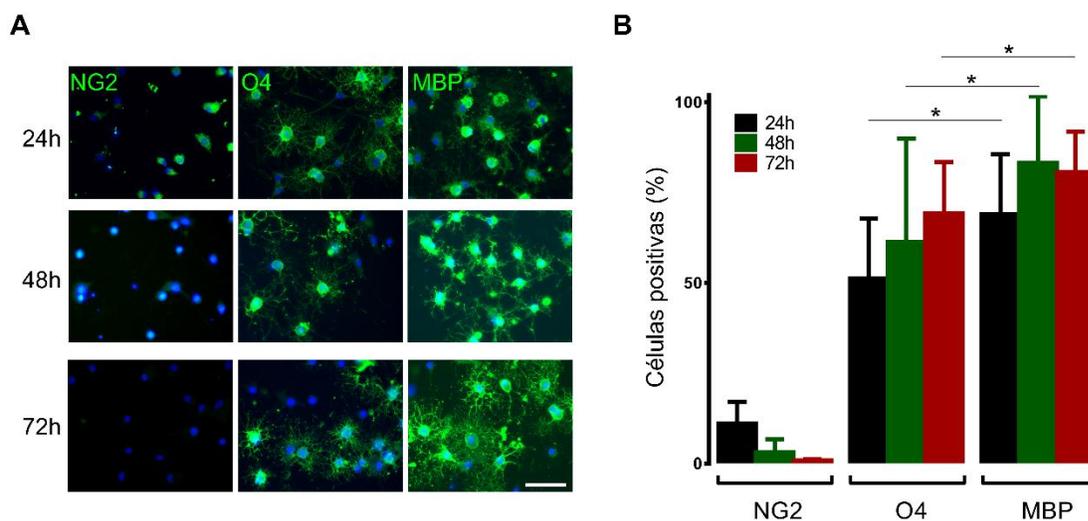


Figura 48. **Expresión de marcadores gliales en OPCs de 4 DIV a los que se le induce la maduración.** (A) Las imágenes en los paneles muestran campos representativos de OPC mantenidos en cultivo en medio de maduración y procesados inmunocitoquímicamente a 24 h, 48 h y 72 h, como se indica. Se visualizaron los marcadores utilizados (indicados en la parte superior en color verde) por microscopía de epifluorescencia. (B) Las células positivas para cada marcador se contaron y expresaron como % de células (media  $\pm$  S.D.) con respecto al número total de células (núcleos marcados con DAPI) en los campos representativos. \* $P < 0,0001$ , análisis de varianza (ANOVA de una vía) seguido de una prueba *post hoc* de Tukey. Barra = 50  $\mu$ m.

En resumen, estos datos confirmaron que las OPCs en MP permanecieron en estadio de precursor al menos por 4 días aisladas, e indicaron que mantuvieron una alta capacidad de maduración hacia OLs inducido al cambiar a MD.

### 7.3.2 Efecto de la interferencia de las subunidades $\alpha 3$ ó $\gamma 1$ sobre la maduración de OPCs en cultivo

Para probar el efecto de la disminución específica de las subunidades  $\alpha 3$  ó  $\gamma 1$  sobre la maduración de los oligodendrocitos en el cultivo, se procedió a transfectar las OPCs con los siRNAs correspondientes a cada subunidad, y se mantuvieron por 4 días en MP. Posteriormente, les fue retirado el MP y fueron cultivadas en MD, de manera semejante a los experimentos de la sección anterior. Las imágenes representativas por contraste de fases mostraron que las células tratadas con siRNAs contra las mencionadas subunidades mantuvieron una morfología tipo OPC, comparadas con aquellas que fueron tratadas con el siRNA no específico, en las que predominaron las células con fenotipo de OLs en diferenciación, y el número de éstas últimas incrementó con el tiempo en MD tal y como se observa en la cuantificación (Fig. 49).

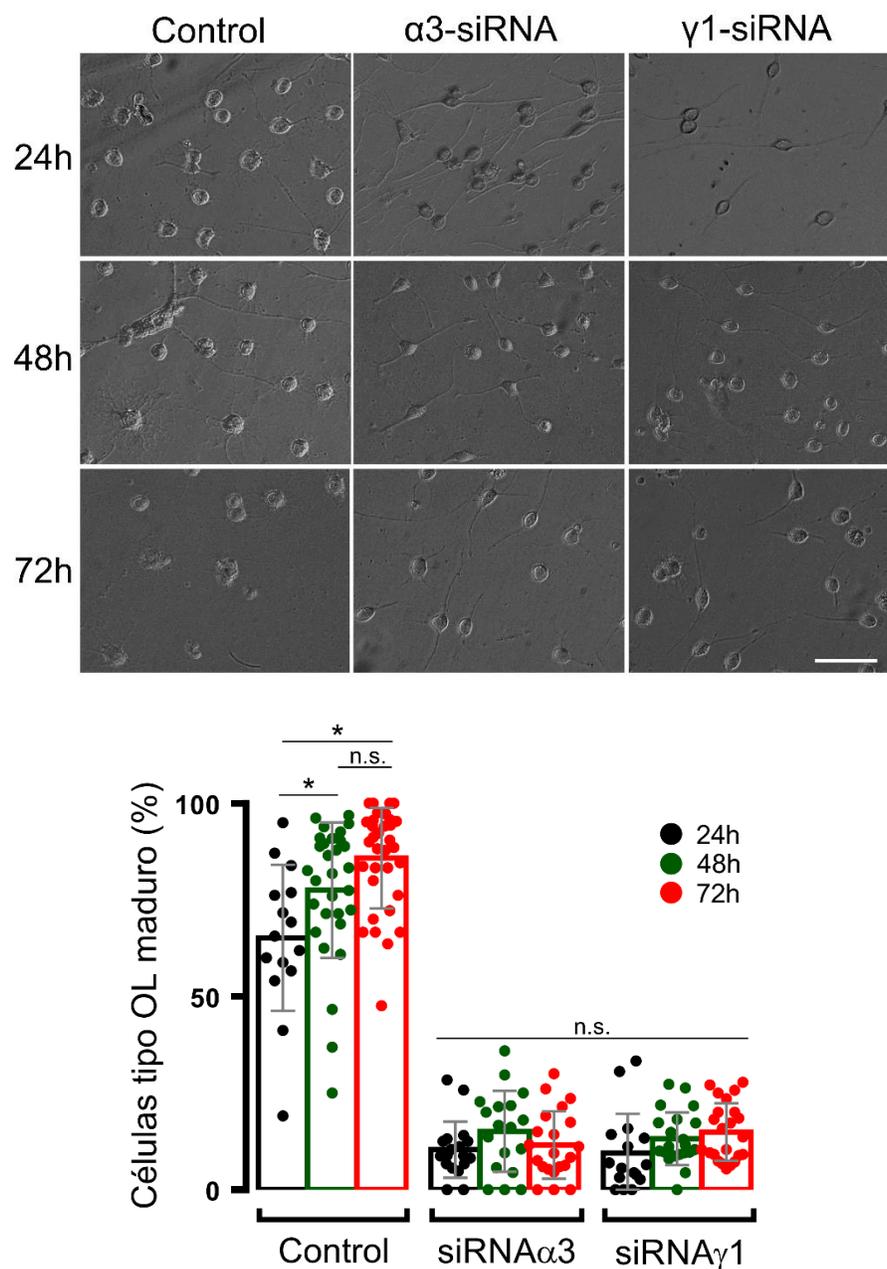


Figura 49. **Efecto del silenciamiento de las subunidades  $\alpha 3$  y  $\gamma 1$  sobre la maduración de OPCs en cultivo.** En las imágenes se pueden observar a los OPCs (de cuatro DIV en medio de proliferación) mantenidos en medio de maduración entre las 24 h y las 72 h. Tratados con las interferencias específicas contra las subunidades  $\alpha 3$  y  $\gamma 1$  y siRNA inespecífico (Control), como se indica. Todas las imágenes fueron obtenidas con un microscopio de contraste de fases. Barra = 50  $\mu$ m. El histograma muestra la cuantificación en tres campos representativos, de cada condición analizada, en tres experimentos diferentes, de las células con morfología de OPC y de OL maduro. En cada caso se muestra el porcentaje de cada tipo celular (media  $\pm$  S.D.) con respecto al total de células observado en

cada campo. \* $P < 0.005$ , análisis de varianza (ANOVA de una vía) seguido de una prueba post hoc de Tukey. n.s.: diferencias estadísticas no significativas.

---

Al estudiar la expresión de los marcadores moleculares del linaje oligodendroglial, fue observado que en las células tratadas con los siRNAs específicos en MD predominaron las células NG2<sup>+</sup>. Mientras que la proporción de células O4<sup>+</sup> y MPB<sup>+</sup> se mantuvo baja. En contraste, las células tratadas con el siRNA no específico resultaron mayoritariamente O4<sup>+</sup> y MBP<sup>+</sup>, mientras que el porcentaje de las células NG2<sup>+</sup> disminuyó en el cultivo hasta el 35% del total a las 72 h (Fig. 50).

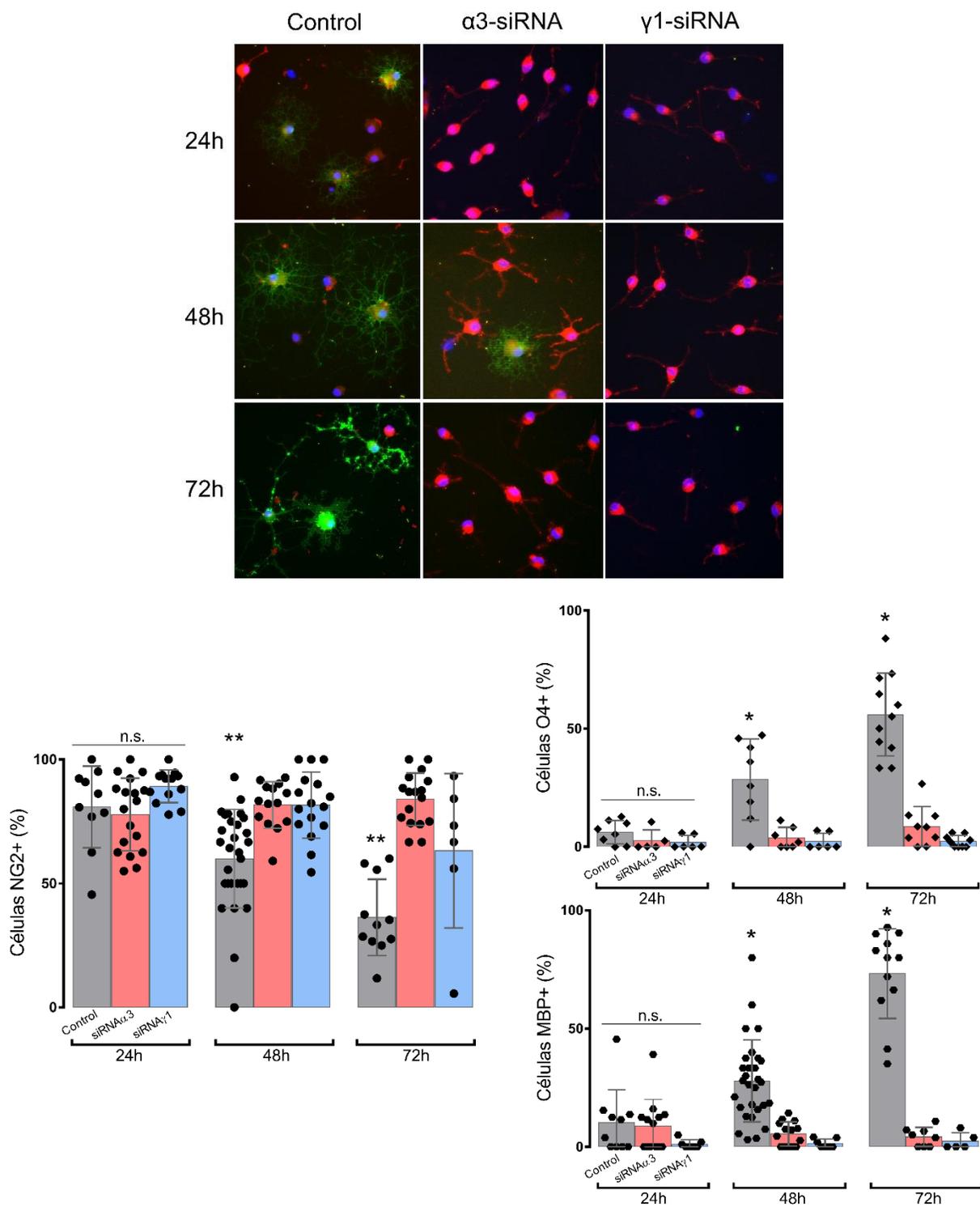


Figura 50. Efecto del silenciamiento de las subunidades  $\alpha 3$  y  $\gamma 1$  sobre la expresión de marcadores moleculares del linaje oligodendroglial. Las imágenes en los paneles se muestran campos

representativos de OPC mantenidos en cultivo en medio de maduración y procesados inmunocitoquímicamente a 24 h, 48 h y 72 h, como se indica. Se visualizaron los marcadores NG2 (en rojo) y MBP (en verde) por microscopía de epifluorescencia. Las células positivas para cada marcador se contaron y expresaron como % de células (media  $\pm$  S.D.) con respecto al número total de células (núcleos marcados con DAPI) en los campos representativos. \*\* $P < 0.05$ ; \* $P < 0.0001$ , análisis de varianza (ANOVA de una vía) seguido de una prueba post hoc de Tukey. n.s.: diferencias estadísticas no significativas.

---

Los resultados anteriores sugieren que la expresión tanto de la subunidad  $\alpha 3$  como de la  $\gamma 1$  fueron requeridas para llevar a cabo el proceso de maduración, por lo que los siguientes experimentos farmacológicos fueron diseñados para explorar la posibilidad de que este requerimiento implique su función en la membrana como parte del receptor GABA<sub>A</sub> oligodendroglial. Con esta finalidad, primero, estudiamos el efecto del bloqueo farmacológico de los GABA<sub>A</sub>Rs en la maduración de las OPCs. Para esto fue analizada la expresión de los marcadores NG2, MBP y O4 en las células oligodendrogliales tratadas con los bloqueadores de los receptores GABA<sub>A</sub> gabazina (GBZ 20  $\mu$ M y 100  $\mu$ M) y bicuculina (Bicu 100  $\mu$ M y 300  $\mu$ M) mientras fueron cultivadas en MD por 72 h. Como se ilustra en el gráfico de la Figura 51, fue observado que la mayoría de las células (> 70%) en todas las condiciones de los tratamientos resultaron NG2<sup>+</sup>. Mientras que la presencia en el cultivo de células MPB<sup>+</sup> fue nula (Fig. 51). Por su parte en la condición en las que las células fueron incubadas en MD en ausencia de los bloqueadores (Control) fueron observadas células MBP<sup>+</sup> desde las 24 h, llegando a ser más del 85% del total de células observadas a las 72 h. La presencia de células NG2<sup>+</sup> en esta condición, fue muy baja desde las 24 h llegando a ser nula la presencia de células con esta marca a las 72 h. En el caso del marcador O4, fue observado un porcentaje hasta del  $35 \pm 8.5\%$  de células positivas a las 72h, especialmente en el grupo tratado con Bicu 100  $\mu$ M. Mientras que en la condición Control, las células O4<sup>+</sup> fueron detectadas desde las 24 h llegando a ser el 50% del total de células observadas a las 24 h hasta cerca del 70% a las 72 h (Fig. 52).

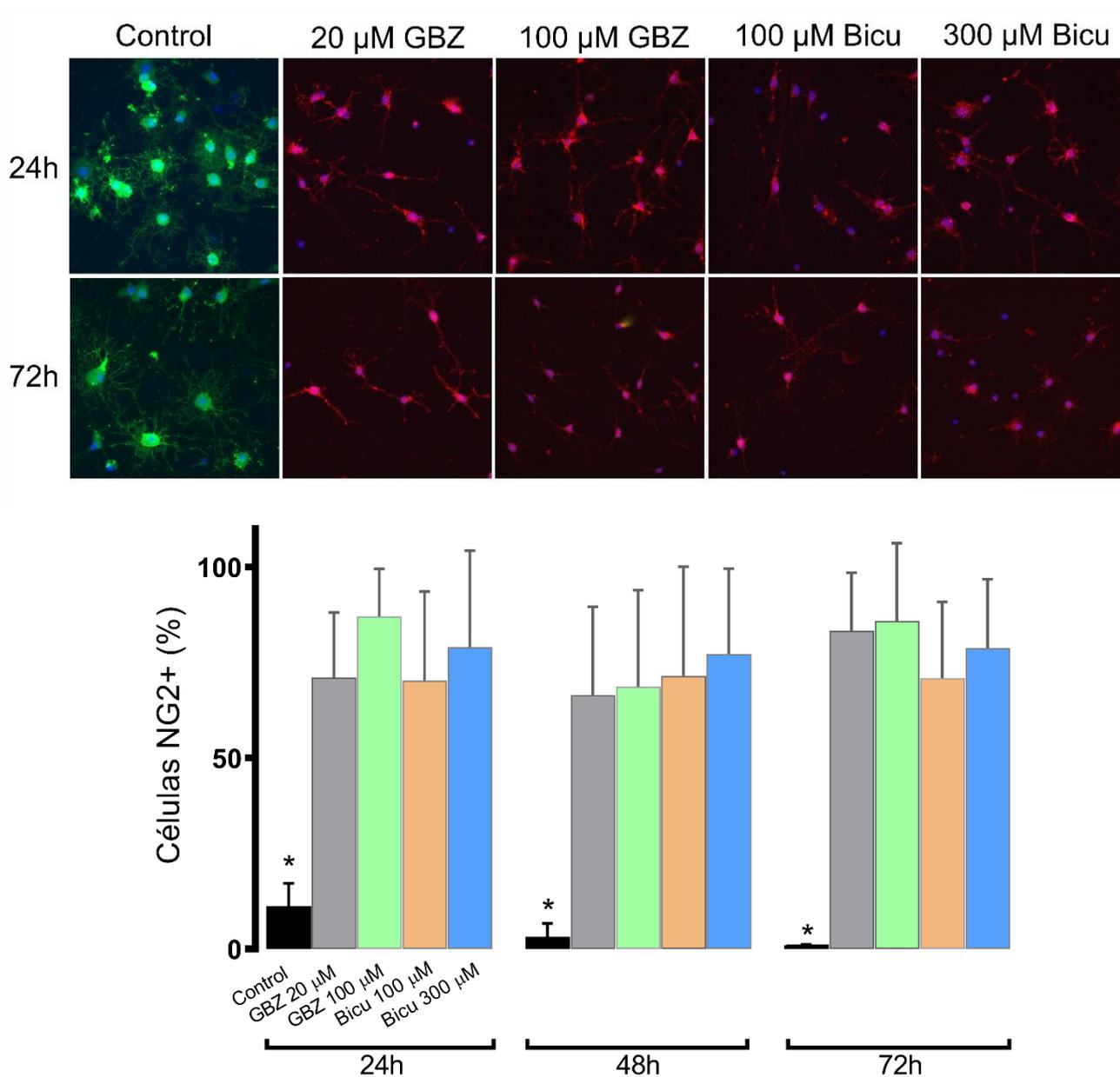


Figura 51. **Efecto del bloqueo farmacológico de los GABA<sub>A</sub>Rs de OPC en medio de maduración.**

Las imágenes en los paneles muestran campos representativos de OPC mantenidos en cultivo en medio de maduración y procesados inmunocitoquímicamente a 24 h, 48 h y 72 h, como se indica. Se visualizaron los marcadores NG2 (en rojo) y MBP (en verde) por microscopía de epifluorescencia. En presencia de gabazina (a 20 μM y 100 μM) y bicuculina (100 μM y 300 μM). Las células NG2<sup>+</sup> en cada condición se contaron y expresaron como % de células (media ± S.D.) con respecto al número total de células (núcleos marcados con DAPI) en los campos representativos. En estas condiciones no fueron detectadas células MBP<sup>+</sup>. \* $P < 0.0001$ ,

análisis de varianza (ANOVA de una vía) seguido de una prueba post hoc de Tukey.

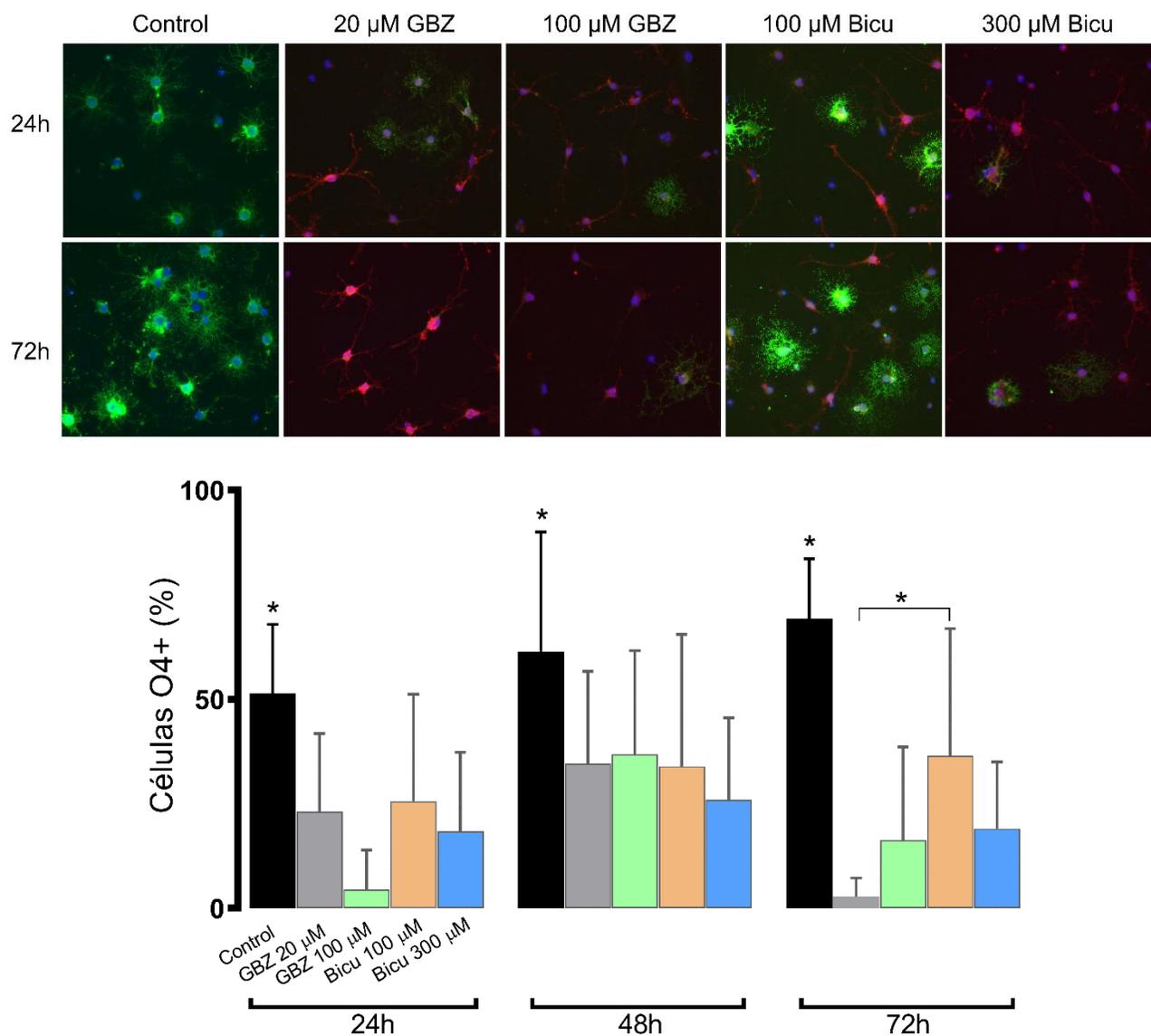


Figura 52. **Efecto del tratamiento farmacológico de OPC en medio de maduración con los bloqueadores específicos del GABA<sub>A</sub>R, bicuculina y gabazina.** Las imágenes en los paneles se muestran campos representativos de OPC mantenidos en cultivo en medio de maduración y procesados inmunocitoquímicamente a 24 h, 48 h y 72 h, como se indica. Se visualizaron los marcadores NG2 (en rojo) y O4 (en verde) por microscopía de epifluorescencia. En presencia de gabazina (a 20 μM y 100 μM) y bicuculina (100 μM y 300 μM). Las células O4<sup>+</sup> en cada condición se contaron y expresaron como

% de células (media  $\pm$  S.D.) con respecto al número total de células (núcleos marcados con DAPI) en los campos representativos. \* $P < 0.0001$ , análisis de varianza (ANOVA de una vía) seguido de una prueba post hoc de Tukey.

---

Estos resultados sugirieron que ambos tratamientos experimentales, tanto la eliminación de la expresión de las subunidades  $\alpha 3$  ó  $\gamma 1$ , así como el antagonismo farmacológico del GABA<sub>A</sub>R, inhibieron la progresión de la maduración de las OPCs *in vitro* a OLs.

### 7.3.3 Detección y cuantificación de GABA en el medio de cultivo

Debido a que los medios de cultivo comerciales utilizados no contienen GABA, esto excluiría una activación del GABA<sub>A</sub>R durante la incubación de las células en el MD. Sin embargo, las células oligodendrogiales expresan la maquinaria de síntesis de GABA lo cual podría llevar a la liberación del neurotransmisor al medio (Serrano-Regal et al., 2020). Para explorar esta posibilidad, tratamos de detectar GABA en el medio de cultivo de las OPCs mantenidas 3 días en MP (MPc, MP condicionado). Utilizamos dos métodos diferentes, en el primero fueron empleados como biosensores los GABA<sub>A</sub>Rs conformados por las subunidades  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ , y el conformado por la subunidad  $\rho 1$ , ambos expresados heterológamente en ovocitos de *Xenopus laevis*. El primero de estos receptores es la combinación que típicamente se expresa en las neuronas y tiene una EC<sub>50</sub> cercano a los 100  $\mu$ M. Por su parte el receptor homomérico  $\rho 1$  tiene una EC<sub>50</sub> de 1.2  $\mu$ M, esta sensibilidad permite detectar concentraciones de GABA en el rango nM (Colom-Casasnovas et al., 2022) y mostrar al mismo tiempo que el neurotransmisor está disponible para su unión al GABA<sub>A</sub>R.

Como se ilustra en la Figura 53, la aplicación de medio de proliferación de las OPCs, MP, no provocó respuestas en ovocitos que expresaban el GABA<sub>A</sub>R  $\rho 1$ , mientras que aquellos a los cuales les fue aplicado el medio condicionado MPc respondieron de

manera consistente con corrientes entrantes ante pulsos de aplicación que administraron MPc en el rango de 50 a 100 nL.

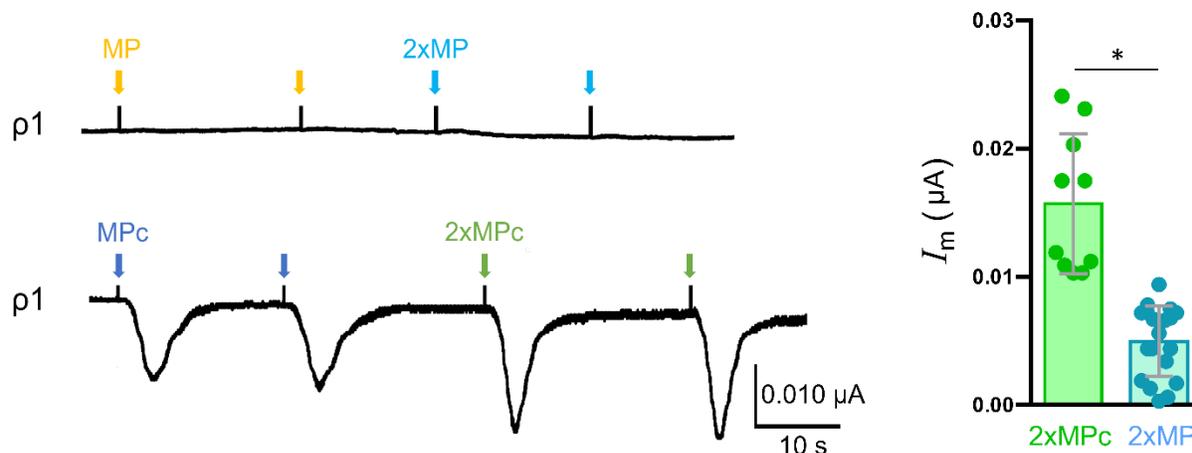


Figura 53. **Presencia de GABA en el medio condicionado de OPCs (MPc) detectado en ovocitos de *Xenopus* expresando subunidades p1.** Se muestran trazos representativos de la respuesta que tuvo la aplicación de medio de proliferación (MP) y de MPc en ovocitos expresando el receptor homomérico de p1. El medio condicionado de OPCs fue de 3 DIV. Las flechas indican la aplicación de un volumen de medio de proliferación (color anaranjado) y la aplicación de una gota con el doble del volumen anterior (2xMP; color azul). Además, se indica la aplicación de medio condicionado (MPc, color azul oscuro) y la aplicación de una gota con el doble de volumen (2xMPc; color verde). En la gráfica se muestra la amplitud de la corriente (media  $\pm$  S.D.) observada al aplicar el doble de volumen de medio condicionado (color verde) y de medio de proliferación (color azul). \* $P < 0.0001$ , prueba "t" de Student.

Un análisis de la relación I/V de la respuesta provocada por MPc en los ovocitos expresando p1 mostró una corriente entrante en -60 mV con un  $E_{rev}$  estimado de  $-24.2 \pm 3.1$  mV, lo esperado para el potencial de equilibrio de iones  $Cl^-$  en ovocitos (Arellano et al., 1995, 1998; Arellano & Miledi, 1993; Saldaña et al., 2009) (Fig. 54).

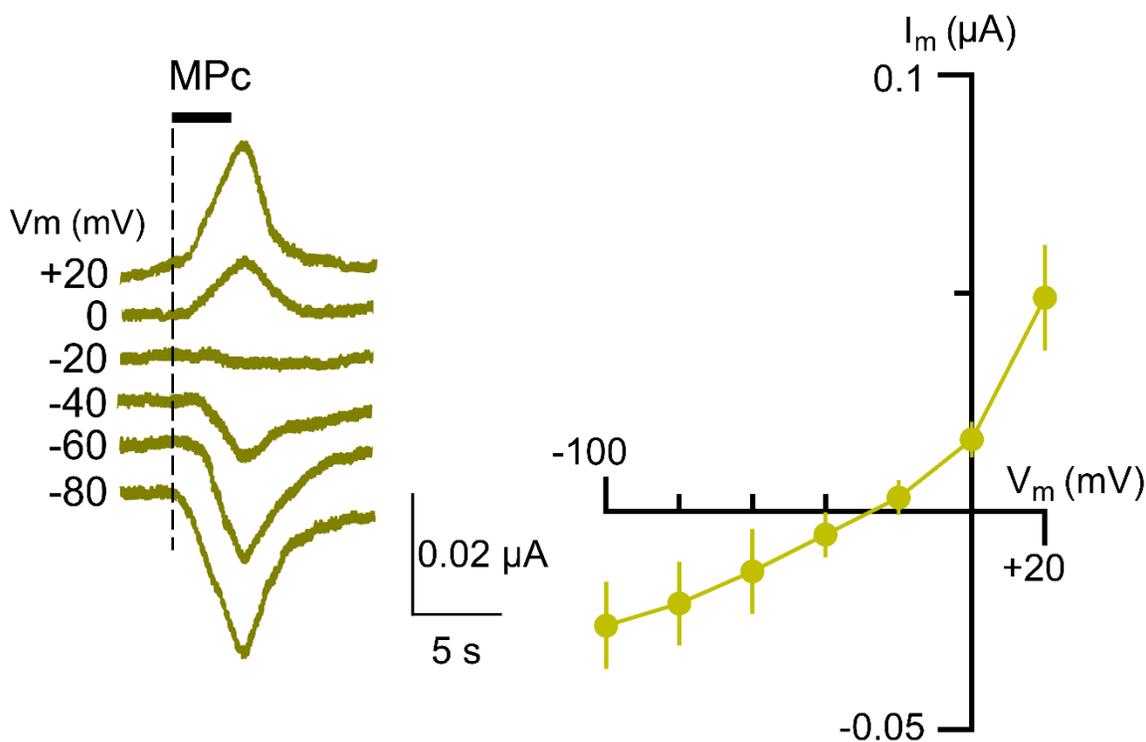


Figura 54. **Presencia de GABA en el medio condicionado de OPCs (MPc).** Los trazos ilustran la respuesta eléctrica a diferentes potenciales de membrana entre -100 y 0 mV (como se indica) ante la aplicación de medio condicionado de OPCs sobre ovocitos que expresaban al receptor  $\rho 1$ . La gráfica muestra la relación I/V obtenida de las respuestas a los diferentes potenciales de membrana, ante la aplicación de MPc en 12 ovocitos de tres ranas. Cada punto indica la media y las barras la desviación estándar.

En experimentos semejantes, al aplicar MPc sobre la superficie de ovocitos que expresaron el receptor neuronal no fue posible observar respuestas de manera consistente, y aplicaciones del doble del volumen muestran pequeñas corrientes en algunos casos de unidades de nA. Mientras que en aquellos ovocitos que expresaban al receptor a GABA  $\rho 1$  fueron detectadas corrientes tanto al aplicar sobre el ovocito MPc, como en aquellas aplicaciones del doble de su volumen (Fig. 55).

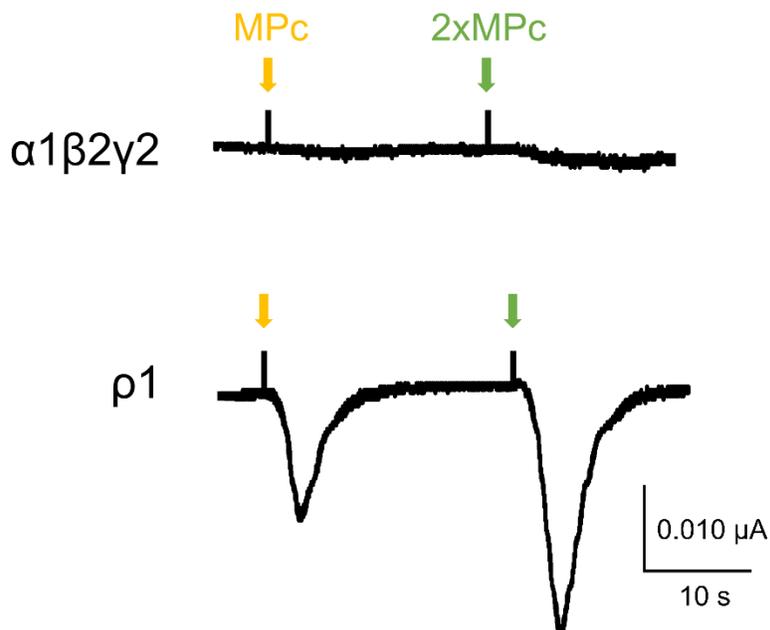


Figura 55. **Efecto del medio condicionado de OPCs (MPc) sobre ovocitos que expresaban  $GABA_A$ R.** Trazos representativos de la respuesta que tuvo la aplicación de MPc sobre ovocitos que expresaban al receptor neuronal  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$  y sobre aquellos que expresaban a receptor  $\rho 1$ . El medio condicionado de OPCs fue de 3 DIV. Las flechas indican la aplicación de un volumen de medio condicionado (color anaranjado) y la aplicación de una gota con el doble del volumen anterior (2xMPc; color azul).

El segundo método de detección de GABA fue mediante el uso de un ensayo de ELISA específico para la detección de GABA (con sensibilidad en el rango nM). La aplicación de este ensayo en el MPc indicó que la concentración de GABA en el medio condicionado de OPCs fue de  $1.51 \pm 0.5 \mu M$ , mientras que el MP proporcionó valores inferiores a  $0.05 \mu M$ . Ambos métodos sugieren que el medio de cultivo condicionado contenía GABA en el rango de unidades de micromolar.

## 8. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio aportan información esencial para la comprensión del papel de la señalización GABAérgica durante la progresión del linaje oligodendroglial, información que incluye la identificación de un grupo de sustancias que pueden modular positivamente de manera específica y diferencial a los receptores GABA<sub>A</sub> expresados en los oligodendrocitos. En la primera parte de la sección de resultados se indica que el efecto potenciador de la respuesta a GABA por la  $\beta$ -CCB, no es a través de su unión a los sitios clásicos de baja o de alta afinidad a BZDs. En la segunda parte, se describe con detalle la participación de las subunidades  $\alpha 3$  y  $\gamma 1$  del GABA<sub>A</sub>R en la respuesta a GABA de las células progenitoras del linaje oligodendroglial, así como la expresión de las proteínas de andamiaje sináptico colibistina y gefirina tanto en las OPCs como en OLs maduros. En la tercera parte de la sección de resultados, se muestra que la señalización GABAérgica, a través de los receptores GABA<sub>A</sub>, es determinante para la diferenciación en condiciones *in vitro* de las OPCs a OLs mielinizantes. Todos estos hallazgos conforman información original que contribuirá a un mayor entendimiento de este importante sistema de señalización en la oligodendrogénesis y la mielinización. La exploración de la participación de estas proteínas en la respuesta a GABA en dichas células tiene su antecedente directo en los hallazgos realizados por nuestro grupo en los últimos años. Estas evidencias fueron obtenidas, primeramente, a través del estudio funcional y farmacológico de la señalización GABAérgica entre los oligodendrocitos y las neuronas mantenidas en co-cultivo (Arellano et al., 2016) y en segundo lugar, por el estudio de la expresión heteróloga funcional de la combinación  $\alpha 3\beta 2\gamma 1$  en ovocitos de *Xenopus laevis* (Ordaz, 2017). El primer trabajo corresponde con el estudio farmacológico y funcional más detallado hasta el momento de los GABA<sub>A</sub>Rs expresados en oligodendrocitos, y en él se indica que en la conformación estequiométrica de estos receptores en los OLs participan principalmente las subunidades  $\alpha 3/\beta 2$  ó  $\beta 3/\gamma 1$  ó  $\gamma 3$ . En el segundo trabajo fue reportada la clonación de las subunidades propuestas a partir del mRNA purificado de oligodendrocitos, y fueron expresadas funcionalmente en un sistema heterólogo para realizar el análisis farmacológico de las respuestas a GABA. Entre las seis combinaciones posibles de las

subunidades propuestas, la combinación  $\alpha 3\beta 2\gamma 1$  reprodujo con mayor claridad el patrón farmacológico y funcional descrito para el receptor endógeno de oligodendrocitos. Es por esto último, que en el presente estudio se evaluó de manera directa si las subunidades  $\alpha 3$  y  $\gamma 1$  participan o no en la respuesta endógena a GABA en las OPCs. Una vez explorado esto, nos preguntamos si su silenciamiento tiene algún efecto sobre la progresión de las OPCs a oligodendrocitos maduros en condiciones *in vitro*.

La determinación de la identidad molecular del receptor oligodendroglial es esencial para entender el papel que tienen estos receptores ionotrópicos en la mielinización del SNC. Las investigaciones en esta área, apoyan de manera clara la idea de que la señalización mediante neurotransmisores, y en especial la GABAérgica, influye de manera positiva en los procesos de reparación de la sustancia blanca ante insultos o daños en el SNC (Arellano et al., 2016; Balia et al., 2017; Cisneros-Mejorado et al., 2020; Hamilton et al., 2017; Kalakh & Mouihate, 2019; Kalanjati et al., 2017; Serrano-Regal et al., 2020; Shaw et al., 2018; Zonouzi et al., 2015). Además, el descubrimiento de sustancias, como las  $\beta$ -carbolinas, que permitan la potenciación diferencial de la señalización GABAérgica entre los OLs y las neuronas (Arellano et al., 2016), constituye una herramienta para la búsqueda de soluciones a enfermedades desmielinizantes.

En esta sección se discutirán los resultados más relevantes del presente trabajo. Primero, se abundará en el efecto diferencial de la  $\beta$ -CCB en la respuesta a GABA en OLs y neuronas y su probable sitio de interacción sobre el receptor GABA<sub>A</sub>. Segundo, se analizará la participación de las subunidades  $\alpha 3$  y  $\gamma 1$  en la respuesta a GABA de estas células gliales. Y por último, se analizará la función del receptor formado por dichas subunidades, asociada a la maduración de las células del linaje oligodendroglial.

### **8.1 $\beta$ -carbolinas y su efecto en la respuesta a GABA en OLs y neuronas**

Las  $\beta$ -carbolinas son alcaloides indólicos, de origen natural o sintético con diferentes grados de aromaticidad. Su distribución en la naturaleza es muy amplia ya que pueden ser sintetizadas por varios grupos de plantas, organismos marinos, artrópodos, y mamíferos, incluyendo al hombre. Estos compuestos son de gran interés científico debido a sus diversas actividades biológicas, entre las que podemos citar la intercalación en el DNA, la inhibición de enzimas como la monoamino oxidasa A (MAOA) y la modulación alostérica de los receptores GABA<sub>A</sub> a través de su sitio de unión a BZDs (Cao et al., 2007). El N-butil- $\beta$ -carbolina-3-carboxilato ( $\beta$ -CCB) es una molécula endógena (Medina et al., 1989), que pertenece al grupo de las  $\beta$ -carbolinas insaturadas cuyo efecto sobre los receptores GABA<sub>A</sub> neuronales es como agonista inverso sobre el sitio de unión a BZDs (Peña et al., 1986; Rigo et al., 1994; Rigo et al., 1996). A diferencia de este efecto bien conocido sobre los receptores neuronales, este fármaco tiene la propiedad de modular de manera positiva y específica a la señalización GABAérgica en OLS *in vitro* (Arellano et al., 2016) y aparentemente también *in vivo* (Cisneros-Mejorado et al., 2020). Es por esta razón que fue esencial explorar con detalle la acción de la  $\beta$ -CCB sobre el receptor heterólogo  $\alpha 3\beta 2\gamma 1$  y su posible sitio de modulación alostérica positiva (PAM). Los resultados indicaron que el efecto potenciador de la  $\beta$ -CCB sobre la respuesta a GABA de este receptor heterólogo, es similar al observado sobre el endógeno oligodendroglial y que no requería de su interacción con el sitio clásico de unión a benzodiazepinas, ya que no fue antagonizado por FMZ. En cambio, FMZ causó un incremento en el efecto potenciador, sugiriendo, como se planteó antes (Sieghart, 2015), que la  $\beta$ -CCB tiene un efecto dual en el que el sitio clásico promueve inhibición de la respuesta a GABA (es decir, el efecto de agonista inverso) y un segundo sitio responsable de un efecto PAM. Los estudios previos han sugerido que este sitio de potenciación para  $\beta$ -carbolinas podría incluir residuos que conforman el sitio de unión de baja afinidad para DZP ubicado en los segundos segmentos transmembranales de las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$  (Walters et al., 2000). Por esto se realizaron mutaciones sitio específicas en el receptor  $\alpha 3\beta 2\gamma 1$  para eliminar los sitios de alta y baja afinidad a DZP. Las mutaciones eliminaron la sensibilidad a DZP como se describe para los receptores que contienen  $\gamma 2$  (Benson et al., 1998; Walters et al., 2000); sin embargo,  $\beta$ -CCB siguió siendo efectivo como potenciador en ambos mutantes, lo que indica que su efecto no se

debió a la interacción con los sitios propuestos previamente. Esta conclusión está respaldada por los resultados mostrados donde el receptor  $\alpha 3\beta 2$ , carente de subunidad  $\gamma$ , y por consiguiente de sitio clásico de unión a BZDs, muestra un grado de potenciación por  $\beta$ -CCB, aunque ésta es menor. Por lo tanto, el sitio de unión para  $\beta$ -CCB que actúa como potenciador en  $\alpha 3\beta 2\gamma 1$  continúa sin ser definido.

El GABA<sub>A</sub>R en OLs presentó un comportamiento similar con respecto al sitio de unión de alta afinidad de DZP, ya que el FMZ no antagonizó el efecto modulador alostérico positivo de la  $\beta$ -CCB. Esta evidencia confirma la idea de que el receptor  $\alpha 3\beta 2\gamma 1$  y el receptor endógeno de OLs son semejantes.

El efecto de modulación alostérica positiva sobre el receptor endógeno por parte de la  $\beta$ -CCB se debió a un aumento de cinco veces en la sensibilidad a GABA. El análisis del efecto de distintas  $\beta$ -carbolinas mostró que presentan una potencia diferencial sobre el receptor oligodendroglial con respecto al expresado en la neuronas corticales. Así, las drogas que generaron una potenciación sobre la respuesta neta a GABA en OLs, como  $\beta$ -CCB o  $\beta$ -CCE, no tuvieron un efecto notable en las neuronas; por lo tanto, pueden ser potencialmente utilizadas como fármacos para estimular diferencialmente la señalización GABAérgica en OLs. El grado de lipofilidad de las  $\beta$ -carbolinas parece ser determinante para la interacción positiva con el receptor, aquellas altamente lipofílicas como la  $\beta$ -CCB tuvieron mayor efecto modulador positivo, mientras que aquellas tales como el DMCM que son hidrofílicas fueron inhibitoras de la respuesta a GABA en ambos tipos de células. Esto sugiere que el sitio de unión potenciador para  $\beta$ -CCB puede estar situado en algún dominio lipofílico del receptor, probablemente un dominio transmembranal; por lo tanto, es muy probable que la composición específica de las membranas oligodendrogliales y neuronales influirían en el grado de inhibición o potenciación observado para las diferentes  $\beta$ -carbolinas. Este microambiente lipídico distinto también podría explicar algunas diferencias observadas entre el receptor endógeno de OLs y el sistema de expresión heteróloga utilizado en este estudio. Proponemos que este conjunto de sustancias constituye una potencial herramienta farmacológica en la búsqueda de soluciones terapéuticas a enfermedades que afecten

a la sustancia blanca. Algunas de las sustancias propuestas actualmente en este sentido incluyen al metabolito de la progesterona alopregnanolona (ALLO) que aumenta la producción de MBP en cortes organotípicos de cerebelo de rata, lo que requiere de la activación del GABA<sub>A</sub>R (Ghoumari et al., 2003). Los efectos de los neuroesteroides son de especial interés en el desarrollo posnatal, ya que podrían ayudar a prevenir los trastornos del neurodesarrollo asociados con el parto prematuro (Shaw et al., 2019). ALLO, que se sintetiza principalmente en la placenta, tiene un papel importante durante el desarrollo del sistema nervioso. En neonatos prematuros, la concentración de ALLO disminuye abruptamente y esta disminución se asocia, en parte, con hipomielinización (Shaw et al., 2015). En consecuencia, la administración experimental de la terapia de reemplazo del análogo de ALLO ganaxolona en neonatos prematuros de cobayos mostró efectos positivos sobre la mielinización, a través de su interacción con los GABA<sub>A</sub>Rs.

En el caso particular de la  $\beta$ -CCB, nuestro grupo ha mostrado que promueve la remielinización en un modelo de desmielinización inducida por gliotoxina en el pedúnculo caudal del cerebelo de rata evaluado mediante imagenología por resonancia magnética (MRI) junto con tinción histológica de mielina con Black Gold II (Cisneros-Mejorado et al., 2020). Todos estos resultados sugieren fuertemente que la señalización mediada por GABA<sub>A</sub>R promueve la mielinización y la remielinización en los OLs.

## **8.2 Participación de las subunidades $\alpha 3$ y $\gamma 1$ en la respuesta a GABA oligodendroglial**

Las OPCs utilizadas en este estudio fueron purificadas de cultivos primarios mixtos de células gliales de la corteza de ratas neonatas. En dicho cultivo mixto fueron identificadas, con ayuda del microscopio óptico de contraste de fases, a las OPCs, que son el segundo grupo de células con mayor densidad en estas condiciones *in vitro*, después de los astrocitos que forman una monocapa desde el cuarto día de cultivo. También fueron identificadas células que tienen características de pericitos (NG2<sup>+</sup>),

esta observación es interesante ya que este cultivo primario puede ser una preparación para el estudio de estas células y específicamente de su comunicación con las demás células del sistema, ya que se sabe que son células que forman parte de la unidad neurovascular (Brown et al., 2019; Girolamo et al., 2019; Palhol et al., 2022).

Las OPCs purificadas en estas condiciones, presentaron sensibilidad a GABA. Las características cinéticas y farmacológicas de la respuesta eléctrica al neurotransmisor fueron similares a las reportadas para los oligodendrocitos aislados de nervio óptico de rata. La sensibilidad a GABA del receptor que se expresa en su membrana, es relativamente baja, lo cual es una característica que comparte con el receptor endógeno de oligodendrocitos en cultivo (Arellano et al., 2016).

Una vez purificadas las células con morfología de OPCs mantenidas en MP tienen la capacidad de aumentar su número en el cultivo de forma casi exponencial (Sánchez-Gómez et al., 2018). Aunado a esto, el uso de inmunocitoquímica con marcadores oligodendrogiales específicos señaló que más del 80% de las células fueron positivas a los mismos (PDGFR $\alpha$ , NG2, Olig2), y negativas a MBP y GFAP indicando su identidad como OPCs. Esto coincide con lo reportado en otros trabajos en los que se emplearon preparaciones similares (Arellano et al., 2016; Sánchez-Gómez et al., 2018; Serrano-Regal et al., 2020). Es importante señalar, que para el marcador O4, se observó un aumento de la presencia de células que lo expresaban hacia el DIV 4. Esto sugiere, que en estas condiciones, algunas células comienzan a escapar de su estadio de OPC indiferenciado para entrar en el de pre-oligodendrocito (Barateiro & Fernandes, 2014). También, la caracterización electrofisiológica de las células confirmó un patrón consistente con las OPCs, ya que su respuesta eléctrica indicó que ante potenciales hiperpolarizantes no fueron generadas corrientes entrantes, lo cual indica la ausencia de corrientes tipo Kir, una característica de las membranas de las OPCs (Agathou & Káradóttir, 2019; Arellano et al., 2016; Lin & Bergles, 2004a; Pérez-Samartín et al., 2017). Mientras que ante pulsos a potenciales despolarizantes se observaron corrientes salientes de gran amplitud.

Esta característica relación I/V coincide con la reportada en trabajos anteriores para las OPCs (Arellano et al., 2016; Lin & Bergles, 2004a; Sánchez-Gómez et al., 2018). Además, que este perfil electrofisiológico se mantuvo constante durante al menos cuatro días en el cultivo (> 80% de las células monitoreadas). Ello brindó una ventana de tiempo suficiente para evaluar los efectos del silenciamiento específico de las subunidades GABA<sub>A</sub>.

Una vez establecido que estas células correspondieron mayoritariamente a OPCs, se procedió a explorar con mayor detalle la respuesta a la aplicación de GABA. Primero, las OPCs expresan varias subunidades de los GABA<sub>A</sub>Rs, excepto la  $\gamma 2$  lo cual coincide con lo reportado para la transcriptómica de estas células en diferentes análisis realizados en células NG2<sup>+</sup> (Cahoy et al., 2008; Larson et al., 2016), y el realizado por nuestro grupo para células PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup>, donde fue confirmado que la expresión de las secuencias codificantes de varias subunidades  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ , junto con  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ , y  $\gamma 1$ , presentaron los niveles más altos de expresión. Además de los bajos niveles de la subunidad  $\gamma 2$ , este análisis también destacó la baja o nula expresión de  $\gamma 3$  y  $\delta$  (Ordaz et al., 2021).

Desde el punto de vista funcional, las OPCs en MP mantuvieron su respuesta a GABA. Contrario a lo observado en OLs en diferenciación donde la expresión de los receptores GABA<sub>A</sub> está determinada por el contacto con las neuronas (Arellano et al., 2016). Esto sugiere que la expresión de este receptor probablemente también depende del grado de diferenciación en el que se encuentren las células del linaje oligodendroglial. En este sentido, se sabe que estas células son el único tipo glial que establece sinapsis química directa con las neuronas (Lin & Bergles, 2004a).

El GABA<sub>A</sub>R que se expresa en estas células, tiene características farmacológicas y funcionales semejantes al receptor endógeno de oligodendrocitos del nervio óptico y que es reproducido por la combinación heteróloga  $\alpha 3\beta 2\gamma 1$  (Arellano et al., 2016). Ya que la sensibilidad a GABA ( $EC_{50} = 85.2 \pm 4.42 \mu M$ ) indica que el receptor que expresan tiene una afinidad a GABA cercana a la reportada para el receptor nativo de

los oligodendrocitos ( $79 \pm 12 \mu\text{M}$ ; Arellano et al., 2016). La sensibilidad a  $\text{Zn}^{2+}$ , es otra característica importante que verificamos en la respuesta a GABA de estas OPCs. Así, encontramos que el receptor que expresan es sensible a  $\text{Zn}^{2+}$  ( $\text{IC}_{50}$  a  $\text{Zn}^{2+}$  de  $20.1 \pm 4.24 \mu\text{M}$ ) también similar a lo reportado para el receptor endógeno de oligodendrocitos, cuya  $\text{IC}_{50}$  es de aproximadamente  $10 \mu\text{M}$  (Arellano et al., 2016).

Los resultados obtenidos mostraron que el receptor expresado en las OPCs reproduce el patrón farmacológico y funcional del receptor nativo de OLs. Primero, el receptor no presentó sensibilidad a indiplon, como se sabe este es un potente modulador alostérico positivo sobre el sitio de benzodiazepinas, cuando está presente la subunidad  $\gamma 2$ . Segundo, la respuesta a GABA fue potenciada por DZP. El efecto de esta benzodiazepina clásica, confirma que el receptor expresado contiene el sitio clásico de unión a benzodiazepinas, lo que indica la incorporación de una subunidad  $\gamma$  en el receptor expresado en las OPCs tal y como fue demostrado para el receptor nativo de OLs del nervio óptico de rata.

Confirmamos que la  $\beta$ -CCB, tiene un efecto potenciador de la respuesta a GABA. Este resultado concuerda con lo reportado para el receptor de  $\text{GABA}_A$  oligodendrogial. La señalización  $\text{GABA}_A$ érgica tiene un papel importante en eventos esenciales en el proceso de mielinización (Arellano et al., 2016; Daneshdoust et al., 2017; Fattorini et al., 2017; Hamilton et al., 2017; Zonouzi et al., 2015) por lo que es importante la búsqueda de sustancias, que modulen específicamente a estos receptores en los oligodendrocitos, tal y como lo hace la  $\beta$ -CCB.

Podemos plantear que el receptor expresado en las OPCs mantenidas en MP por varios días reprodujo el patrón farmacológico y funcional del  $\text{GABA}_A$ R presente en los OLs del nervio óptico de rata, perfil que confirma un nuevo tipo de receptor endógeno. Esto último se sustenta en que la combinación de subunidades  $\text{GABA}_A$  que explica el perfil farmacológico y funcional en OLs y OPCs, no ha sido detectado 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  $\delta$  (receptores extrasinápticos) y los homopentámeros de  $\rho$ . La combinación propuesta tampoco coincide con los grupos de receptores (15 al menos) que se ha propuesto podrían ser expresados con una alta probabilidad. 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.

Teniendo en consideración que la caracterización de la respuesta a GABA de los OLS aislados del nervio óptico de rata (Arellano et al., 2016) y el estudio de la expresión heteróloga en ovocitos de *X. laevis* de varias subunidades GABA<sub>A</sub> proponen que el GABA<sub>A</sub>R endógeno expresado en células del linaje oligodendroglial probablemente está compuesto por la combinación de las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\beta 2$  y  $\gamma 1$ . En este trabajo fue explorado si las subunidades  $\alpha 3$  y  $\gamma 1$  están involucradas en la estequiometría del receptor endógeno mediante su silenciamiento con siRNAs en las OPCs mantenidas *in vitro*. Para ambas subunidades su silenciamiento disminuyó fuertemente la expresión de la proteína correspondiente y cambió sustancialmente la respuesta a GABA. El silenciamiento de la subunidad  $\alpha 3$  alteró la sensibilidad a GABA, así como la cinética de desensibilización de la misma y su sensibilidad a  $\beta$ -CCB. Estos resultados mostraron claramente que la subunidad  $\alpha 3$  contribuyó a las características endógenas de la respuesta GABA. Sin embargo, la amplitud máxima de dicha respuesta se mantuvo sin cambios. Los resultados sugieren que la eliminación de la  $\alpha 3$  evidenció la expresión de un segundo receptor endógeno, o alternativamente, que la ausencia de  $\alpha 3$  fue compensada por alguna otra subunidad, que en este caso conformó un receptor diferente. Las subunidades  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  son candidatas a esto último porque ambas se expresan en las OPCs, lo que explicaría el aumento de la sensibilidad a GABA y la tasa de desensibilización diferentes, ya que se ha reportado que los receptores con estas subunidades  $\alpha$  presentan valores de  $EC_{50}$  relativamente bajos y se desensibilizan con mayor rapidez (Berggaard et al., 2019; Gingrich et al., 1995).

El estudio de la distribución celular de las subunidades  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  indicó que ambas proteínas tienen una ubicación celular distinta. Mientras  $\alpha 2$  sólo se ubicó en el soma,

$\alpha 3$  se distribuyó de manera homogénea en toda la célula. Sin embargo, en las células tratadas con el  $\alpha 3$ -siRNA, la expresión de  $\alpha 2$  aumentó y su distribución se hizo más homogénea alcanzando las proyecciones celulares. Estos cambios en  $\alpha 2$  podrían estar relacionados con un posible efecto compensatorio en las células tratadas con el  $\alpha 3$ -siRNA. Todos estos resultados abren la posibilidad de que la subunidad  $\alpha 2$  contribuya en alguna medida con la integración de receptores GABA<sub>A</sub> en las OPCs.

El silenciamiento de la subunidad  $\gamma 1$  provocó, en cambio, una marcada disminución en la amplitud de la respuesta a GABA de las células tratadas. Lo que sugirió que  $\gamma 1$  es esencial para el ensamblado y expresión del GABA<sub>A</sub>R en la membrana de las OPCs. Se debe tener en cuenta que las subunidades  $\gamma$  son de importancia para el tránsito correcto del receptor desde el retículo endoplasmático rugoso hasta su ubicación final en la membrana plasmática (Martenson et al., 2017; Sarto-Jackson & Sieghart, 2008). Por lo tanto,  $\gamma 1$  representa la subunidad blanco con mayor potencial de ser eliminada o regulada a la baja en experimentos funcionales tanto *in vitro* como *in vivo*.

Como las células oligodendrogiales constituyen una población altamente dinámica y heterogénea, la expresión de los GABA<sub>A</sub>R y sus diferentes subunidades cambia a medida que estas células progresan a lo largo de su linaje, como ocurre con la expresión de ciertos canales iónicos (Spitzer et al., 2019), y estos cambios podrían afectar su relación intercelular y su diferenciación.

Los análisis realizados de la expresión de los mRNAs correspondientes a las diferentes subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  de los GABA<sub>A</sub>Rs en las OPCs demuestran que existe una gran heterogeneidad y complejidad en su regulación posnatal. Además, parece estar relacionada la expresión de ciertas subunidades no sólo con la ubicación del tejido analizado en el SNC, sino también con la edad en el desarrollo. Nuestros estudios empleando la técnica de RT-PCR en OPCs aisladas en cultivo primario indican la expresión de los mRNAs  $\alpha 3$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 3$ ,  $\gamma 1$  y  $\gamma 3$  y por medio de inmunocitoquímica confirmamos la expresión de las proteínas de  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 2$  y  $\gamma 1$  y la ausencia de  $\gamma 2$ . Por otro lado, los análisis de RT-PCR de célula única realizados en rebanadas de cerebro de ratón la etapa neonatal muestran una alta expresión para  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , y bajo nivel de expresión para  $\alpha 3$  (Balía et al., 2015; Passlick et al., 2013). Sin embargo, en el caso de

la subunidad  $\gamma$ , las observaciones son aún más controversiales, ya que Balia y colaboradores (2015) muestran que el orden del nivel de expresión es  $\gamma_3 > \gamma_1 > \gamma_2$ , mientras que Passlick y colaboradores (2013) muestran un orden de expresión  $\gamma_1 > \gamma_2 > \gamma_3$ . Esta diferencia puede ser debida a que las OPCs analizadas en cada estudio provienen de diferentes regiones cerebrales, en el primer caso de la corteza cerebral y en el segundo del hipocampo, tomando en consideración que la expresión de las subunidades GABA<sub>A</sub> es heterogénea entre diferentes regiones en el SNC (Laurie et al., 1992a; Laurie et al., 1992b; Wisden et al., 1992).

Los datos mostrados en los trabajos anteriormente mencionados para  $\alpha_3$ ,  $\beta_2$  y  $\gamma_1$  concuerdan con lo observado por nuestro grupo. Sin embargo, en este trabajo no fue evidenciada la expresión de la subunidad  $\gamma_2$ , cuya presencia está asociada con un posible papel en la formación de sinapsis neurona/OPC, y la presencia de esta disminuye con la edad junto con la densidad de contactos sinápticos GABAérgicos en células NG2<sup>+</sup> corticales de ratones maduros (Balía et al., 2015). Además, las células NG2<sup>+</sup> pueden cambiar la expresión de GABA<sub>A</sub>Rs de sináptica (con subunidad  $\gamma_2$ ) a extrasináptica (sin subunidad  $\gamma_2$ ) durante el desarrollo (Vélez-Fort et al., 2010). Los resultados mostrados por nuestro grupo en cuanto a los niveles de expresión de las subunidades GABA<sub>A</sub> en células PDGFR $\alpha$ <sup>+</sup> son apoyados por el trabajo de Larson y colaboradores (2016) realizado en células NG2<sup>+</sup>. En ambos casos entre las  $\alpha$ , las de mayor expresión son  $\alpha_3$  y  $\alpha_2$ , entre las  $\beta$  se encuentran a la  $\beta_3$  y a la  $\beta_2$  y entre las  $\gamma$  la subunidad  $\gamma_1$  es la de mayor nivel de expresión. Lo antes planteado resalta la necesidad de explorar las propiedades de los receptores GABA<sub>A</sub> en células del linaje que están en contacto sináptico con las neuronas y que cuya fisiología está modulada por la actividad neuronal. Von Blankenfeld y colaboradores (1991) plantearon que las características farmacológicas y cinéticas de la respuesta a GABA que ellos observaron tanto en las OPCs como en los OLs tenían muchas similitudes con la de las neuronas y no tanto con la de los astrocitos. En este trabajo y en sus antecedentes directos queda demostrado que existen varias características farmacológicas y funcionales que distinguen con claridad a los receptores GABA<sub>A</sub> expresados en las células de linaje oligodendroglial del expresados en neuronas.

Como se ha mencionado, las OPCs son las únicas células gliales que establecen sinapsis química directa con las neuronas (Jabs et al., 2005; Káradóttir et al., 2008; Kukley et al., 2007; Lin & Bergles, 2004a; Orduz et al., 2015; Tanaka et al., 2009; Zonouzi et al., 2015). De tal forma que los elementos que permiten la comunicación entre ambas células, deben tener una ubicación sináptica. Se conoce que en las neuronas se expresan las proteínas de andamiaje colibistina y gefirina (Choi & Ko, 2015; Harvey et al., 2004; Papadopoulos et al., 2008; Saiepour et al., 2010), que permiten la ubicación en la membrana postsináptica de receptores inhibitorios como los de glicina y los de GABA de tipo A. Considerando este importante antecedente, en este trabajo nos preguntamos si las proteínas de andamiaje se expresan tanto en las OPCs como en OLs maduros, además, nos preguntamos si las subunidades  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  podrían interactuar con gefirina, tal y como se ha demostrado con anterioridad en el ambiente neuronal (Maric et al., 2011; Saiepour et al., 2010; Tretter et al., 2008, 2011); los resultados indicaron que ambas condiciones son ciertas las proteínas de andamiaje se expresan en el sistema glial en cultivo, y para el caso de gefirina su colocalización con las subunidades  $\alpha$  sugirió una interacción. Esta información sugirió, en primer lugar, que la expresión de estas proteínas no es exclusivamente neuronal, en segundo lugar, muestra que las OPCs expresan la maquinaria necesaria para conformar placas sinápticas a través de moléculas de andamiaje, más aún, en este trabajo ha sido demostrado que las moléculas de andamiaje como gefirina tienen una mayor afinidad de interacción por la subunidad  $\alpha 3$  en las OPCs, esto refuerza la idea de la importancia de esta subunidad en la conformación de GABA<sub>A</sub>R oligodendroglial, y proporciona elementos para sugerir que los receptores sinápticos en las OPCs contienen  $\alpha 3$ . Esto último es consistente con datos electrofisiológicos obtenidos de células NG2<sup>+</sup>, en rebanadas de cerebro y de hipocampo, que muestran a estas células tienen una baja sensibilidad a GABA y respuestas a dicho neurotransmisor con una cinética lenta (Gingrich et al., 1995; Jabs et al., 2005; Lin & Bergles, 2004a).

### 8.3 El receptor GABA<sub>A</sub> y la diferenciación de las células del linaje oligodendroglial

La diferenciación de las OPCs y la mielinización son procesos exquisitamente coordinados y mediados por un diálogo entre las células neuronales y gliales que implican la participación de una variedad de señales y sistemas de comunicación intercelular, incluida la señalización de neurotransmisores como glutamato y GABA (Arellano et al., 2016; Hamilton et al., 2017; Li et al., 2013; Serrano-Regal et al., 2020; Zonouzi et al., 2015), así como la actividad neuronal (Fannon et al., 2015; Gibson et al., 2014; Wake et al., 2011). En concreto, las neuronas GABAérgicas establecen sinapsis directas con las OPCs en el SNC, existen evidencias que indican que esta comunicación podría en las OPCs controlar la proliferación, la migración, la diferenciación, y el establecimiento de contacto con los axones, así como la supervivencia de las OPCs en el cerebro adulto y el mantenimiento de la mielina (Balía et al., 2017; Kukley et al., 2007; Lin & Bergles, 2004a; Mount et al., 2019; Orduz et al., 2015; Vélez-Fort et al., 2010; Zonouzi et al., 2015). Sin embargo, la función precisa de GABA en la diferenciación y mielinización de las OPCs sigue siendo controversial. A diferencia de las neuronas maduras, la activación de los GABA<sub>A</sub>Rs en las OPCs conduce a la despolarización y a un aumento de los niveles de Ca<sup>2+</sup> citosólicos (Kirchhoff & Kettenmann, 1992), como resultado de la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de canales de calcio dependientes del voltaje (VGCC) (Paez & Lyons, 2020). Así, un aumento en la [Ca<sup>2+</sup>] en el citosol puede regular la proliferación, la migración y la maduración de las OPCs y, en consecuencia, la (re)mielinización a cargo de los OLs (Baraban et al., 2018; Cheli et al., 2016; Krasnow et al., 2018; Marisca et al., 2020; Santiago-González et al., 2017).

En conjunto, estos resultados indicaron la participación directa de las subunidades estudiadas en el proceso de maduración del linaje oligodendroglial y que dicho efecto está mediado a través de la función del receptor en la membrana de las OPCs. Estos resultados están en consonancia con reportes que indican que en la sustancia blanca del cerebelo de ratones neonatos, sometidos a un tratamiento hipóxico, se induce un decremento de la actividad sináptica GABAérgica en las OPCs que correlaciona con

mayor proliferación y una menor diferenciación hacia OLs, provocando un fenotipo hipomielinizante (Zonouzi et al., 2015). Recientemente, ha sido mostrado que en animales genéticamente manipulados que carecen de la subunidad  $\gamma 2$  en el GABA<sub>A</sub>R de las OPCs no mostraron alteraciones en la proliferación y en la diferenciación de las OPCs, sugiriendo que la transmisión sináptica medida por la presencia de esta subunidad no está involucrada en la progresión de las células del linaje de oligodendrocitos (Balía et al., 2017). Por lo que queda abierta la posibilidad de que un receptor con otra subunidad  $\gamma$  sea el mediador de estos procesos de la fisiología de las OPCs, evidentemente, por la información a través de varios estudios y los de nuestro laboratorio, el principal receptor oligodendroglial (desde OPCs hasta OLs) contine una subunidad  $\gamma$ , nosotros planteamos que esta es la subunidad  $\gamma 1$ . Es importante destacar que se ha reportado que en la diferenciación y la mielinización de los oligodendrocitos también participan los receptores metabotrópicos GABA<sub>B</sub>Rs (Serrano-Regal et al., 2020). Lo que refuerza la idea de que la mielinización en el SNC es un complejo proceso modulado a través de la señalización GABAérgica. Estos hallazgos sugieren fuertemente que la señalización GABAérgica (ya sea independiente o dependiente de la actividad neuronal) influye en el desarrollo y la diferenciación de las OPCs y, por lo tanto, puede ayudar a desarrollar nuevas terapias para aumentar la diferenciación de las OPCs en áreas cerebrales dañadas.

Se requiere de más esfuerzos para dilucidar el mecanismo molecular mediante el cual este tipo de receptores regulan la maduración de las células precursoras del linaje oligodendroglial. El GABA promueve la diferenciación de células progenitoras neuronales en el hipocampo, a través de entradas sinápticas provenientes de interneuronas (Tozuka et al., 2005), lo que hace hipotetizar que puede ocurrir un mecanismo similar para la progresión de las OPCs a OLs. En este sentido, se sabe que los GABA<sub>A</sub>R están vinculados a la señalización de las quinasas de la familia Src (SFK), que son tirosin-quinatas no receptoras que integran señales externas de los receptores de integrina y factor de crecimiento y transducen señales relacionadas con el desarrollo y la mielinización de OLs y SCs (Colognato et al., 2004; Melfi et al., 2017). En particular, las vías de señalización río abajo del miembro de la familia Src: Fyn regulan

la diferenciación morfológica de los OLs, el reclutamiento de componentes del citoesqueleto y la traducción local de MBP (Quintela-López et al., 2019; White & Krämer-Albers, 2014). La modulación del desarrollo de las SCs y su mielinización mediada por la acción del neuroesteroide ALLO, un potenciador de los GABA<sub>A</sub>Rs, en co-cultivos SC/DRG ocurre a través de la activación de señalización de Src y FAK, y es dependiente de los GABA<sub>A</sub>R y de la reorganización de la actina (Melfi et al., 2017). Además, los miembros de la familia Src pueden interactuar recíprocamente con quinasas de la familia MAPK, como la serina/treonina-proteína quinasa p38 MAPK, ya que c-Src provoca la fosforilación de MAPK p38 y viceversa (Lin et al., 2015; Mugabe et al., 2010; Wu et al., 2015). Por tanto, sería interesante investigar este tipo de interacciones en células mielinizantes, ya que p38 MAPK es un elemento clave en los pasos iniciales de la mielinización en SCs (Fragoso et al., 2003), así como en la maduración y mielinización de OLs ya que inhibidores específicos de p38 bloquean la mielinización *in vitro* de DRG por OLs (Fragoso et al., 2007). La desactivación condicional de p38 en las células oligodendrogiales provoca defectos en la mielinización en etapas tempranas del desarrollo (Chung et al., 2015). Sin embargo, estos hallazgos aún no han sido confirmados e inclusive existe información contradictoria ya que por ejemplo la eliminación de p38 en el mismo modelo de ratón aumenta la remielinización después de la desmielinización inducida por cuprizona (Chung et al., 2015), mientras que la eliminación selectiva de p38 $\alpha$ MAPK en OLs no compromete la mielinización en un modelo de ratón con leucomalacia periventricular (Chung et al., 2018). Estas evidencias contradictorias indican que el papel preciso de p38 MAPK en la diferenciación y mielinización y su relación con los GABA<sub>A</sub>R permanece sin ser por completo elucidada.

Por último, considerando los efectos dependientes de la señalización GABAérgica en el linaje oligodendrogial, nos preguntamos la posible fuente de este neurotransmisor en nuestras condiciones experimentales. Aunque se sabe que las neuronas GABAérgicas son la principal fuente de GABA (especialmente en el SNC), la síntesis de GABA también ocurre en las células gliales (Angulo et al., 2008; Héja et al., 2012; Seiler et al., 1979). Se han descrito dos rutas potenciales para la síntesis de GABA en células

gliales derivadas del cerebro. El GABA neuronal se produce principalmente a través de la ruta clásica como resultado de la descarboxilación del glutamato por las enzimas descarboxilasa del ácido glutámico (GAD) (Roberts & Frankel, 1950). En las neuronas, las dos isoformas de GAD, GAD65 y GAD67, difieren en sus propiedades catalíticas y cinéticas y en su distribución subcelular (Kaufman et al., 1991). Además, el GABA se puede sintetizar a partir de la monoacetilación de la putrescina con la participación de la monoamino oxidasa B (MAOB) que es una enzima de la vía no clásica (Seiler et al., 1973). Con base en datos transcriptómicos (Zhang et al., 2014), las células oligodendrogliales expresan los mRNA para *gad1*, *gad2* y *maob*. El mRNA de GAD67 (*gad1*) es expresado por las OPCs, aunque sus niveles disminuyen notablemente a medida que ocurre su diferenciación a OLs mielinizantes maduros. Sin embargo, *gad2* se expresa en menor medida a lo largo del linaje oligodendroglial. Con respecto a *maob*, las OPC y los OLs mielinizantes expresan niveles más altos que los OLs premielinizantes (Zhang et al., 2014). En consecuencia, fue confirmada la presencia de GAD65/67 en las células oligodendrogliales en condiciones *in vitro* (Serrano-Regal et al., 2020). De manera similar, fue verificada la expresión de la enzima MAOB en estas células. Estos resultados indican que las células oligodendrogliales cultivadas pueden sintetizar GABA por las dos rutas alternativas mencionadas anteriormente. Además, que podría liberarse mediante la operación inversa de los transportadores de GABA, incluidos GAT-1 y GAT-3, que se expresan en los OLs (Fattorini et al., 2017; Serrano-Regal et al., 2020).

Teniendo en cuenta lo antes mencionado, aquí mostramos que las OPCs en cultivo liberan GABA al medio extracelular. Esto hace pensar que el GABA liberado por los propios oligodendrocitos puede realizar efectos autocrinos y/o paracrinos que regulan la fisiología de las células del linaje oligodendroglial.

## 9. CONCLUSIONES

- I. El efecto potenciador de la respuesta a GABA provocado por la  $\beta$ -carbolina  $\beta$ -CCB es independiente de su unión a los sitios de baja y alta afinidad para BZDs.
- II. Las  $\beta$ -carbolinas modulan de manera diferencial a los receptores GABA<sub>A</sub> expresados en neuronas y en oligodendrocitos.
- III. Los receptores GABA<sub>A</sub> expresados por el linaje oligodendroglial contienen subunidades  $\alpha 3$ ,  $\beta 2$  y  $\gamma 1$ . Su interacción con proteínas de andamiaje indica su posible ubicación en la sinapsis OPC/neurona.
- IV. El receptor GABA<sub>A</sub> expresado en las células oligodendrogiales regula la diferenciación de las OPCs a OLs mielinizantes.

## 10. ANEXOS

### 10.1 Anexo I. Liberación de GABA en ovocitos de *Xenopus laevis*

#### 10.1.1 Introducción

La comunicación entre una célula y otra a través de mensajes químicos es un fenómeno que tiene su efecto directo sobre la homeostasis del tejido donde tiene lugar. Así, se sabe que la mayoría de las células en determinados contextos tienen la capacidad de liberar moléculas que al encontrar sus receptores en células diana. Estas señales desencadenan procesos fisicoquímicos que permiten a las células cumplir con sus actividades fisiológicas de acuerdo con los requerimientos del organismo como un todo. Un ejemplo de ello es que varias células liberan ATP en el medio extracelular que puede actuar sobre los receptores purinérgicos que regulan diversas funciones, incluido el dolor, la sensación del tacto, la transmisión sináptica, entre otros. En el caso particular de los ovocitos de *Xenopus laevis* se sabe que tienen la capacidad de liberar ATP mediante diferentes mecanismos, entre ellos la estimulación mecánica (Maroto & Hamill, 2001; Nakamura & Strittmatter, 1996; Saldaña et al., 2005, 2009). Aquí mostramos que estas células germinales también liberan GABA al medio extracelular. Esta propiedad podría ser relevante en la fisiología reproductiva, no solo de esta especie de anfibio, sino también en otros animales incluyendo al humano, ya que GABA a través de sus receptores GABA<sub>A</sub> promueve la capacitación e induce la reacción acrosomal en espermatozoides tanto de roedores como de anfibios (Burrello et al., 2004; Chen et al., 2005; Jin et al., 2009; Li et al., 2008; Shi et al., 1997), también promueve la maduración de los ovocitos en algunas especies de anfibios (Toranzo et al., 2008). Estas evidencias sugieren la probable participación de la señalización GABAérgica en el desarrollo de las células germinales de diferentes organismos y en el mecanismo de fertilización. Sin embargo, las posibles fuentes de GABA que podrían activar a los GABA<sub>A</sub>Rs en los espermatozoides no han sido completamente definidas. Aquí mostramos que los ovocitos de *Xenopus laevis* son capaces de liberar GABA al

medio extracelular, sugiriendo que la liberación de este neurotransmisor podría tener un papel importante en el proceso.

### 10.1.2 Resultados

Durante la realización de los experimentos para la detección de GABA en el medio condicionado de OPCs, fueron empleados ovocitos de *Xenopus laevis* que expresaban heterológicamente al receptor GABA<sub>A</sub> p1, como sensores de GABA (Fig. 1A). En estas condiciones experimentales fue observada la aparición de una corriente entrante espontánea de cinética lenta, cuando el flujo de RN en la cámara de registro fue suspendido, condición que le llamamos “off” (Fig. 1B).

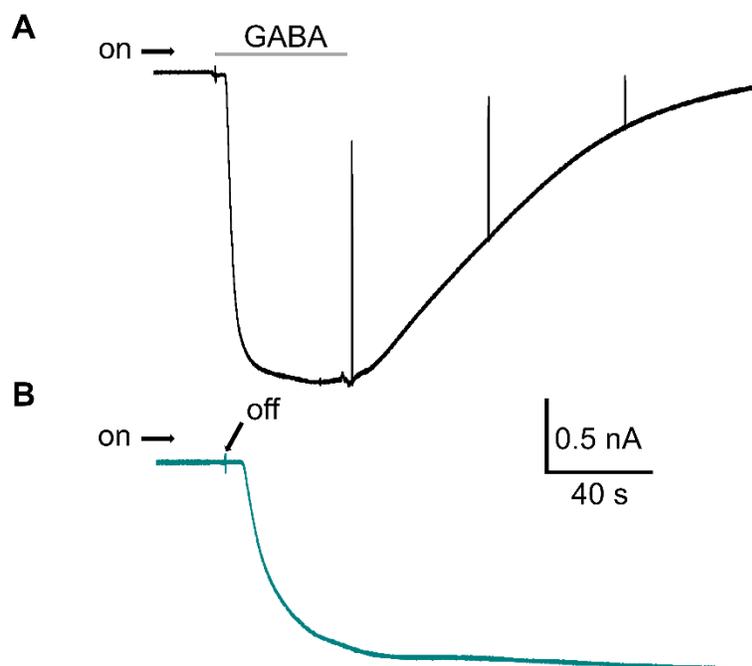


Figura 1. **Activación de una corriente entrante en ovocitos de *Xenopus laevis* p1<sup>+</sup>**. El trazo superior ilustra la respuesta a GABA 10  $\mu$ M (barra gris) de un ovocito p1<sup>+</sup>. El trazo inferior muestra el efecto que tiene el cierre del flujo de la solución RN por la cámara de registro donde se encuentra el mismo ovocito (indicado por la flecha off). El flujo nulo indujo la aparición de un corriente entrante lenta.

Para obtener más detalles sobre este fenómeno fueron realizados varios análisis. Primero, fue evidenciado que la aparición de la corriente es reproducible sobre el mismo ovocito ( $n=10$  ovocitos), tanto en  $p1^+$  como en los microinyectados con el cRNA de  $\alpha1\beta2\gamma2$  y  $\alpha3\beta2\gamma1$ , pero no en aquellos microinyectados con  $H_2O$ . A todos los ovocitos utilizados les fue medida la respuesta expresada a GABA ( $10 \mu M$  y/o  $100 \mu M$ ). Otra observación importante fue que los ovocitos que expresaban  $p1$  presentaron una corriente entrante de mantenimiento (1-3.7 nA) al comienzo del control de voltaje ( $v-c$ ), esta corriente inicial se cierra lentamente cuando en flujo del medio fue instalado dentro de la cámara de registro (Fig. 2).

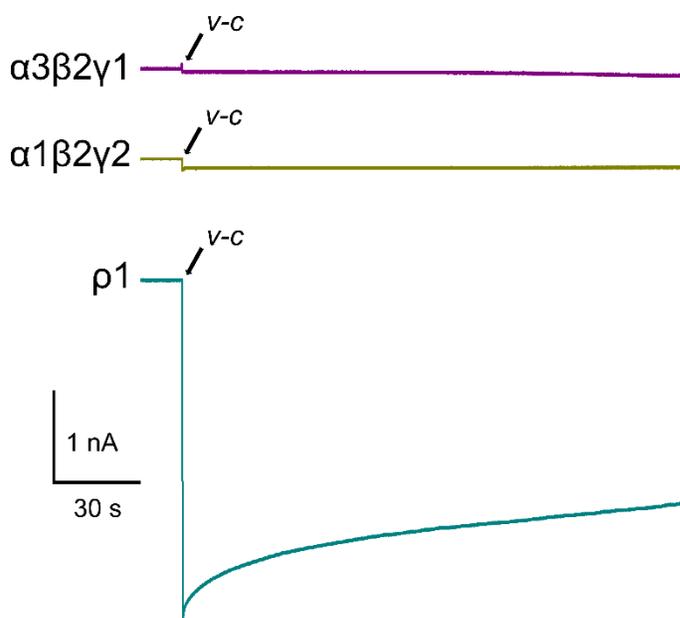


Figura 2. **Corriente de mantenimiento al inicio del registro de ovocitos de *Xenopus laevis*  $p1$ .** Los trazos se ilustra la respuesta que se observa al inicio del control de voltaje ( $v-c$ ) en ovocitos de *Xenopus laevis* que expresaban a los receptores  $\alpha3\beta2\gamma1$ ,  $\alpha1\beta2\gamma2$  y  $p1$ , como se indica.

Una vez inactivada la corriente de mantenimiento por acción de flujo, la condición "off" nuevamente generó la corriente (Fig. 3).

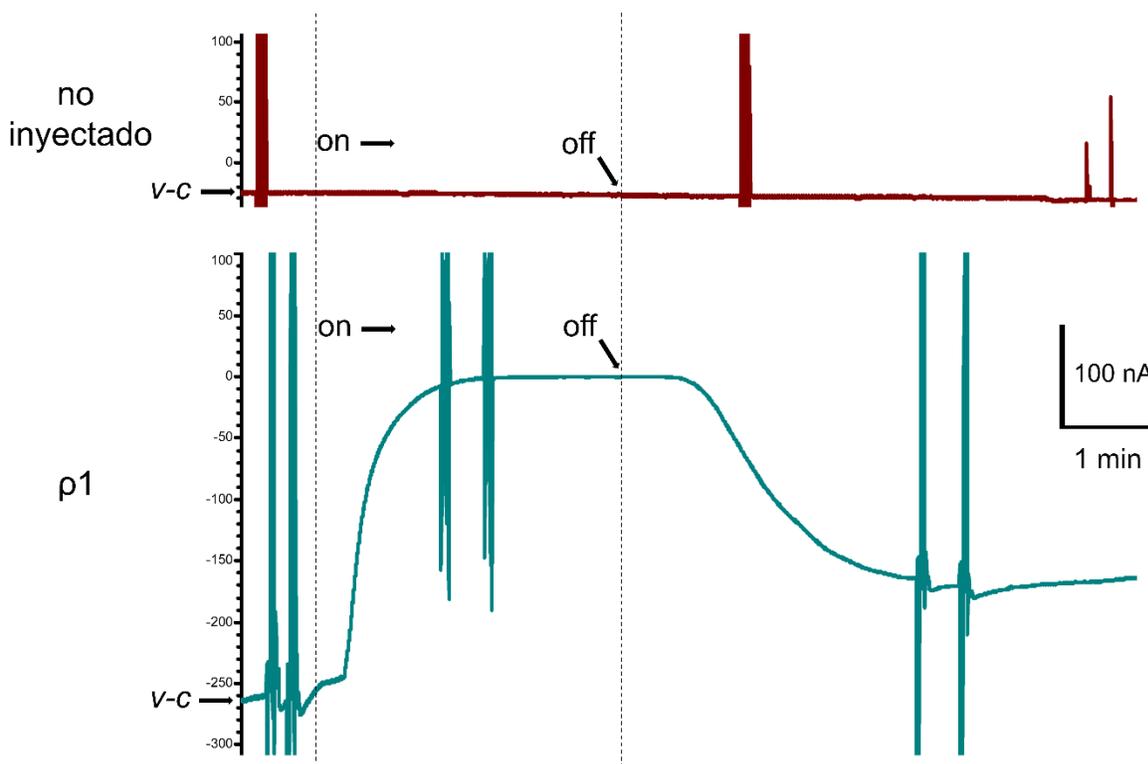


Figura 3. **Inactivación de la corriente de mantenimiento por acción del flujo en ovocitos de *Xenopus laevis*  $\rho 1^+$ .** El trazo superior ilustra la respuesta a la acción de flujo “on” de un ovocito no inyectado. El trazo inferior muestra el efecto que tiene la acción del flujo de la solución RN por la cámara de registro sobre la respuesta de un ovocito  $\rho 1^+$ . Además se muestra la activamos de la corriente entrante al “off” de flujo.

Debido a que los ovocitos control no inyectados no desarrollaron la corriente al “off”, la hipótesis más directa es que la corriente fue generada en los ovocitos expresando  $\rho 1$  a través de la activación de este receptor. Para explorar esta posibilidad activamos la corriente entrante al “off” en la presencia de picrotoxina o de  $Zn^{2+}$ , dos potentes inhibidores de los canales homoméricos  $GABA_A$   $\rho 1$  (Goutman & Calvo, 2004; Martínez-Torres, 2000). Ambas sustancias provocaron una reducción de la amplitud de la respuesta de corriente al “off”, así, picrotoxina (PTX, 10  $\mu M$ ) la redujo al  $60 \pm 18\%$ , mientras que  $Zn^{2+}$  (100  $\mu M$ ) la redujo al  $97 \pm 6\%$  (Fig. 4).

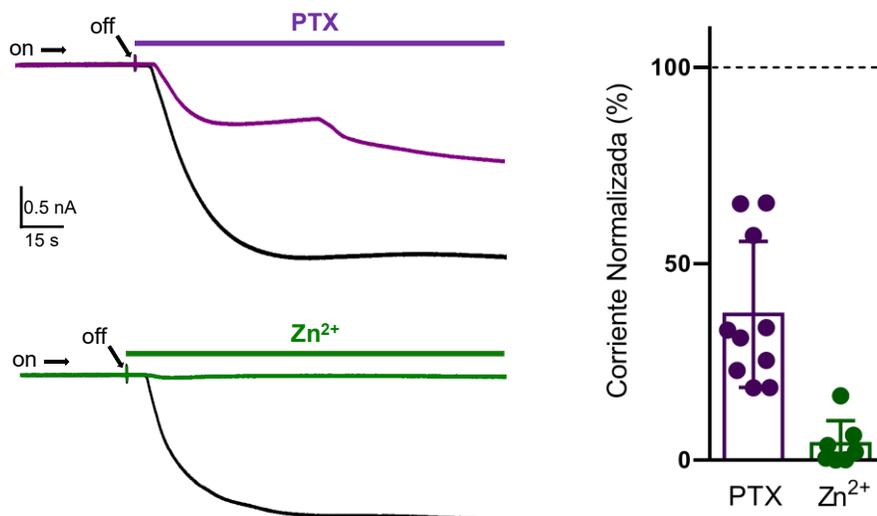


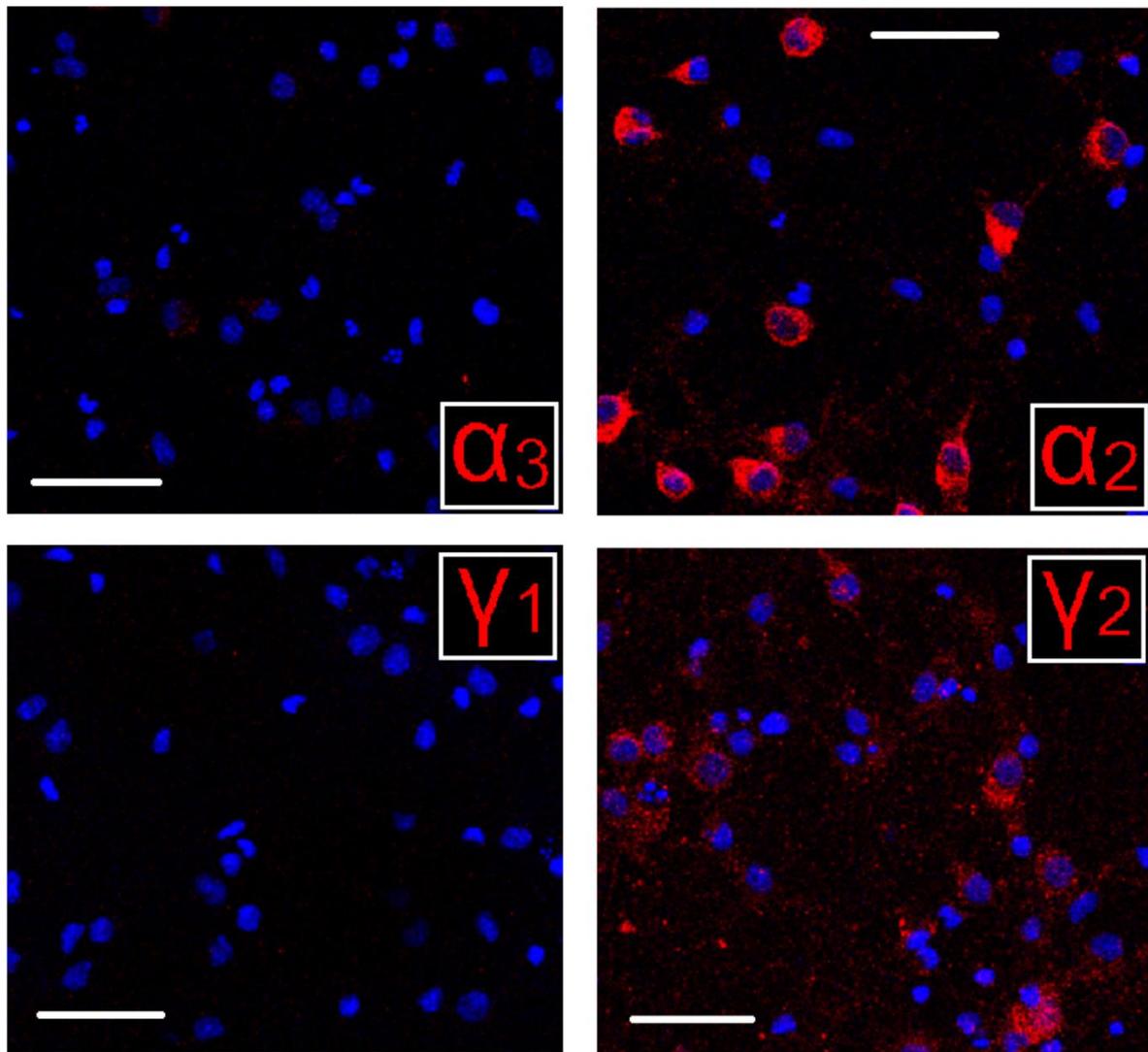
Figura 4. **Bloqueo farmacológico de la corriente ante el cierre del flujo de RN por la cámara de registro de ovocitos  $\rho 1^+$ .** Los trazos se ilustra la respuesta que se observa al cerrar el flujo de RN por la cámara de registro en ovocitos  $\rho 1$  (trazos en color negro). En el superior se muestra la respuesta al aplicar PTX 10  $\mu\text{M}$  (trazo de color morado) y en los trazos inferiores se muestra el efecto que tuvo el  $\text{Zn}^{2+}$  100  $\mu\text{M}$  (trazo de color verde). En la gráfica se muestra la respuesta normalizada (media  $\pm$  S.D.) de cada uno de los tratamiento analizados. Cada punto representa a una célula y la línea punteada indica el 100 % de la respuesta control. El efecto de PTX y de  $\text{Zn}^{2+}$  es estadísticamente significativo con respecto a la respuesta control,  $P < 0.0001$ , prueba "t" de Student.

Este conjunto de resultados sugirió que lo ovocitos de *Xenopus laevis* liberan GABA u otro agonista de los receptores a GABA al medio extracelular. Este agonista podría tener una influencia importante en los procesos de maduración del gameto y su fertilización.

### 10.1.3 Conclusión

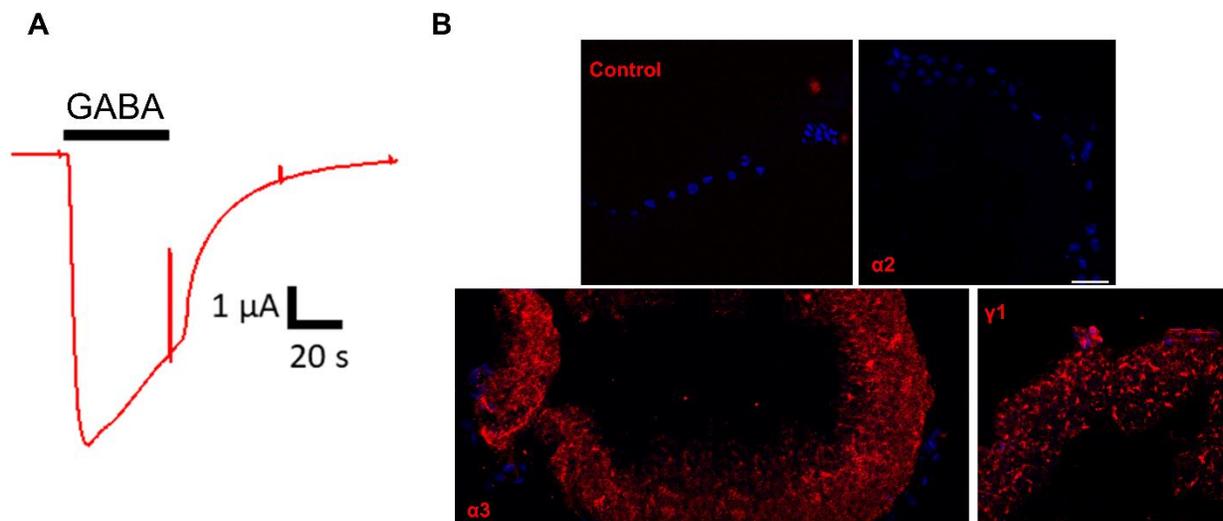
- Los ovocitos de *Xenopus laevis* liberan GABA al medio extracelular el cual puede tener efectos paracrinos en otras células germinales.

## 10.2 Anexo II



Anexo 2. **Expresión de subunidades GABA<sub>A</sub>R en neuronas corticales.** Análisis por inmunocitoquímica de neuronas corticales de rata mantenidas en cultivo. Los paneles muestran imágenes de microscopía confocal de la señal de fluorescencia para un anticuerpo específico contra las subunidades GABA<sub>A</sub>R (en rojo) indicadas en cada panel, y teñidos los núcleos con DAPI (azul). Barras = 50  $\mu$ m.

## 10.3 Anexo III



Anexo 3. **Evaluación de la especificidad de anticuerpos contra subunidades  $\text{GABA}_A\text{R}$  expresadas heterológamente en ovocitos de *Xenopus laevis*.** (A) El trazo ilustra la respuesta a 100  $\mu\text{M}$  de GABA de un ovocito que expresaba el receptor  $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ , obtenido con la técnica de control de voltaje con dos electrodos. (B) Análisis por inmunocitoquímica de cortes de los mismos ovocitos que expresaban el receptor  $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ . Los paneles muestran imágenes de microscopía confocal de la señal de fluorescencia para un anticuerpo específico contra las subunidades  $\text{GABA}_A\text{R}$  (en rojo) indicadas en cada panel, y teñidos los núcleos de las células foliculares con DAPI (azul). Barra = 50  $\mu\text{m}$ .

## 11. LITERATURA CITADA

- Afshari, F. S., Chu, A. K., & Sato-Bigbee, C. (2001). Effect of cyclic AMP on the expression of myelin basic protein species and myelin proteolipid protein in committed oligodendrocytes: differential involvement of the transcription factor CREB. *Journal of Neuroscience Research*, 66, 37–45.  
<https://doi.org/10.1002/jnr.1195>
- Agathou, S., & Káradóttir, R. T. (2019). Whole-cell patch clamp recordings from oligodendrocyte lineage cells in brain slices. En *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1936, pp. 141–168). Humana Press Inc. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9072-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9072-6_9)
- Allen, N. J., & Lyons, D. A. (2018). Glia as architects on central nervous system formation and function. *Science*, 362(6411), 181-185.  
<https://doi.org/10.1126/science.aat0473>
- Angulo, M. C., le Meur, K., Kozlov, A. S., Charpak, S., & Audinat, E. (2008). GABA, a forgotten gliotransmitter. En *Progress in Neurobiology* (Vol. 86, Issue 3, pp. 297–303). <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2008.08.002>
- Arancibia-Carcamo, I. L., & Attwell, D. (2014). The node of Ranvier in CNS pathology. *Acta Neuropathol*, 128, 161–175. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1305-z>
- Araujo, F., Ruano, D., & Vitorica, J. (1999). Native  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptors from rat hippocampus, containing both  $\alpha 1$  and  $\alpha 5$  subunits, exhibit a single benzodiazepine binding site with  $\alpha 5$  pharmacological properties. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 290(3), 989–997.  
<http://www.jpet.org>
- Arellano, R. O., Garay, E., & Miledi, R. (1998).  $\text{Cl}^-$  currents activated via purinergic receptors in *Xenopus* follicles. In *Am. J. Physiol* (Vol. 274).

- Arellano, R. O., & Miledi, R. (1993). Novel Cl<sup>-</sup> currents elicited by follicle stimulating hormone and acetylcholine in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *The Journal of General Physiology*, 102, 833–857. <https://doi.org/10.1085/jgp.102.5.833>
- Arellano, R. O., Sánchez-Gómez, M. V., Alberdi, E., Canedo-Antelo, M., Chara, J. C., Palomino, A., Pérez-Samartín, A., & Matute, C. (2016). Axon-to-glia interaction regulates GABA<sub>A</sub> receptor expression in oligodendrocytes. *Molecular Pharmacology*, 89(1), 63–74. <https://doi.org/10.1124/mol.115.100594>
- Arellano, R. O., Woodward, R. M., & Miledi, R. (1995). A monovalent cationic conductance that is blocked by extracellular divalent cations in *Xenopus* oocytes. *Journal of Physiology*, 484(3), 593–604. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1157946/pdf/jphysiol00324-0064.pdf>
- Attali, B., Wang, N., Kolot, A., Sobko, A., Cherepanov, V., & Soliven, B. (1997). Characterization of delayed rectifier Kv channels in oligodendrocytes and progenitor cells. *The Journal of Neuroscience*, 17(21), 8234–8245.
- Balia, M., Benamer, N., & Angulo, M. C. (2017). A specific GABAergic synapse onto oligodendrocyte precursors does not regulate cortical oligodendrogenesis. *Glia*, 1–12. <https://doi.org/10.1002/glia.23197>
- Balia, M., Vélez-Fort, M., Passlick, S., Schäfer, C., Audinat, E., Steinhäuser, C., Seifert, G., & Angulo, M. C. (2015). Postnatal down-regulation of the GABA<sub>A</sub> Receptor  $\gamma$ 2 subunit in neocortical NG2 cells accompanies synaptic-to-extrasynaptic switch in the GABAergic transmission mode. *Cerebral Cortex*, 25(4), 1114–1123. <https://doi.org/10.1093/cercor/bht309>
- Baraban, M., Koudelka, S., & Lyons, D. A. (2018). Ca<sup>2+</sup> activity signatures of myelin sheath formation and growth *in vivo*. *Nature Neuroscience*, 21, 19–23. <https://doi.org/10.1038/s41593-017-0040-x>
- Baracsckay, K. L., Duchala, C. S., Miller, R. H., Macklin, W. B., & Trapp, B. D. (2002). Oligodendrogenesis is differentially regulated in gray and white matter of jimpy mice. *Journal of Neuroscience Research*, 70(5), 645–654. <https://doi.org/10.1002/jnr.10418>

- Barateiro, A., & Fernandes, A. (2014). Temporal oligodendrocyte lineage progression: *In vitro* models of proliferation, differentiation and myelination. En *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1843, Issue 9, pp. 1917–1929). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.04.018>
- Barca-Mayo, O., & Lu, Q. R. (2012). Fine-tuning oligodendrocyte development by microRNAs. *Frontiers in Neuroscience*, 6(13), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fnins.2012.00013>
- Barres, B. A., Hart, I. K., Fl Coles, H. S., Burne, J. F., Voyvodic, J. T., Richardson, W. D., & Raff, M. C. (1992). Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell*, 70, 31–46.
- Barres, B. A., Koroshetz, W. J., Y Chun, L. L., & Corey, D. P. (1990). Ion channel expression by white matter glia: The type-1 astrocyte. *Neuron*, 5, 527–544.
- Barres, B. A., & Raff, M. C. (1994). Control of oligodendrocyte number in the developing rat optic nerve. *Neuron*, 12, 935–942.
- Baur, R., Tan, K. R., Lüscher, B. P., Gonthier, A., Goeldner, M., & Sigel, E. (2008). Covalent modification of GABA<sub>A</sub> receptor isoforms by a diazepam analogue provides evidence for a novel benzodiazepine binding site that prevents modulation by these drugs. *Journal of Neurochemistry*, 106(6), 2353–2363. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05574.x>
- Baydyuk, M., Morrison, V. E., Gross, P. S., & Huang, J. K. (2020). Extrinsic factors driving oligodendrocyte lineage cell progression in CNS development and injury. *Neurochemical Research*, 45(3), 630–642. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-02967-7>
- Bechler, M. E., Byrne, L., & Ffrench-Constant, C. (2015). CNS myelin sheath lengths are an intrinsic property of oligodendrocytes. *Current Biology*, 25(18), 2411–2416. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.056>

- Bedford, F. K., Kittler, J. T., Muller, E., Thomas, P., Uren, J. M., Merlo, D., Wisden, W., Triller, A., Smart, T. G., & Moss, S. J. (2001). GABA<sub>A</sub> receptor cell surface number and subunit stability are regulated by the ubiquitin-like protein Plic-1. *Nature Neuroscience*, 4(9), 908–916. <https://doi.org/10.1038/nn0901-908>
- Behar, T., McMorris, F. A., Novotnf, E. A., Barker, J. L., & Dubois-Dalcq, M. (1988). Growth and differentiation properties of O-2A progenitors purified from rat cerebral hemispheres. *Journal of Neuroscience Research*, 21, 168–180.
- Benke, D., Fakitsas, P., Roggenmoser, C., Michel, C., Rudolph, U., & Mohler, H. (2004). Analysis of the presence and abundance of GABA<sub>A</sub> receptors containing two different types of  $\alpha$  subunits in murine brain using point-mutated  $\alpha$  subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 279(42), 43654–43660. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407154200>
- Benke, D., Mertens, S., Trzeciak, A., Gillessen, D., & Mohler, H. (1991). GABA<sub>A</sub> receptors display association of  $\gamma$ 2-subunit with  $\alpha$ 1-subunit and  $\beta$ 2/3-subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 266(7), 4478–4483.
- Benson, J. A., Lo, K., Keist, R., Mohler, H., & Rudolph, U. (1998). Pharmacology of recombinant  $\gamma$ -aminobutyric acid A receptors rendered diazepam-insensitive by point-mutated  $\alpha$ -subunits. *FEBS Letters*, 431, 400–404.
- Berggaard, N., Witter, M. P., & van der Want, J. J. L. (2019). GABA<sub>A</sub> receptor subunit  $\alpha$ 3 in network dynamics in the medial entorhinal cortex. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 13(10). <https://doi.org/10.3389/fnsys.2019.00010>
- Bergles, D. E. (2012): Physiology of NG2<sup>+</sup> glial cells. Oxford University Press. New York.
- Bergles, D. E., Roberts, J. D. B., Somogyi, P., & Jahr, C. E. (2000). Glutamatergic synapses on oligodendrocyte 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., Kaupmann, K., Mosbacher, J., & Gassmann, M. (2004). Molecular structure and physiological functions of GABA<sub>B</sub> receptors. *Physiological Reviews*, 84(3), 835–867. <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2003>

Bhat, R., Axtell, R., Mitra, A., Miranda, M., Lock, C., Tsien, R. W., & Steinman, L. (2010). Inhibitory role for GABA in autoimmune inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(6), 2580–2585. <https://doi.org/10.1073/pnas.0915139107>

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

Bronstein, J. M., Hales, T. G., Tyndale, R. F., & Charles, A. C. (1998). A conditionally immortalized glial cell line that expresses mature myelin proteins and functional GABA<sub>A</sub> receptors. *Journal of Neurochemistry*, 70, 483–491.

Brown, L. S., Foster, C. G., Courtney, J. M., King, N. E., Howells, D. W., & Sutherland, B. A. (2019). Pericytes and neurovascular function in the healthy and diseased brain. En *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00282>

Burrello, N., Vicari, E., Amico, D., Satta, A., D'agata, R., & Calogero, A. E. (2004). Human follicular fluid stimulates the sperm acrosome reaction by interacting with the-aminobutyric acid receptors. *Steril*, 82(3), 1086–1090. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004>

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., Ibrahim, M., & Berry, M. (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., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L. C., Zamanian, J. L., Christopherson, K. S., Xing, Y., Lubischer, J. L., Krieg, P. A., Krupenko, S. A., Thompson, W. J., & Barres, B. A. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *Journal of Neuroscience*, *28*(1), 264–278.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008>
- Cao, R., Peng, W., Wang, Z., & Xu, A. (2007). Carboline Alkaloids: Biochemical and Pharmacological Functions. En *Current Medicinal Chemistry* (Vol. 14).
- Cesetti, T., Ciccolini, F., & Li, Y. (2012). GABA not only a neurotransmitter: osmotic regulation by GABA<sub>A</sub>R signaling. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *6*(3), 1–14.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2012.00003>
- Cheli, V. T., Santiago González, D. A., Lama, T. N., Spreuer, V., Handley, V., Murphy, G. G., & Paez, P. M. (2016). Conditional deletion of the L-type calcium channel Cav1.2 in oligodendrocyte progenitor cells affects postnatal myelination in mice. *The Journal of Neuroscience*, *36*(42), 10853–10869.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1770-16.2016>
- Cheli, V. T., Santiago González, D. A., Spreuer, V., & Paez, P. M. (2015). Voltage-gated Ca<sup>2+</sup> entry promotes oligodendrocyte progenitor cell maturation and myelination in vitro. *Experimental Neurology*, *265*, 69–83.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2014.12.012>
- Chen, T. J., Kula, B., Nagy, B., Barzan, R., Gall, A., Ehrlich, I., & Kukley, M. (2018). In vivo regulation of oligodendrocyte precursor cell proliferation and differentiation by the AMPA-receptor subunit GluA2. *Cell Reports*, *25*(4), 852–861.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.066>
- Chen, W. Y., Ni, Y., Pan, Y. M., Shi, Q. X., Yuan, Y. Y., Chen, A. J., Mao, L. Z., Yu, S. Q., & Roldan, E. R. S. (2005). GABA, progesterone and zona pellucida activation of PLA2 and regulation by MEK-ERK1/2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. *FEBS Letters*, *579*(21), 4692–4700.  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.06.090>

- Chen, Y., Balasubramaniyan, V., Peng, J., Hurlock, E. C., Tallquist, M., Li, J., & Lu, Q. R. (2007). Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells. *Nature Protocols*, 2(5), 1044–1051. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.149>
- Choi, G., & Ko, J. (2015). Gephyrin: a central GABAergic synapse organizer. En *Experimental & molecular medicine* (Vol. 47, p. e158). <https://doi.org/10.1038/emm.2015.5>
- Chung, S. H., Biswas, S., Selvaraj, V., Liu, X. B., Sohn, J., Jiang, P., Chen, C., Chmielewsky, F., Marzban, H., Horiuchi, M., Pleasure, D. E., & Deng, W. (2015). The p38 $\alpha$  mitogen-activated protein kinase is a key regulator of myelination and remyelination in the CNS. *Cell Death and Disease*, 6(5). <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.119>
- Chung, S. H., Biswas, S., Sohn, J., Jiang, P., Dehghan, S., Marzban, H., & Deng, W. (2018). The p38 $\alpha$  MAPK deletion in oligodendroglia does not attenuate myelination defects in a mouse model of periventricular leukomalacia. *Neuroscience*, 386, 175–181. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.06.037>
- Cisneros-Mejorado, A. J., Garay, E., Ortiz-Retana, J., Concha, L., Moctezuma, J. P., Romero, S., & Arellano, R. O. (2020). Demyelination–remyelination of the rat caudal cerebellar peduncle evaluated with magnetic resonance imaging. *Neuroscience*, 439, 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.06.042>
- Clements, C. S., Reid, H. H., Beddoe, T., Tynan, F. E., Perugini, M. A., Johns, T. G., Bernard, C. C. A., & Rossjohn, J. (2003). The crystal structure of myelin oligodendrocyte glycoprotein, a key autoantigen in multiple sclerosis. *PNAS*, 100(19), 11059–11064. [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)
- Colognato, H., Ramachandrapa, S., Olsen, I. M., & Ffrench-Constant, C. (2004). Integrins direct Src family kinases to regulate distinct phases of oligodendrocyte development. *Journal of Cell Biology*, 167(2), 365–375. <https://doi.org/10.1083/jcb.200404076>

- Colom-Casasnovas, A., Garay, E., Cisneros-Mejorado, A., Aguilar, M. B., Lazcano-Pérez, F., Arellano, R. O., & Sánchez-Rodríguez, J. (2022). Sea anemone *Bartholomea annulata* venom inhibits voltage-gated Na<sup>+</sup> channels and activates GABA<sub>A</sub> receptors from mammals. *Scientific Reports*, *12*(5352), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09339-x>
- Daneshdoust, D., Khalili-Fomeshi, M., Ghasemi-Kasman, M., Ghorbanian, D., Hashemian, M., Gholami, M., Moghadamnia, A., & Shojaei, A. (2017). Pregabalin enhances myelin repair and attenuates glial activation in lysolecithin-induced demyelination model of rat optic chiasm. *Neuroscience*, *344*, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.12.037>
- de Biase, L. M., Nishiyama, A., & Bergles, D. E. (2010). Excitability and synaptic communication within the oligodendrocyte lineage. *Journal of Neuroscience*, *30*(10), 3600–3611. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6000-09.2010>
- 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.
- Demerens, C., Stankoff, B., Logak, M., Angladet, P., Allinquantt, B., Couraud, F., Zalc, B., Lubetzki, C., & Linington, C. (1996). Induction of myelination in the central nervous system by electrical activity. *Neurobiology*, *93*, 9887–9892.
- Doyon, N., Vinay, L., Prescott, S. A., & de Koninck, Y. (2016). Chloride regulation: a dynamic equilibrium crucial for synaptic inhibition. *Neuron*, *89*(6), 1157–1172. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.02.030>
- Dugas, J. C., & Emery, B. (2013). Purification of oligodendrocyte precursor cells from rat cortices by immunopanning. *Cold Spring Harbor Protocols*, *2013*(8), 745–758. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot070862>
- Dumont, J. N. (1972). Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *Journal of Morphology*, *136*(2), 153–179. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051360203>

- Emery, B. (2010). Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Science*, 330(6005). <https://doi.org/10.1126/science.1190927>
- Erdö, S. L. (1992). Non-neuronal GABA systems: an overview. En *GABA outside the CNS* (pp. 97–110). Springer-Verlag.
- Essrich, C., Lorez, M., Benson, J. A., Fritschy, J.-M., & Lüscher, B. (1998). Postsynaptic clustering of major GABA<sub>A</sub> receptor subtypes requires the  $\gamma$ 2 subunit and gephyrin. *Nature Neuroscience*, 1(7), 563–571. <http://neurosci.nature.com>
- Fannon, J., Tarmier, W., & Fulton, D. (2015). Neuronal activity and AMPA-type glutamate receptor activation regulates the morphological development of oligodendrocyte precursor cells. *GLIA*, 63(6), 1021–1035. <https://doi.org/10.1002/glia.22799>
- Fattorini, G., Melone, M., Sánchez-Gómez, M. V., Arellano, R. O., Bassi, S., Matute, C., & Conti, F. (2017). GAT-1 mediated GABA uptake in rat oligodendrocytes. *Glia*, 65(3), 514–522. <https://doi.org/10.1002/glia.23108>
- Fontenas, L., Welsh, T. G., Piller, M., Coughenour, P., Gandhi, A. v., Prober, D. A., & Kucenas, S. (2019). The neuromodulator adenosine regulates oligodendrocyte migration at motor exit point transition zones. *Cell Reports*, 27, 115–128. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.013>
- Ford, M. C., Alexandrova, O., Cossell, L., Stange-Marten, A., Sinclair, J., Kopp-Scheinflug, C., Pecka, M., Attwell, D., & Grothe, B. (2015). Tuning of Ranvier node and internode properties in myelinated axons to adjust action potential timing. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms9073>
- Fragoso, G., Haines, J. D., Roberston, J., Pedraza, L., Mushynski, W. E., & Almazan, G. (2007). p38 mitogen-activated protein kinase is required for central nervous system myelination. *GLIA*, 55(15), 1531–1541. <https://doi.org/10.1002/glia.20567>

- Fragoso, G., Robertson, J., Athlan, E., Tam, E., Almazan, G., & Mushynski, W. E. (2003). Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase interferes with cell shape changes and gene expression associated with Schwann cell myelination. *Experimental Neurology*, *183*(1), 34–46. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00101-8](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00101-8)
- Frederickson, C. J., & Bush, A. I. (2001). Synaptically released zinc: physiological functions and pathological effects. *BioMetals*, *14*, 353–366.
- Freeman, M. R., & Rowitch, D. H. (2013). Evolving concepts of gliogenesis: a look way back and ahead to the next 25 years. *Neuron*, *80*(3), 613–623. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.034>
- Frühbeis, C., Fröhlich, D., Kuo, W. P., Amphornrat, J., Thilemann, S., Saab, A. S., Kirchhoff, F., Möbius, W., Goebbels, S., Nave, K. A., Schneider, A., Simons, M., Klugmann, M., Trotter, J., & Krämer-Albers, E. M. (2013). Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication. *PLoS Biology*, *11*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001604>
- Gautier, H. O. B., Evans, K. A., Volbracht, K., James, R., Sitnikov, S., Lundgaard, I., James, F., Lao-Peregrin, C., Reynolds, R., Franklin, R. J. M., & Káradóttir, R. T. (2015). Neuronal activity regulates remyelination via glutamate signalling to oligodendrocyte progenitors. *Nature Communications*, *6*(8518), 1–15. <https://doi.org/10.1038/ncomms9518>
- Ghoumari, A. M., Ibanez, C., El-Etr, M., Leclerc, P., Eychenne, B., O'Malley, B. W., Baulieu, E. E., & Schumacher, M. (2003). Progesterone and its metabolites increase myelin basic protein expression in organotypic slice cultures of rat cerebellum. *Journal of Neurochemistry*, *86*(4), 848–859. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01881.x>
- Gibson, E. M., Purger, D., Mount, C. W., Goldstein, A. K., Lin, G. L., Wood, L. S., Inema, I., Miller, S. E., Bieri, G., Zuchero, J. B., Barres, B. A., Woo, P. J., Vogel, H., & Monje, M. (2014). Neuronal activity promotes oligodendrogenesis and adaptive myelination in the mammalian brain. *Science*, *344*(6183). <https://doi.org/10.1126/science.1252304>

- Gilbert, P., Kettenmann, H., & Schachner, M. (1984).  $\gamma$ -Aminobutyric acid directly depolarizes cultured oligodendrocytes. *The Journal of Neuroscience*, 4(2), 561–569.
- Gingrich, K. J., Roberts, W. A., & Kass, R. S. (1995). Dependence of the GABA<sub>A</sub> receptor gating kinetics on the  $\alpha$ -subunit isoform: implications for structure-function relations and synaptic transmission. *Journal of Physiology*, 489(2), 529–543. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1156777/pdf/jphysiol00305-0228.pdf>
- Girolamo, F., Errede, M., Longo, G., Annese, T., Alias, C., Ferrara, G., Morando, S., Trojano, M., de Rosbo, N. K., Uccelli, A., & Virgintino, D. (2019). Defining the role of NG2-expressing cells in experimental models of multiple sclerosis. A biofunctional analysis of the neurovascular unit in wild type and NG2 null mice. *PLoS ONE*, 14(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213508>
- Golec, W., Sołowiej, E., Strzelecka, J., Jurkiewicz, E., & Józwiak, S. (2021). Vigabatrin — new data on indications and safety in paediatric epilepsy. En *Neurologia i Neurochirurgia Polska* (Vol. 55, Issue 5, pp. 429–439). Via Medica. <https://doi.org/10.5603/PJNNS.a2021.0063>
- Goncalves, M. B., Wu, Y., Clarke, E., Grist, J., Hobbs, C., Trigo, D., Jack, J., & Corcoran, J. P. T. (2019). Regulation of myelination by exosome associated retinoic acid release from NG2-positive cells. *Journal of Neuroscience*, 39(16), 3013–3027. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2922-18.2019>
- Goutman, J. D., & Calvo, D. J. (2004). Studies on the mechanisms of action of picrotoxin, quercetin and pregnanolone at the GABA p1 receptor. *British Journal of Pharmacology*, 141(4), 717–727. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705657>
- Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N, & Nave KA. (1998). Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science*, 280(5369). <https://doi.org/10.1126/science.280.5369.1610>

- Guo, Q., Scheller, A., & Huang, W. (2021). Progenies of NG2 glia: what do we learn from transgenic mouse models? *Neural Regeneration Research*, *16*(1), 43–48. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.286950>
- Habermacher, C., Angulo, M. C., & Benamer, N. (2019). Glutamate versus GABA in neuron–oligodendroglia communication. *GLIA*, *67*(11), 2092–2106. <https://doi.org/10.1002/glia.23618>
- Hamilton, N. B., Clarke, L. E., Arancibia-Carcamo, I. L., Kougioumtzidou, E., Matthey, M., Káradóttir, R., Whiteley, L., Bergersen, L. H., Richardson, W. D., & Attwell, D. (2017). Endogenous GABA controls oligodendrocyte lineage cell number, myelination, and CNS internode length. *Glia*, *65*(2), 309–321. <https://doi.org/10.1002/glia.23093>
- Hartiadi, L. Y., Ahring, P. K., Chebib, M., & Absalom, N. L. (2016). High and low GABA sensitivity  $\alpha 4\beta 2\delta$  GABA<sub>A</sub> receptors are expressed in *Xenopus laevis* oocytes with divergent stoichiometries. *Biochemical Pharmacology*, *103*, 98–108. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.12.021>
- Harvey, K., Duguid, I. C., Alldred, M. J., Beatty, S. E., Ward, H., Keep, N. H., Lingenfelter, S. E., Pearce, B. R., Lundgren, J., Owen, M. J., Smart, T. G., Lüscher, B., Rees, M. I., & Harvey, R. J. (2004). The GDP-GTP exchange factor collybistin: An essential determinant of neuronal gephyrin clustering. *Journal of Neuroscience*, *24*(25), 5816–5826. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1184-04.2004>
- Héja, L., Nyitrai, G., Kékesi, O., Dobolyi, Á., Szabó, P., Fiáth, R., Ulbert, I., Pál-Szente, B., Palkovits, M., & Kardos, J. (2012). Astrocytes convert network excitation to tonic inhibition of neurons. *BMC Biology*, *10*. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-26>
- Hevers, W., & Lüddens, H. (1998). The diversity of GABA<sub>A</sub> receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABA<sub>A</sub> channel subtypes. *Molecular Neurobiology*, *18*(1), 35–86. <https://doi.org/10.1007/BF02741459>
- Hille, B. (2001): Ion Channels of Excitable Membranes. University of Washington. New York. 814 pp.

- Hoppe, D., & Kettenmann, H. (1989). GABA triggers a Cl<sup>-</sup> efflux from cultured mouse oligodendrocytes. *Neuroscience Letters*, *97*, 334–339.
- Hosie, A. M., Dunne, E. L., Harvey, R. J., & Smart, T. G. (2003). Zinc-mediated inhibition of GABA<sub>A</sub> receptors: discrete binding sites underlie subtype specificity. *Nature Neuroscience*, *6*(4), 362–369. <https://doi.org/10.1038/nn1030>
- Huang, W., Guo, Q., Bai, X., Scheller, A., & Kirchhoff, F. (2019). Early embryonic NG2 glia are exclusively gliogenic and do not generate neurons in the brain. *GLIA*, *67*(6), 1094–1103. <https://doi.org/10.1002/glia.23590>
- Hughes, E. G., Kang, S. H., Fukaya, M., & Bergles, D. E. (2013). Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain. *Nature Neuroscience*, *16*(6), 668–676. <https://doi.org/10.1038/nn.3390>
- Ishibashi, T., Dakin, K. A., Stevens, B., Lee, P. R., Douglas Fields, R., Kozlov, S. v, & Stewart, C. L. (2006). Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. *Neuron*, *49*(6), 823–832.
- Jabs, R., Pivneva, T., Hüttmann, K., Wyczynski, A., Nolte, C., Kettenmann, H., & Steinhäuser, C. (2005). Synaptic transmission onto hippocampal glial cells with hGFAP promoter activity. *Journal of Cell Science*, *118*(16), 3791–3803. <https://doi.org/10.1242/jcs.02515>
- Jacob, T. C., Moss, S. J., & Jurd, R. (2008). GABA<sub>A</sub> receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nature Reviews Neuroscience*, *9*(5), 331–343. <https://doi.org/10.1038/nrn2370>
- Jäkel, S., & Dimou, L. (2017). Glial cells and their function in the adult brain: a journey through the history of their ablation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *11*(24), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00024>

- James Willmore, L., Abelson, M. B., Ben-Menachem, E., Pellock, J. M., & Donald Shields, W. (2009). Vigabatrin: 2008 Update. En *Epilepsia* (Vol. 50, Issue 2, pp. 163–173). <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2008.01988.x>
- Jin, J. Y., Chen, W. Y., Zhou, C. X., Chen, Z. H., Yu-Ying, Y., Ni, Y., Chan, H. C., & Shi, Q. X. (2009). Activation of GABA<sub>A</sub> receptor/Cl<sup>-</sup> channel and capacitation in rat spermatozoa: HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and Cl<sup>-</sup> are essential. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 55(2–3), 97–108. <https://doi.org/10.1080/19396360802626648>
- Kalakh, S., & Mouihate, A. (2019). Enhanced remyelination during late pregnancy: involvement of the GABAergic system. *Scientific Reports*, 9(7728), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44050-4>
- Kalanjati, V. P., Wixey, J. A., Miller, S. M., Colditz, P. B., & Bjorkman, S. T. (2017). GABA<sub>A</sub> receptor expression and white matter disruption in intrauterine growth restricted piglets. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 59, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.02.004>
- Kamen, Y., & Káradóttir, R. T. (2021). Combining whole-cell patch clamp and dye loading in acute brain slices with bulk RNA sequencing in embryonic to aged mice. *STAR Protocols*, 2(2). <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100439>
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, T. M., Siegelbaum, S. A., & Hudspeth, A. J. (2013). *Principles of Neural Science* (5th ed.). The McGraw-Hill Companies, Inc.
- Kang, S. H., Fukaya, M., Yang, J. K., Rothstein, J. D., & Bergles, D. E. (2010). NG2<sup>+</sup> CNS glial progenitors remain committed to the oligodendrocyte lineage in postnatal life and following neurodegeneration. *Neuron*, 68(4), 668–681. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.09.009>
- Káradóttir, R., Hamilton, N. B., Bakiri, Y., & Attwell, D. (2008). Spiking and non-spiking classes of oligodendrocyte precursor glia in CNS white matter. *Nature Neuroscience*, 11(4), 450–456. <https://doi.org/10.1038/nn2060>

- Karim, N., Wellendorph, P., Absalom, N., Johnston, G. A. R., Hanrahan, J. R., & Chebib, M. (2013). Potency of GABA at human recombinant GABA<sub>A</sub> receptors expressed in *Xenopus* oocytes: a mini review. *Amino Acids*, *44*(4), 1139–1149. <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1456-y>
- Kaufman, D. L., Houser, C. R., & Tobin, A. J. (1991). Two forms of the  $\gamma$ -aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. *Journal of Neurochemistry*, *56*(2), 720–723. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1991.tb08211.x>
- Kessarlis, N., Fogarty, M., Iannarelli, P., Grist, M., Wegner, M., & Richardson, W. D. (2006). Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nature Neuroscience*, *9*(2), 173–179. <https://doi.org/10.1038/nn1620>
- Kim, J. J., & Hibbs, R. E. (2021). Direct structural insights into GABA<sub>A</sub> receptor pharmacology. *Trends in Biochemical Sciences*, *46*(6), 502–517. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.01.011>
- Kirchhoff, F., & Kettenmann, H. (1992). GABA Triggers a  $[Ca^{2+}]_i$  Increase in murine precursor cells of the oligodendrocyte lineage. *European Neuroscience Association* (Vol. 4).
- Kittler, J. T., Delmas, P., Jovanovic, J. N., Brown, D. A., Smart, T. G., & Moss, S. J. (2000). Constitutive endocytosis of GABA<sub>A</sub> receptors by an association with the adaptin AP2 complex modulates inhibitory synaptic currents in hippocampal neurons. *The Journal of Neuroscience*, *20*(21), 7972–7977.
- Klausberger, T., David, J., Roberts, B., & Somogyi, P. (2002). Cell type- and input-specific differences in the number and subtypes of synaptic GABA<sub>A</sub> receptors in the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, *22*(7), 2513–2521. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.22-07-02513.2002>
- Knoflach, F., Rhyner, T., Villa, M., Kellenberger, S., Drescher, U., Malherbe, P., Sigel, E., & Möhler, H. (1991). The  $\gamma 3$ -subunit of the GABA<sub>A</sub>-receptor confers sensitivity to

benzodiazepine receptor ligands. *FEBS Letters*, 293(1–2), 191–194.  
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)81184-A](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)81184-A)

Krall, J., Balle, T., Krogsgaard-Larsen, N., Sørensen, T. E., Krogsgaard-Larsen, P., Kristiansen, U., & Frølund, B. (2014). GABA<sub>A</sub> receptor partial agonists and antagonists: Structure, Binding Mode, and Pharmacology. En *Advances in Pharmacology*, 201–227. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2014.10.003>

Krämer-Albers, E. M., Bretz, N., Tenzer, S., Winterstein, C., Möbius, W., Berger, H., Nave, K. A., Schild, H., & Trotter J. (2007). Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons?. *Proteomics - Clinical Applications*, 1(11), 1446-1461.  
<https://doi.org/10.1002/prca.200700522>

Krasnow, A. M., Ford, M. C., Valdivia, L. E., Wilson, S. W., & Attwell, D. (2018). Regulation of developing myelin sheath elongation by oligodendrocyte calcium transients *in vivo*. *Nature Neuroscience*, 21(1), 24–30.  
<https://doi.org/10.1038/s41593-017-0031-y>

Kukley, M., Kiladze, M., Tognatta, R., Hans, M., Swandulla, D., Schramm, J., & Dietrich, D. (2007). Glial cells are born with synapses. *The FASEB Journal*, 22(8), 2957–2969. <https://doi.org/10.1096/fj.07-090985>

Kukley, M., Nishiyama, A., & Dietrich, D. (2010). The fate of synaptic input to NG2 glial cells: Neurons specifically downregulate transmitter release onto differentiating oligodendroglial cells. *Journal of Neuroscience*.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0854-10.2010>

Lambert, J. J., Cooper, M. A., Simmons, R. D. J., Weir, C. J., & Belelli, D. (2009). Neurosteroids: Endogenous allosteric modulators of GABA<sub>A</sub> receptors. *Psychoneuroendocrinology*, 34(1). <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.08.009>

Lappe-Siefke, C., Goebbels, S., Gravel, M., Nicksch, E., Lee, J., Braun, P. E., Griffiths, I. R., & Nave, K. A. (2003). Disruption of Cnp1 uncouples oligodendroglial functions in axonal support and myelination. *Nature Genetics*, 33(3), 366–374.  
<https://doi.org/10.1038/ng1095>

- Larm, J. A., Cheung, N. S., & Beart, P. M. (1996). (S)-5-fluorowillardiine-mediated neurotoxicity in cultured murine cortical neurones occurs via AMPA and kainate receptors. *European Journal of Pharmacology*, 314(1–2), 249–254. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(96\)00633-4](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(96)00633-4)
- Larson, V. A., Zhang, Y., & Bergles, D. E. (2016). Electrophysiological properties of NG2<sup>+</sup> cells: Matching physiological studies with gene expression profiles. *Brain Research*, 1638, 138–160. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.09.010>
- Laurie, D. J., Seeburg, P. H., & Wisden, W. (1992a). The distribution of 13 GABA<sub>A</sub> receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum. *The Journal of Neuroscience*, 72(3).
- Laurie, D. J., Wisden, W., & Seeburg, P. H. (1992b). The distribution of thirteen GABA<sub>A</sub> receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *The Journal of Neuroscience*, 12(11).
- Lee, P. R., & Fields, R. D. (2009). Regulation of myelin genes implicated in psychiatric disorders by functional activity in axons. *Frontiers in Neuroanatomy*, 3. <https://doi.org/10.3389/neuro.05.004.2009>
- Lee, S., Leach, M. K., Redmond, S. A., Chong, S. Y. C., Mellon, S. H., Tuck, S. J., Feng, Z. Q., Corey, J. M., & Chan, J. R. (2012). A culture system to study oligodendrocyte myelination processes using engineered nanofibers. *Nature Methods*, 9(9), 917–922. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2105>
- Lees, P., Cunningham, F. M., & Elliott, J. (2004). Principles of pharmacodynamics and their applications in veterinary pharmacology. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 27(6), 397–414. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00620.x>
- Levitan, E. S., Schofield, P. R., Burt, D. R., Rhee, L. M., Wisden, W., Kohler, M., Fujita, N., Rodriguez, H. F., Stephenson, A., Darlison, M. G., & Barnard, E. A. (1988).

- Structural and functional basis for GABA<sub>A</sub> receptor heterogeneity. *Nature*, 335, 76–79. <https://doi.org/10.1038/335076a0>
- Li, C., Xiao, L., Liu, X., Yang, W., Shen, W., Hu, C., Yang, G., & He, C. (2013). A functional role of NMDA receptor in regulating the differentiation of oligodendrocyte precursor cells and remyelination. *GLIA*, 61(5), 732–749. <https://doi.org/10.1002/glia.22469>
- Li, S., Zhang, Y., Liu, H., Yan, Y., & Li, Y. (2008). Identification and expression of GABA<sub>C</sub> receptor in rat testis and spermatozoa. *Acta Biochim Biophys Sin*, 40, 761. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2008>
- Lin, C. C., Lee, I. T., Hsu, C. H., Hsu, C. K., Chi, P. L., Hsiao, L. der, & Yang, C. M. (2015). Sphingosine-1-phosphate mediates ICAM-1-dependent monocyte adhesion through p38 MAPK and p42/p44 MAPK-dependent akt activation. *PLoS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118473>
- Lin, S. C., & Bergles, D. E. (2004a). Synaptic signaling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature Neuroscience*, 7(1), 24–32. <https://doi.org/10.1038/nn1162>
- Lin, S. C., & Bergles, D. E. (2004b). Synaptic signaling between neurons and glia. *GLIA*, 47(3), 290–298. <https://doi.org/10.1002/glia.20060>
- Lin, S. C., Huck, J. H. J., Roberts, J. D. B., Macklin, W. B., Somogyi, P., & Bergles, D. E. (2005). Climbing fiber innervation of NG2-expressing glia in the mammalian cerebellum. *Neuron*, 46(5), 773–785. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.025>
- Luyt, K., Slade, T. P., Dorward, J. J., Durant, C. F., Wu, Y., Shigemoto, R., Mundell, S. J., Váradi, A., & Molnár, E. (2007). Developing oligodendrocytes express functional GABAB receptors that stimulate cell proliferation and migration. *Journal of Neurochemistry*, 100(3), 822–840. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04255.x>

- Maas, D. A., & Angulo, M. C. (2021). Can enhancing neuronal activity improve myelin repair in multiple sclerosis? *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15(645240). <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.645240>
- Maldonado, P. P., Vélez-Fort, M., & Angulo, M. C. (2011). Is neuronal communication with NG2 cells synaptic or extrasynaptic?. *Journal of Anatomy*, 219(1), 8–17. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2011.01350.x>
- Malherbe, P., Sigel, E., Baur, R., Persohn, E., Richards, J. G., & Möhler, H. (1990). Functional expression and sites of gene transcription of a novel  $\alpha$  subunit of the GABA<sub>A</sub> receptor in rat brain. *FEBS Letters*, 260(2), 261–265. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80118-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80118-3)
- Maric, H. M., Mukherjee, J., Tretter, V., Moss, S. J., & Schindelin, H. (2011). Gephyrin-mediated  $\gamma$ -aminobutyric acid type A and glycine receptor clustering relies on a common binding site. *Journal of Biological Chemistry*, 286(49), 42105–42114. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.303412>
- Marisca, R., Hoche, T., Agirre, E., Jane Hoodless, L., Barkey, W., Auer, F., Castelo-Branco, A., & Czopka, T. (2020). Functionally distinct subgroups of oligodendrocyte precursor cells integrate neural activity and execute myelin formation. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0581-2>
- Maroto, R., & Hamill, O. P. (2001). Brefeldin a block of integrin-dependent mechanosensitive ATP release from *Xenopus* oocytes reveals a novel mechanism of mechanotransduction. *Journal of Biological Chemistry*, 276(26), 23867–23872. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101500200>
- Marques, S., Zeisel, A., Codeluppi, S., van Bruggen, D., Mendanha Falcao, A., Xiao, L., Li, H., Haring, M., Hochgerner, H., Romanov, R. A., Gyllborg, D., Munoz-Manchado, A. B., la Manno, G., Lonnerberg, P., Floriddia, E. M., Rezayee, F., Ernfors, P., Arenas, E., Hjerling-Leffler, J., & Castelo-Branco, G. (2016). Oligodendrocyte heterogeneity in the mouse juvenile and adult central nervous system. *Science*, 352(6291), 1326–1329. <https://doi.org/10.1126/science.aaf6463>

- Martel-Gallegos, G., Sánchez-Gómez, M. V., Garay, E., Matute, C., Arellano, R. O. (2020): Cultivo primario de oligodendrocitos mielinizantes aislados del nervio óptico de rata. En: Espinoza-Rojo, M., López-Valdés, H. E., Aguilera, P. (eds.), pp 224-240. Universidad Autónoma de Guerrero. Guerrero, México.
- Martenson, J. S., Yamasaki, T., Chaudhury, N. H., Albrecht, D., & Tomita, S. (2017). Assembly rules for GABA<sub>A</sub> receptor complexes in the brain. *eLife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.27443.001>
- Martínez-Torres, A. (2000). Estudios funcionales y moleculares de receptores GABA<sub>C</sub>. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Martínez-Torres, A., & Miledi, R. (2001). Expression of  $\gamma$ -aminobutyric acid  $\rho 1$  and  $\rho 1D450$  as gene fusions with the green fluorescent protein. *PNAS*, 98(4), 1947–1951. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.031584898](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.031584898)
- McKenzie, I. A., Ohayon, D., Li, H., de Faria, J. P., Emery, B., Tohyama, K., & Richardson, W. D. (2014). Motor skill learning requires active central myelination. *Science*, 346(6207), 318–322. <https://doi.org/10.1126/science.1254960>
- Medina, J. H., Levi De Stein, M., de Robertis, E., & Medina, J. H. (1989). n-[3H]butyl-p-carboline-3-carboxylate, a putative endogenous ligand, binds preferentially to subtype 1 of central benzodiazepine receptors. *Journal of Neurochemistry*, 52(3), 665–670.
- Melfi, S., Montt Guevara, M. M., Bonalume, V., Ruscica, M., Colciago, A., Simoncini, T., & Magnaghi, V. (2017). Src and phospho-FAK kinases are activated by allopregnanolone promoting Schwann cell motility, morphology and myelination. *Journal of Neurochemistry*, 141(2). <https://doi.org/10.1111/jnc.13795>
- Middendorp, S. J., Maldifassi, M. C., Baur, R., & Sigel, E. (2015). Positive modulation of synaptic and extrasynaptic GABA<sub>A</sub> receptors by an antagonist of the high affinity benzodiazepine binding site. *Neuropharmacology*, 95, 459–467. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.04.027>

- Miledi, R. (1982). A calcium-dependent transient outward current in *Xenopus laevis* oocytes. *Proceedings of the Royal Society of London - Biological Sciences*, 215(1201), 491–497. <https://doi.org/10.1098/rspb.1982.0056>
- Miller, P. S., & Aricescu, A. R. (2014). Crystal structure of a human GABA<sub>A</sub> receptor. *Nature*, 512(7514), 270–275. <https://doi.org/10.1038/nature13293>
- Miller, R. H. (2002). Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS. *Progress in Neurobiology*, 67.
- Möbius, W., Cooper, B., Kaufmann, W. A., Imig, C., Ruhwedel, T., Snaidero, N., Saab, A. S., & Varoqueaux, F. (2010). Electron microscopy of the mouse central nervous system. *Methods in Cell Biology*, 96(C). [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(10\)96020-2](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(10)96020-2)
- Monod, J., Wyman, J., & Changeux, J. P. (1965). On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *Journal of Molecular Biology*, 12(1), 88–118. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80285-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80285-6)
- Moore, J. W. (2007). Voltage clamp. *Scholarpedia*, 2(9)(3060).
- Mount, C. W., Yalçın, B., Cunliffe-Koehler, K., Sundaresh, S., & Monje, M. (2019). Monosynaptic tracing maps brain-wide afferent oligodendrocyte precursor cell connectivity. *eLife*, 8. <https://doi.org/10.7554/eLife.49291>
- Moura, D. M. S., Brennan, E. J., Brock, R., & Cocas, L. A. (2022). Neuron to oligodendrocyte precursor cell Synapses: Protagonists in oligodendrocyte development and myelination, and targets for therapeutics. *Frontiers in Neuroscience*, 15(779125). <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.779125>
- Mugabe, B. E., Yaghini, F. A., Song, C. Y., Buharalioglu, C. K., Waters, C. M., & Malik, K. U. (2010). Angiotensin II-induced migration of vascular smooth muscle cells is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase-activated c-Src through spleen tyrosine kinase and epidermal growth factor receptor transactivation. *Journal of*

*Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 332(1), 116–124.  
<https://doi.org/10.1124/jpet.109.157552>

Müller, J., Reyes-Haro, D., Pivneva, T., Nolte, C., Schaette, R., Lübke, J., & Kettenmann, H. (2009). The principal neurons of the medial nucleus of the trapezoid body and NG2<sup>+</sup> glial cells receive coordinated excitatory synaptic input. *Journal of General Physiology*, 134(2), 115–127.  
<https://doi.org/10.1085/jgp.200910194>

Nakamura, F., & Strittmatter, S. M. (1996). P2Y<sub>1</sub> purinergic receptors in sensory neurons: Contribution to touch-induced impulse generation (somatic sensation/mechanosensitivity/ATP receptors/mechanoelectric transduction/dorsal root ganglion neurons). *Neurobiology*, 93, 10465-10470.

Nave, K.-A., & Trapp, B. D. (2008). Axon-glia signaling and the glial support of axon function. *Annual Review of Neuroscience*, 31(1), 535–561.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094309>

Neher, E., & Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260(5554), 799–802.  
<https://doi.org/10.1038/260799a0>

Newbern, J., & Birchmeier, C. (2010). Nrg1/ErbB signaling networks in Schwann cell development and myelination. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 21(9), 922–928. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2010.08.008>

Nishiyama, A., Komitova, M., Suzuki, R., & Zhu, X. (2009). Polydendrocytes (NG2 cells): Multifunctional cells with lineage plasticity. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(1), 9–22. <https://doi.org/10.1038/nrn2495>

Olsen, R. W., & Sieghart, W. (2008). International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acid<sub>A</sub> receptors: Classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacological Reviews*, 50(2), 291–313.  
<https://doi.org/10.1124/pr.108.00505.receptors>

- Ordaz, R. P. (2017). Expresión heteróloga funcional de subunidades GABA<sub>A</sub> clonadas de oligodendrocitos del nervio óptico de rata (*Rattus norvegicus*). *Tesis de Maestría*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ordaz, R. P., Garay, E., Limon, A., Pérez-Samartín, A., Sánchez-Gómez, M. V., Robles-Martínez, L., Cisneros-Mejorado, A., Matute, C., & Arellano, R. O. (2021). GABA<sub>A</sub> receptors expressed in oligodendrocytes cultured from the neonatal rat contain  $\alpha 3$  and  $\gamma 1$  subunits and present differential functional and pharmacological properties. *Molecular Pharmacology*, *99*(2), 133–146. <https://doi.org/10.1124/MOLPHARM.120.000091>
- Orduz, D., Maldonado, P. P., Balia, M., Elez-Fort, M., de Sars, V., Yanagawa, Y., Emiliani, V., & Angulo, M. C. (2015). Interneurons and oligodendrocyte progenitors form a structured synaptic network in the developing neocortex. *eLife*, *4*(e06953), 1–20. <https://doi.org/10.7554/eLife.06953.001>
- Ortiz, F. C., Habermacher, C., Graciarena, M., Houry, P. Y., Nishiyama, A., Oumesmar, B. N., & Angulo, M. C. (2019). Neuronal activity *in vivo* enhances functional myelin repair. *JCI Insight*, *4*(9). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.123434>
- Paez, P. M., & Lyons, D. A. (2020). Calcium signaling in the oligodendrocyte lineage: Regulators and consequences. *Annual Review of Neuroscience*, *43*. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-100719>
- Palhol, J. S. C., Balia, M., Sánchez-Román, F., Labarchède, M., Gontier, E., & Battfeld, A. (2022). A population of gray matter oligodendrocytes directly associates with the vasculature. *BioRxiv*, 1–10. <https://doi.org/10.1101/2022.04.11.487873>
- Papadopoulos, T., Eulenburg, V., Reddy-Alla, S., Mansuy, I. M., Li, Y., & Betz, H. (2008). Collybistin is required for both the formation and maintenance of GABAergic postsynapses in the hippocampus. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *39*(2), 161–169. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2008.06.006>
- Passlick, S., Grauer, M., Schafer, C., Jabs, R., Seifert, G., & Steinhauser, C. (2013). Expression of the  $\gamma 2$ -subunit distinguishes synaptic and extrasynaptic GABA<sub>A</sub>

- receptors in NG2 cells of the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 33(29), 12030–12040. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5562-12.2013>
- Peña, C., Medina, J. H., Novas, M. L., Paladini, A. C., & de Robertis, E. (1986). Isolation and identification in bovine cerebral cortex of n-butyl  $\beta$ -carboline-3-carboxylate, a potent benzodiazepine binding inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(13), 4952–4956. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.13.4952>
- Pérez-Samartín, A., Garay, E., Moctezuma, J. P. H., Cisneros-Mejorado, A., Sánchez-Gómez, M. V., Martel-Gallegos, G., Robles-Martínez, L., Canedo-Antelo, M., Matute, C., & Arellano, R. O. (2017). Inwardly rectifying K<sup>+</sup> currents in cultured oligodendrocytes from rat optic nerve are insensitive to pH. *Neurochemical Research*, 42, 2443–2455. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2242-8>
- Petroski, R. E., Pomeroy, J. E., Das, R., Bowman, H., Yang, W., Chen, A. P., & Foster, A. C. (2006). Indiplon is a high-affinity positive allosteric modulator with selectivity for  $\alpha 1$  subunit-containing GABA<sub>A</sub> receptors. 317(1), 369–377. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.096701>
- Philips, T., & Rothstein, J. D. (2017). Oligodendroglia: Metabolic supporters of neurons. *Journal of Clinical Investigation*, 127(9), 3271–3280. <https://doi.org/10.1172/JCI90610>
- Pirker, S., Schwarzer, C., Wieselthaler, A., Sieghart, W., & Sperk, G. (2000). GABA<sub>A</sub> receptors: Immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult rat brain. *Neuroscience*, 101(4), 815–850.
- Pitman, K. A., & Young, K. M. (2016). Activity-dependent calcium signalling in oligodendrocyte generation. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 77, 30–34). <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.05.018>
- Pörtl, A., Hauer, B., Fuchs, K., Tretter, V., & Sieghart, W. (2003). Subunit composition and quantitative importance of GABA<sub>A</sub> receptor subtypes in the cerebellum of mouse and rat. *Journal of Neurochemistry*, 87(6), 1444–1455. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02135.x>

- Quintela-López, T., Ortiz-Sanz, C., Serrano-Regal, M. P., Gaminde-Blasco, A., Valero, J., Baleriola, J., Sánchez-Gómez, M. V., Matute, C., & Alberdi, E. (2019). A $\beta$  oligomers promote oligodendrocyte differentiation and maturation via integrin  $\beta$ 1 and Fyn kinase signaling. *Cell Death and Disease*, 10(6).  
<https://doi.org/10.1038/s41419-019-1636-8>
- Raff, M. C., Miller, R. H., & Noble, M. (1983). A glial progenitor cell that develops *in vitro* into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. *Nature*, 303, 1–7.  
<http://www.nature.com/nature/journal/v303/n5916/pdf/303390a0.pdf%5Cnpapers2:/publication/uuid/921DEA33-1577-409F-B703-F8000C1C0AEA>
- Ramerstorfer, J., Furtmüller, R., Sarto-Jackson, I., Varagic, Z., Sieghart, W., & Ernst, M. (2011). The GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$ + $\beta$ - interface: A novel target for subtype selective drugs. *Journal of Neuroscience*, 31(3), 870–877.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5012-10.2011>
- Raveh, A., Turecek, R., & Bettler, B. (2015). Mechanisms of fast desensitization of GABA<sub>B</sub> receptor-gated currents. *Advances in Pharmacology*, 73.  
<https://doi.org/10.1016/bs.apha.2014.11.004>
- Reyes-Haro, D., Cisneros-Mejorado, A., & Arellano, R. O. (2021). Therapeutic potential of GABAergic signaling in myelin plasticity and repair. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.662191>
- Rigo, J. -M, Belachew, S., Lefebvre, P. P., Leprince, P., Malgrange, B., Rogister, B., Kettenmann, H., & Moonen, G. (1994). Astroglia-released factor shows similar effects as benzodiazepine inverse agonists. *Journal of Neuroscience Research*, 39(4), 364–376. <https://doi.org/10.1002/jnr.490390403>
- Rigo, J.-M., Belachew, S., Coucke, P., Leprince, P., Malgrange, B., Rogister, B., & Moonen, G. (1996). Astroglia-released factor with negative allosteric modulatory properties at the GABA<sub>A</sub> receptor: Evidence from binding studies. *Biochemical Pharmacology*, 52, 465-473.

- Rinholm, J. E., Vervaeke, K., Tadross, M. R., Tkachuk, A. N., Kopek, B. G., Brown, T. A., Bergersen, L. H., & Clayton, D. A. (2016). Movement and structure of mitochondria in oligodendrocytes and their myelin sheaths. *GLIA*, *64*(5), 810–825. <https://doi.org/10.1002/glia.22965>
- Roberts, E., & Frankel, S. (1950). Gamma-aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, *187*(1), 55–63. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)50929-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)50929-2)
- Rowley, N. M., Madsen, K. K., Schousboe, A., & Steve White, H. (2012). Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. *Neurochemistry International*, *61*(4), 546–558. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.02.013>
- Rushton, W. A. H. (1951). A theory of the effects of fibre size in medullated nerve. *Journal of Physiology*, *115*, 101-122.
- Saab, A. S., Tzvetavona, I. D., Trevisiol, A., Baltan, S., Dibaj, P., Kusch, K., Möbius, W., Goetze, B., Jahn, H. M., Huang, W., Steffens, H., Schomburg, E. D., Pérez-Samartín, A., Pérez-Cerdá, F., Bakhtiari, D., Matute, C., Löwel, S., Griesinger, C., Hirrlinger, J., & Nave, K. A. (2016). Oligodendroglial NMDA receptors regulate glucose import and axonal energy metabolism. *Neuron*, *91*(1), 119–132. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.05.016>
- Saiepour, L., Fuchs, C., Patrizi, A., Sassoè-Pognetto, M., Harvey, R. J., & Harvey, K. (2010). Complex role of collybistin and gephyrin in GABA<sub>A</sub> receptor clustering. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(38), 29623–29631. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.121368>
- Saldaña, C., Garay, E., Rangel, G. E., Reyes, L. M., & Arellano, R. O. (2009a). Native ion current coupled to purinergic activation via basal and mechanically induced ATP release in *Xenopus* follicles. *Journal of Cellular Physiology*, *218*(2), 355–365. <https://doi.org/10.1002/jcp.21611>
- Saldaña, C., Vázquez-Cuevas, F., Garay, E., & Arellano, R. O. (2005). Epithelium and/or theca are required for ATP-elicited K<sup>+</sup> current in follicle-enclosed *Xenopus*

oocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 202(3), 814–821.  
<https://doi.org/10.1002/jcp.20184>

Saliba, R. S., Michels, G., Jacob, T. C., Pangalos, M. N., & Moss, S. J. (2007). Activity-dependent ubiquitination of GABA<sub>A</sub> receptors regulates their accumulation at synaptic sites. *Journal of Neuroscience*, 27(48), 13341–13351.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3277-07.2007>

Sampaio-Baptista, C., Khrapitchev, A. A., Foxley, S., Schlagheck, T., Scholz, J., Jbabdi, S., Deluca, G. C., Miller, K. L., Taylor, A., Thomas, N., Kleim, J., Sibson, N. R., Bannerman, D., & Johansen-Berg, H. (2013). Motor skill learning induces changes in white matter microstructure and myelination. *The Journal of Neuroscience*, 33(50), 19499–19503. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3048-13.2013>

Sánchez-Gómez, M. V., Serrano, M. P., Alberdi, E., Pérez-Cerdá, F., & Matute, C. (2018). Isolation, expansion, and maturation of oligodendrocyte lineage cells obtained from rat neonatal brain and optic nerve. *Methods in Molecular Biology*, 1791, 95–113. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7862-5\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7862-5_8)

Santiago-González, D. A. S., Cheli, V. T., Zamora, N. N., Lama, T. N., Spreuer, V., Murphy, G. G., & Paez, P. M. (2017). Conditional deletion of the L-type calcium channel Cav1.2 in NG2-positive cells impairs remyelination in mice. *Journal of Neuroscience*, 37(42), 10038–10051. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1787-17.2017>

Sarto-Jackson, I., & Sieghart, W. (2008). Assembly of GABA<sub>A</sub> receptors (Review). *Molecular Membrane Biology*, 25(4), 302–310.  
<https://doi.org/10.1080/09687680801914516>

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

Schweizer, C., Balsiger, S., Bluethmann, H., Mansuy, I. M., Fritschy, J. M., Mohler, H., & Lüscher, B. (2003). The  $\gamma 2$  subunit of GABA<sub>A</sub> receptors is required for

maintenance of receptors at mature synapses. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24(2), 442–450. [https://doi.org/10.1016/S1044-7431\(03\)00202-1](https://doi.org/10.1016/S1044-7431(03)00202-1)

Seeburg, P. H., Wisden, W., Verdoorn, T. A., Pritchett, D. B., Werner, P., Herb, A., Luddens, H., Sprengel, R., & Sakmann, B. (1990). The GABA<sub>A</sub> receptor family: Molecular and functional diversity. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 55, 29–40. <https://doi.org/10.1101/SQB.1990.055.01.006>

Seidl, A. H., Rubel, E. W., & Barría, A. (2014). Differential conduction velocity regulation in ipsilateral and contralateral collaterals innervating brainstem coincidence detector neurons. *Journal of Neuroscience*, 34(14), 4914–4919. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5460-13.2014>

Seidl, A. H., Rubel, E. W., & Harris, D. M. (2010). Mechanisms for adjusting interaural time differences to achieve binaural coincidence detection. *Journal of Neuroscience*, 30(1), 70–80. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3464-09.2010>

Seiler, N., Al-Therib, M. J., & Kataoka, K. (1973). Formation of GABA from putrescine in the brain of fish (*Salmo irideus* Gibb.). *Journal of Neurochemistry*, 20, 699–708.

Seiler, N., Schmidt-Glenewinkel, T., & Sarhan, S. (1979). On the formation of  $\gamma$ -aminobutyric acid from putrescine in brain. *Journal of Biochemistry*, 86(1).

Serrano-Regal, M., Bayón-Cordero, L., Ordaz, R. P., Garay, E., Limon, A., Arellano, R. O., Matute, C., & Sánchez-Gómez, M. V. (2020a). Expression and function of GABA receptors in myelinating cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00256>

Serrano-Regal, M., Luengas-Escuza, I., Bayón-Cordero, L., Ibarra-Aizpurua, N., Alberdi, E., Pérez-Samartín, A., Matute, C., & Sánchez-Gómez, M. v. (2020b). Oligodendrocyte differentiation and myelination is potentiated via GABA<sub>B</sub> receptor activation. *Neuroscience*, 439, 163–180. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.07.014>

- Shaw, J. C., Berry, M. J., Dyson, R. M., Crombie, G. K., Hirst, J. J., & Palliser, H. K. (2019). Reduced neurosteroid exposure following preterm birth and its' contribution to neurological impairment: A novel avenue for preventative therapies. *Frontiers in Physiology*, 10(599), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00599>
- Shaw, J. C., Dyson, R. M., Palliser, H. K., Gray, C., Berry, M. J., & Hirst, J. J. (2018a). Neurosteroid replacement therapy using the allopregnanolone-analogue ganaxolone following preterm birth in male Guinea pigs. *Pediatric Research*, 85, 86–96. <https://doi.org/10.1038/s41390-018-0185-7>
- Shaw, J. C., Palliser, H. K., Dyson, R. M., Berry, M. J., & Hirst, J. J. (2018b). Disruptions to the cerebellar GABAergic system in juvenile guinea pigs following preterm birth. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 65, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.10.002>
- Shaw, J. C., Palliser, H. K., Dyson, R. M., Hirst, J. J., & Berry, M. J. (2016). Long-term effects of preterm birth on behavior and neurosteroid sensitivity in the Guinea pig. *Pediatric Research*, 80(2), 275–283. <https://doi.org/10.1038/pr.2016.63>
- Shaw, J. C., Palliser, H. K., Walker, D. W., & Hirst, J. J. (2015). Preterm birth affects GABA<sub>A</sub> receptor subunit mRNA levels during the foetal-to-neonatal transition in Guinea pigs. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 6(3), 250–260. <https://doi.org/10.1017/S2040174415000069>
- Shen, H. Y., Huang, N., Reemmer, J., & Xiao, L. (2018). Adenosine actions on oligodendroglia and myelination in autism spectrum disorder. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00482>
- Shi, Q.-X., Yuan, Y.-Y., & Roldan, E. R. S. (1997).  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) induces the acrosome reaction in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction*, 3(8).
- Sieghart, W. (2015). Allosteric modulation of GABA<sub>A</sub> receptors via multiple drug-binding sites. *Advances in Pharmacology*, 72, 53–96. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2014.10.002>

- Sieghart, W., Ramerstorfer, J., Sarto-Jackson, I., Varagic, Z., & Ernst, M. (2012). A novel GABA<sub>A</sub> receptor pharmacology: Drugs interacting with the  $\alpha + \beta$  - interface. *British Journal of Pharmacology*, 166(2), 476–485. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01779.x>
- Sieghart, W., & Savić, M. M. (2018). International union of basic and clinical pharmacology. CVI: GABA<sub>A</sub> receptor subtype-and function-selective ligands: Key issues in translation to humans. *Pharmacological Reviews*, 70(4), 836–878. <https://doi.org/10.1124/PR.117.014449>
- Sierra, A., de Castro, F., del Río-Hortega, J., Rafael Iglesias-Rozas, J., Garrosa, M., & Kettenmann, H. (2016). The “Big-Bang” for modern glial biology: Translation and comments on Pío del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia. *GLIA*, 64(11), 1801–1840. <https://doi.org/10.1002/glia.23046>
- Sigel, E., & Steinmann, M. E. (2012). Structure, function, and modulation of GABA<sub>A</sub> receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 287(48), 40224–40231. <https://doi.org/10.1074/jbc.R112.386664>
- Simons, M., & Lyons, D. A. (2013). Axonal selection and myelin sheath generation in the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology*, 25(4), 512–519. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2013.04.007>
- Simons, M., & Nave, K. A. (2016). Oligodendrocytes: Myelination and axonal support. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020479>
- Smith, G. B., & Olsen, R. W. (1995). Functional domains of GABA<sub>A</sub> receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 16(5), 162–168. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)89009-4](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)89009-4)
- Sommer, I., & Schachner, M. (1981). Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Developmental Biology*, 83.

- Spitzer, S. O., Sitnikov, S., Kamen, Y., Evans, K. A., Kronenberg-Versteeg, D., Dietmann, S., de Faria, O., Agathou, S., & Káradóttir, R. T. (2019). Oligodendrocyte progenitor cells become regionally diverse and heterogeneous with age. *Neuron*, *101*(3), 459-471.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.12.020>
- Stallcup, W. B. (2018). The NG2 proteoglycan in pericyte biology. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1109*, 5–19. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-02601-1\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-02601-1_2)
- Stevens, B., Porta, S., Haak, L. L., Gallo, V., & Fields, R. D. (2002). Adenosine: a neuron-glia transmitter promoting myelination in the CNS in response to action potentials. *Neuron*, *36*, 855–868. [www.neuron.org/cgi/content/full/36/5/855/DC1](http://www.neuron.org/cgi/content/full/36/5/855/DC1)
- Taliani, S., Cosimelli, B., da Settimo, F., Marini, A. M., la Motta, C., Simorini, F., Salerno, S., Novellino, E., Greco, G., Cosconati, S., Marinelli, L., Salvetti, F., L'Abbate, G., Trasciatti, S., Montali, M., Costa, B., & Martini, C. (2009). Identification of anxiolytic/nonsedative agents among indol-3-ylglyoxylamides acting as functionally selective agonists at the  $\gamma$ -aminobutyric acid-A (GABA<sub>A</sub>)  $\alpha 2$  benzodiazepine receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*, *52*(12), 3723–3734. <https://doi.org/10.1021/jm9001154>
- Tanaka, Y., Tozuka, Y., Takata, T., Shimazu, N., Matsumura, N., Ohta, A., & Hisatsune, T. (2009). Excitatory GABAergic activation of cortical dividing glial cells. *Oxford University Press*, *19*, 2181–2195. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhn238>
- Tomassy, G. S., Berger, D. R., Chen, H.-H., Kasthuri, N., Hayworth, K. J., Vercelli, A., Seung, H. S., Lichtman, J. W., & Arlotta, P. (2014). Distinct profiles of myelin distribution along single axons of pyramidal neurons in the neocortex. *Science*, *344*(6181), 319–324. <https://doi.org/10.1126/science.1249766>
- Toranzo, G. S., Zelarayn, L., Bonilla, F., Oterino, J., & Bühler, M. I. (2008). Involvement of GABA<sub>A</sub> receptor in *Bufo arenarum* oocyte maturation. *Zygote*, *16*(2), 135–144. <https://doi.org/10.1017/S0967199408004656>

- Toyama, B. H., Savas, J. N., Park, S. K., Harris, M. S., Ingolia, N. T., Yates, J. R., & Hetzer, M. W. (2013). Identification of long-lived proteins reveals exceptional stability of essential cellular structures. *Cell*, *154*(5). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.037>
- Tozuka, Y., Fukuda, S., Namba, T., Seki, T., & Hisatsune, T. (2005). GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells. *Neuron*, *47*(6), 803–815. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.08.023>
- Traiffort, E., Zakaria, M., Laouarem, Y., & Ferent, J. (2016). Hedgehog: A key signaling in the development of the oligodendrocyte lineage. *Journal of Developmental Biology*, *4*(3). <https://doi.org/10.3390/jdb4030028>
- Tretter, V., Jacob, T. C., Mukherjee, J., Fritschy, J. M., Pangalos, M. N., & Moss, S. J. (2008). The clustering of GABA<sub>A</sub> receptor subtypes at inhibitory synapses is facilitated via the direct binding of receptor  $\alpha 2$  subunits to gephyrin. *Journal of Neuroscience*, *28*(6), 1356–1365. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5050-07.2008>
- Tretter, V., Kerschner, B., Milenkovic, I., Ramsden, S. L., Ramerstorfer, J., Saiepour, L., Maric, H. M., Moss, S. J., Schindelin, H., Harvey, R. J., Sieghart, W., & Harvey, K. (2011). Molecular basis of the  $\gamma$ -aminobutyric acid  $\alpha 3$  subunit interaction with the clustering protein gephyrin. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(43), 37702–37711. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.291336>
- Tretter, V., Mukherjee, J., Maric, H. M., Schindelin, H., Sieghart, W., & Moss, S. J. (2012). Gephyrin, the enigmatic organizer at GABAergic synapses. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2012.00023>
- Ullén, F. (2009). Is activity regulation of late myelination a plastic mechanism in the human nervous system?. *Neuron Glia Biology*, *5*, 29–34. <https://doi.org/10.1017/S1740925X09990330>
- van Tilborg, E., de Theije, C. G. M., van Hal, M., Wagenaar, N., de Vries, L. S., Benders, M. J., Rowitch, D. H., & Nijboer, C. H. (2018). Origin and dynamics of

oligodendrocytes in the developing brain: Implications for perinatal white matter injury. *GLIA*, 66(2), 221–238. <https://doi.org/10.1002/glia.23256>

Varagic, Z., Wimmer, L., Schnürch, M., Mihovilovic, M. D., Huang, S., Rallapalli, S., Cook, J. M., Mirheydari, P., Ecker, G. F., Sieghart, W., & Ernst, M. (2013). Identification of novel positive allosteric modulators and null modulators at the GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$ + $\beta$ - interface. *British Journal of Pharmacology*, 169(2), 371–383. <https://doi.org/10.1111/bph.12151>

Vélez-Fort, M., Audinat, E., & Angulo, M. C. (2012a). Central role of GABA in neuron-glia interactions. *Neuroscientist*, 18(3), 237–250. <https://doi.org/10.1177/1073858411403317>

Vélez-Fort, M., Maldonado, P. P., Butt, A. M., Audinat, E., & Angulo, M. C. (2010). Postnatal switch from synaptic to extrasynaptic transmission between interneurons and NG2 cells. *Journal of Neuroscience*, 30(20), 6921–6929. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0238-10.2010>

Verdoorn, T. A. (1994). Formation of heteromeric  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptors containing two different  $\alpha$  subunits. *Molecular Pharmacology*, 45(3), 475–480.

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.

Vogt, K. (2015). Diversity in GABAergic signaling. *Advances in Pharmacology*, 73. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2014.11.009>

von Blankenfeld, G., Trotter, J., & Kettenmann, H. (1991). Expression and developmental regulation of a GABA<sub>A</sub> receptor in cultured murine cells of the oligodendrocyte lineage. *European Journal of Neuroscience*, 3(4), 310–316. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1991.tb00817.x>

- Wake, H., Lee, P. R., & Fields, R. D. (2011). Control of local protein synthesis and initial events in myelination by action potentials. *Science*, 333, 1647–1651. <http://science.sciencemag.org/>
- Wake, H., Ortiz, F. C., Woo, D. H., Lee, P. R., Angulo, M. C., & Fields, R. D. (2015). Nonsynaptic junctions on myelinating glia promote preferential myelination of electrically active axons. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms8844>
- Waldvogel, H. J., & Faull, R. L. M. (2015). The diversity of GABA<sub>A</sub> receptor subunit distribution in the normal and Huntington's disease human brain1. *Advances in Pharmacology*, 73, 223–264. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2014.11.010>
- Walters, R. J., Hadley, S. H., Morris, K. D., & Amin, J. (2000). Benzodiazepines act on GABA<sub>A</sub> receptors via two distinct and separable mechanisms. *Nature Neuroscience*, 3(12), 1274–1281. <https://doi.org/10.1038/81800>
- Welsh, T. G., & Kucenas, S. (2018). Purinergic signaling in oligodendrocyte development and function. *Journal of Neurochemistry*, 145(1), 6–18. <https://doi.org/10.1111/jnc.14315>
- Wheless, J. W., Ramsay, R. E., & Collins, S. D. (2007). Vigabatrin. *The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 4, 163–172.
- White, R., & Krämer-Albers, E. M. (2014). Axon-glia interaction and membrane traffic in myelin formation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00284>
- Whiting, P. J., K. A. Wafford y R. M. McKernan (2000): Pharmacological subtypes of GABA<sub>A</sub> 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.

- Williams, L., & French, J. A. (1999). Vigabatrin. *The American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 4, 163-172.
- Williamson, A. v, Mellor, J. R., Grant, A. L., & Randall, A. D. (1998b). Properties of GABA<sub>A</sub> receptors in cultured rat oligodendrocyte progenitor cells. *Neuropharmacology*, 37(7), 859–873.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9776382>
- Winkler, C. C., Yabut, O. R., Fregoso, S. P., Gomez, H. G., Dwyer, B. E., Pleasure, S. J., & Franco, S. J. (2018). The dorsal wave of neocortical oligodendrogenesis begins embryonically and requires multiple sources of sonic hedgehog. *Journal of Neuroscience*, 38(23), 5237–5250. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3392-17.2018>
- Wisden, W., Laurie, D. J., Monyer, H., & Seeburg, P. H. (1992). The distribution of 13 GABA receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, Diencephalon, Mesencephalon. *The Journal of Neuroscience*, 2(3), 1040–1062.
- Wittrup, A., & Lieberman, J. (2015). Knocking down disease: A progress report on siRNA therapeutics. *Nature Reviews Genetics*, 16(9), 543–552.  
<https://doi.org/10.1038/nrg3978>
- Wu, H., Shi, Y., Deng, X., Su, Y., Du, C., Wei, J., Ren, Y., Wu, M., Hou, Y., & Duan, H. (2015). Inhibition of c-Src/p38 MAPK pathway ameliorates renal tubular epithelial cells apoptosis in db/db mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 417, 27–35.  
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.09.008>
- Ymer, S., Draguhn, A., Wisden, W., Werner, P., Keinänen, K., Schofield, P. R., Sprengel, R., Pritchett, D. B., Seeburg, P. H., Feld, I. N., & Zellphysiologie, A. (1990). Structural and functional characterization of the  $\gamma$ 1 subunit of GABA<sub>A</sub>/benzodiazepine receptors. *The EMBO Journal*, 9(10), 3261–3267.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07525.x>
- Ymer, S., Schofield, P. R., Draguhn, A., Werner, P., Kohier, M., & Seeburg, P. H. (1989). GABA<sub>A</sub> receptor  $\beta$  subunit heterogeneity: functional expression of cloned

cDNAs. *The EMBO Journal*, 8(6), 1665–1670.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03557.x>

Yoon, B. E., & Lee, C. J. (2014). GABA as a rising gliotransmitter. *Frontiers in Neural Circuits*, 8. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00141>

Yoon, B. E., Woo, J., Chun, Y. E., Chun, H., Jo, S., Bae, J. Y., An, H., Min, J. O., Oh, S. J., Han, K. S., Kim, H. Y., Kim, T., Kim, Y. S., Bae, Y. C., & Lee, C. J. (2014). Glial GABA, synthesized by monoamine oxidase B, mediates tonic inhibition. *Journal of Physiology*, 592(22), 4951–4968. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.278754>

Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S. A., Bennett, M. L., Scholze, A. R., Phatnani, H. P., Paolo Guarnieri, X., Caneda, C., Ruderisch, N., Deng, S., Liddelow, S. A., Zhang, C., Daneman, R., Maniatis, T., Ben Barres, X. A., & Jia Qian Wu, X. (2014). An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *The Journal of Neuroscience*, 34(36), 11929–11947. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1860-14.2014>

Zhu, B., Zhao, C., Young, F. I., Franklin, R. J. M., & Song, B. (2014). Isolation and long-term expansion of functional, myelinating oligodendrocyte progenitor cells from neonatal rat brain. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, 2014, 2d.17.1-2d.17.16. <https://doi.org/10.1002/9780470151808.sc02d17s31>

Zonouzi, M., Scafidi, J., Li, P., McEllin, B., Edwards, J., Dupree, J. L., Harvey, L., Sun, D., Hübner, C. A., Cull-Candy, S. G., Farrant, M., & Gallo, V. (2015). GABAergic regulation of cerebellar NG2 cell development is altered in perinatal white matter injury. *Nature Neuroscience*, 18(5), 674–682. <https://doi.org/10.1038/nn.3990>

## 12. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <b>Oligodendrocitos</b> .....	5
Figura 2. <b>Linaje oligodendroglial</b> .....	7
Figura 3. <b>Nodo de Ranvier</b> .....	9
Figura 4. <b>Oligodendrocito mielinizante y la estructura de la mielina</b> .....	10
Figura 5. <b>La mielinización y algunos factores extrínsecos e intrínsecos que la modulan</b> .....	14
Figura 6. <b>La expresión de los GABA<sub>A</sub>R en oligodendrocitos (<i>in vitro</i>) depende de su contacto con las neuronas</b> .....	23
Figura 7. <b>Receptor-canal GABA<sub>A</sub></b> .....	25
Figura 8. <b>Sitios de unión a GABA y BZDs en el GABA<sub>A</sub>R</b> .....	27
Figura 9. <b>Mecanismo general de silenciamiento de genes por siRNAs</b> .....	44
Figura 10. <b>Técnica de control de voltaje con un electrodo (<i>patch-clamp</i>) en la configuración estándar de célula completa (<i>whole-cell</i>)</b> .....	47
Figura 11. <b>Cirugía de extracción de lóbulos ováricos de <i>Xenopus laevis</i></b> .....	51
Figura 12. <b>Aislamiento de folículos de <i>Xenopus laevis</i></b> .....	52
Figura 13. <b>Técnica de control de voltaje con dos electrodos</b> .....	53
Figura 14. <b>Curva dosis-respuesta a GABA y efecto de <math>\beta</math>-CCB en oligodendrocitos</b> .....	57
Figura 15. <b>Efecto farmacológico de <math>\beta</math>-CCB en oligodendrocitos sobre el sitio de BZDs</b> .....	58
Figura 16. <b>Efecto farmacológico de <math>\beta</math>-carbolinas sobre la amplitud de la respuesta a GABA en OLs y neuronas corticales en cultivo</b> .....	59
Figura 17. <b>Efecto farmacológico de <math>\beta</math>-CCB sobre la respuesta a GABA del receptor <math>\alpha 3\beta 2\gamma 1</math> expresado en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i></b> .....	61
Figura 18. <b>Efecto farmacológico de <math>\beta</math>-CCB sobre la respuesta a GABA de los receptores <math>\alpha 3\beta 2\gamma 1</math>, <math>\alpha 3\beta 2\gamma 3</math> y <math>\alpha 3\beta 2</math> expresados en ovocitos de <i>Xenopus laevis</i></b> .....	62
Figura 19. <b>Sitio clásico de unión a BZDs en el receptor <math>\alpha 3\beta 2\gamma 1</math> y la potenciación por <math>\beta</math>-CCB</b> .....	63

Figura 20. Sitio de unión de baja afinidad para DZP en el receptor $\alpha 3\beta 2\gamma 1$ y la potenciación por $\beta$ -CCB .....	64
Figura 21. Cultivo mixto de células gliales de corteza de rata neonatales .....	66
Figura 22. Imágenes de inmunofluorescencia del cultivo mixto de células gliales de corteza de rata neonatales .....	67
Figura 23. Pericitos en cultivo mixto de células gliales de corteza de rata neonatales .....	68
Figura 24. Relación dosis-respuesta a GABA del receptor endógeno expresado en células tipo OPCs en cultivo mixto de células gliales .....	69
Figura 25. Cultivo primario de célula precursoras de oligodendrocitos corticales .....	70
Figura 26. Proliferación de OPCs en cultivo .....	71
Figura 27. Expresión de marcadores gliales en OPCs de 2 DIV a 4 DIV en medio de proliferación .....	72
Figura 28. Perfil electrofisiológico de OPCs en medio de proliferación .....	73
Figura 29. Expresión de mRNAs de subunidades GABA <sub>A</sub> en OPCs en medio de proliferación .....	74
Figura 30. Expresión de subunidades GABA <sub>A</sub> R en OPCs mantenidos en medio de proliferación .....	76
Figura 31. Relación dosis-respuesta a GABA del receptor endógeno expresado en OPCs mantenidas entre 2 y 4 DIV en medio de proliferación .....	77
Figura 32. Curvas dosis-respuesta a Zn <sup>2+</sup> de OPCs mantenidos en medio de proliferación .....	78
Figura 33. Patrón funcional y farmacológico del receptor GABA <sub>A</sub> expresado en OPCs mantenidas en medio de proliferación entre 2 y 4 DIV .....	80
Figura 34. Silenciamiento de la expresión de la subunidad GABA <sub>A</sub> R $\alpha 3$ en OPCs .....	81
Figura 35. Efecto del silenciamiento de la subunidad GABA <sub>A</sub> R $\alpha 3$ sobre la amplitud y la cinética de la respuesta a GABA en OPCs .....	82
Figura 36. Efecto del silenciamiento de la subunidad GABA <sub>A</sub> R $\alpha 3$ sobre la sensibilidad a GABA en OPCs .....	83

Figura 37. Efecto del silenciamiento de la subunidad GABA <sub>A</sub> R $\alpha$ 3 sobre la sensibilidad a $\beta$ -CCB en OPCs .....	84
Figura 38. Silenciamiento de la expresión de la subunidad GABA <sub>A</sub> R $\gamma$ 1 en OPCs .....	85
Figura 39. Efecto del silenciamiento de la subunidad GABA <sub>A</sub> R $\gamma$ 1 sobre la amplitud de la respuesta a GABA en OPCs .....	85
Figura 40. Efecto del silenciamiento de la subunidad GABA <sub>A</sub> R $\gamma$ 1 sobre la sensibilidad a GABA en OPCs .....	86
Figura 41. Efecto del silenciamiento de la subunidad GABA <sub>A</sub> R $\gamma$ 1 sobre la sensibilidad a $\beta$ -CCB en OPCs .....	87
Figura 42. Distribución celular de las subunidades GABA <sub>A</sub> R $\alpha$ 2 y $\alpha$ 3 en las OPCs <i>in vitro</i> .....	89
Figura 43. Expresión de mRNA para gefirina y colibistina en células del linaje oligodendroglial .....	90
Figura 44. Expresión de las proteínas de andamiaje colibistina en células oligodendrogliales .....	91
Figura 45. Expresión de las proteínas de andamiaje gefirina en células oligodendrogliales .....	92
Figura 46. Co-localización de gefirina y las subunidades GABA <sub>A</sub> R $\alpha$ 2 y $\alpha$ 3 en OPC .....	93
Figura 47. Estudio de la maduración de OPC en cultivo primario .....	95
Figura 48. Expresión de marcadores gliales en OPCs de 4 DIV a los que se le induce la maduración .....	96
Figura 49. Efecto del silenciamiento de las subunidades $\alpha$ 3 y $\gamma$ 1 sobre la maduración de OPCs en cultivo .....	98
Figura 50. Efecto del silenciamiento de las subunidades $\alpha$ 3 y $\gamma$ 1 sobre la expresión de marcadores moleculares del linaje oligodendroglial .....	100
Figura 51. Efecto del bloqueo farmacológico de los GABA <sub>A</sub> Rs de OPC en medio de maduración .....	102
Figura 52. Efecto del tratamiento farmacológico de OPC en medio de maduración con los bloqueadores específicos del GABA <sub>A</sub> R, bicuculina	

<b>y gabazina .....</b>	<b>103</b>
<b>Figura 53. Presencia de GABA en el medio condicionado de OPCs (MPc) detectado en ovocitos de <i>Xenopus</i> expresando subunidades <math>\rho 1</math> .....</b>	<b>105</b>
<b>Figura 54. Presencia de GABA en el medio condicionado de OPCs (MPc) .....</b>	<b>106</b>
<b>Figura 55. Efecto del medio condicionado de OPCs (MPc) sobre ovocitos que expresaban GABA<sub>A</sub>R .....</b>	<b>107</b>

### 13. LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AC</b>	Adenilato ciclasa
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BZDs</b>	Benzodiazepinas
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Calcio
<b>Cl<sup>-</sup></b>	Cloruro
<b>cRNA</b>	Ácido ribonucleico complementario
<b>DMCM</b>	Ácido carboxílico metil ester 4-etil-6,7-dimetoxi-9H-pirido
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DZP</b>	Diazepam
<b>ELISA</b>	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
<b>EM</b>	Esclerosis Múltiple
<b>FMZ</b>	Flumazenil
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -amino butírico
<b>GABA<sub>A</sub>R</b>	Receptor al ácido $\gamma$ -amino butírico de tipo A
<b>GABA<sub>B</sub>R</b>	Receptor al ácido $\gamma$ -amino butírico de tipo B
<b>GFAP</b>	Proteína gliofibrilar ácida
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente
<b>GTP</b>	Guanosín trifosfato
<b>K<sup>+</sup></b>	Potasio
<b>MBP</b>	Proteína básica de la mielina
<b>ME</b>	Microscopía electrónica
<b>miRNA</b>	Micro-RNA
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>Na<sup>+</sup></b>	Sodio
<b>n.s.</b>	No significativo
<b>OLs</b>	Oligodendrocitos
<b>OPCs</b>	Células precursora de oligodendrocitos
<b>PAM</b>	Potenciador alostérico positivo

<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDGFR<math>\alpha</math></b>	Receptor $\alpha$ del factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>PLP</b>	Proteína proteolipídica
<b>RN</b>	Ringer normal
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa
<b>siRNA</b>	RNA pequeño interferente
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>SNP</b>	Sistema nervioso periférico
<b>THIP</b>	4,5,6,7-Tetrahidroisoxazolo[5,4-c]piridin-3-ol hidrocloretrato
<b>Zn<sup>2+</sup></b>	Zinc
<b><math>\beta</math>-CCB</b>	Butil- $\beta$ -carbolina-3-carboxilato