



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRIA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

**“CURSO TEMPORAL DE LA REMIELINIZACIÓN DURANTE LA
ADMINISTRACIÓN DE β -CARBOLINAS EN UN MODELO DE
DESMIELINIZACIÓN POR CUPRIZONA”**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)**

PRESENTA

DEYANIRA MUNGUÍA VILLANUEVA

TUTOR PRINCIPAL

DR. ABRAHAM JOTSSEL CISNEROS MEJORADO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR

DRA. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA
FACULTAD DE QUÍMICA, UAQ

DR. SARAEL ALCAUTER SOLÓRZANO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO; 26 DE SEPTIEMBRE, 2022.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

Este proyecto fue apoyado por el programa UNAM-DGAPA-PAPIIT IN203519 y CONACYT 1771. La autora contó con beca del CONACYT 1004708.

A Alexandra Elbakyan, por el acceso a los artículos científicos que he necesitado.

A quienes hicieron posible esta tesis: Dr. Abraham Cisneros, por el tiempo y paciencia dedicados durante las reuniones en las que discutimos el proyecto en sus diferentes etapas, por dedicar muchas, muchas horas a escanear ratones en el resonador, por enseñarme a perfundir, a teñir y en general por apoyarme como su estudiante; al personal del Bioterio del INB, Dra. Alejandra Castilla, Dra. María Carbajo, MVZ. Martín García; al LANIREM, en donde la magia de la imagenología comienza, especialmente al Dr. Juan Ortiz por su apoyo técnico; a la Dra. Deisy Gasca de la Unidad de Análisis Conductual por su dedicación, por enseñarme con paciencia a usar las cajas de campo abierto y por tener la mejor organización de alumnas y alumnos posible; a la Unidad de microscopía, donde hasta los cortes y tinciones arruinadas se ven asombrosas, ingeniera Nydia Hernández, gracias por su paciente enseñanza usando el Leica. A la Dra. Edith Garay por ser una investigadora inspiradora, excelente profesora y por su gran labor gestionando los materiales del laboratorio. Al Dr. Rogelio por sus valiosas aportaciones en los ensayos de presentaciones. A compañeras y compañeros del laboratorio, principalmente Ana Luisa Ocampo, por enseñarme con mucha paciencia a usar el criostato y por compartirme en ocasiones de sus soluciones de sacarosa (muchas gracias por todo, veci); Fidel Vazquez y Samuel, por su apoyo técnico y amistad; Pablo Ordaz, por sus atentos comentarios en los ensayos de presentaciones; Gaby Cárdenas y Berenice, por su compañerismo y sororidad en el laboratorio.

Especial agradecimiento a integrantes de mi comité tutorial, Dra. Laura Berumen de la Facultad de Química de la UAQ y al Dr. Sarael Alcáuter, por sus puntales y oportunas observaciones durante los exámenes tutorales y en revisiones recientes de la tesis.

Agradezco cálidamente a quienes me acompañaron activamente y enriquecieron mi crecimiento personal durante los últimos años. A mis compañeras y compañeros del programa por ser una generación muy linda. A Diego Ramírez por su amistad, su perspectiva crítica, el tiempo dedicado a ayudarme con algunos análisis, gráficas y por las

sesiones de jitsi para el desahogo emocional. A Alejandra Castro por su amistad, por las mañanas y tardes de café y por todas las divertidas aventuras que tuvimos en Neurokuni. A Diego Valdez por ayudarme pacientemente con algunas gráficas y análisis y por las mañanas de chismes y cafés. Gracias a las compañeras y compañeros de las sedes de FESI y Psicología por su compañerismo y complicidad en los eventos de Data Blitz y Jornadas Académicas. A las y los profesores que están involucradas e involucrados en las coordinaciones de los semestres y las clases del programa de maestría, a los investigadores y estudiantes de los laboratorios de neuroimagen. A la Dra. Nuri por sus atenciones y paciencia cada inicio y fin de semestre -y hasta la fecha-. A mis compañeras de Neurokuni, Ale Díaz, Ana Aquiles y Dani Saavedra por su amistad y por el entusiasmo y complicidad compartiendo ciencia. A amigas y amigos de generaciones arriba, abajo y de otros programas de posgrado, Jalil, Viri, Melis, Ame, Cintia, Pretthi, Ilektra, Dina, Ana Karen, Arun, Sofía Fernández, Luis Ángel, Adán Lara, Cindy, Omar, Poncho, Jonathan, Enrique, Azalea y todas las R-ladies de Querétaro...

Amorosamente agradezco el apoyo incondicional de Emmanuel, Mirna, Eréndira, Tonatiuh, Jorge, Leo y Luna.

Además, extendiendo un abrazo a estudiantes y mujeres víctimas de violencia de género que han denunciado casos relacionados con la Institución. Estamos lejos de tener protocolos efectivos y fácil justicia tanto a nivel institucional como a nivel judicial, pero denunciar es fundamental para empezar a hacer cambios concretos e ir disminuyendo los casos normalizados de negligencia, acoso e incluso intentos de violación y feminicidio que ejercen compañeros de laboratorio, autoridades escolares, estudiantes, profesores, etc. Y a las mujeres del instituto: no callen, no dejen de señalar, de exigir, no dejen de reunirse ni de marchar (cuando las condiciones pandémicas lo permitan). Formen espacios seguros y extiendan sus redes de apoyo. Esperemos que muy pronto dentro y fuera de las instituciones logremos vivir libres de violencia.

ÍNDICE

Resumen	7
Abstract	8
I. Introducción	10
II. Antecedentes	12
1. Funciones de la mielina	12
2. La mielinización requiere señalización GABAérgica	14
3. β -CCB: modulador de los receptores GABAA en células del linaje oligodendroglial	18
4. Cuprizona: un modelo de desmielinización	22
4.1 Imágenes de resonancia magnética permiten evaluar el estado de la mielina durante la desmielinización por cuprizona	24
4.2 Cambios conductuales en ratones tratados con cuprizona	27
III. Planteamiento del problema	30
IV. Pregunta de investigación	30
V. Hipótesis	30
VI. Objetivos	31
VII. Metodología	32
1. Procedimientos con animales	32
2. Modelo de desmielinización-remielinización por cuprizona	32
3. BGII, histología para mielina	33
4. Imagenología por resonancia magnética	35
5. Prueba conductual de campo abierto	37
6. Análisis Estadístico	39
VIII. Resultados	40
1. Período de desmielinización	40
1.1 Evaluación histológica del proceso de desmielinización	40
1.1.1 Evaluación histológica en la intoxicación aguda por cuprizona	40
1.1.2 Evaluación histológica del grado de desmielinización después de la suspensión de cuprizona	44
1.2 Imagenología por resonancia magnética	45
1.2.1 Imágenes anatómicas pesadas a T2 durante el proceso de desmielinización	45
1.2.2 La fracción de anisotropía disminuye durante la desmielinización	46
1.2.3 La difusividad radial aumenta durante la desmielinización	47
1.3 Evaluación de la conducta exploratoria durante la desmielinización	48

2. Exploración del tratamiento farmacológico con β -CCB	50
2.1 Evaluación histológica a 3 semanas de tratamiento con β -CCB	50
2.2 Evaluación histológica a 1.5 semanas de tratamiento con β -CCB	52
2.3 Evaluación del tratamiento con β -CCB sobre la conducta exploratoria	53
IX. Discusión	55
X. Conclusiones	58
XI. Citas bibliográficas	59

Resumen

La esclerosis múltiple (EM) es la patología inflamatoria desmielinizante del sistema nervioso central (SNC) más común. Existen terapias inmunosupresoras que han ofrecido grandes avances en el manejo de esta enfermedad, sin embargo, explorar otros blancos terapéuticos como la modulación selectiva de los oligodendrocitos (OLG), podría enriquecer la terapéutica y mejorar el pronóstico de los pacientes con EM. El objetivo del presente proyecto fue evaluar si la N-butil- β -carbolina-3-carboxilato (β -CCB), una sustancia potenciadora de la señalización GABAérgica oligodendroglial *in vitro*, es promotora de la remielinización en el cerebro adulto y usando un modelo murino de desmielinización sistémica del SNC por la toxina bis-ciclohexanona oxaldihidrazona (cuprizona). Para producir desmielinización del SNC, se administró 0.3% de cuprizona en la dieta de ratones macho de 8 semanas de edad durante 3 semanas consecutivas. Para evaluar la desmielinización, se estudió el cuerpo calloso (CC) durante 6 semanas a partir de iniciada la cuprizona. Se adquirieron imágenes de resonancia magnética pesadas a difusión (dMRI) e imágenes de microscopía de luz de cortes histológicos en los que se usó la tinción específica para la mielina black gold II (BGII). Por dMRI se hizo un seguimiento longitudinal del proceso de desmielinización, el cual fue evidente a partir de la semana 5 de iniciada la cuprizona. En la semana 6 de haberse iniciado la cuprizona, fue comprobada la desmielinización del CC por dMRI e histología. Entonces se administró β -CCB diariamente en dosis de 1 mg/kg vía intraperitoneal (i.p.) por 1.5 semanas y 3 semanas. En ambas etapas, la histología no mostró algún efecto promielinizante de β -CCB, posiblemente por la alta dispersión de las observaciones o por la recuperación del daño de la sustancia blanca en estas temporalidades. Además, se estudió la conducta exploratoria con la prueba de campo abierto durante el período de remielinización. Los hallazgos conductuales sugieren que la administración diaria de β -CCB durante 2 semanas, a dosis de 1 mg/kg i.p. en ratones adultos, no produce efectos adversos sobre la conducta exploratoria ni locomotora. Para poder evaluar si la β -CCB promueve

remielinización del CC usando el modelo de desmielinización por cuprizona, consideramos necesario ampliar la muestra estudiada y emplear otra metodología que permita estudiar el proceso de remielinización en períodos menores a 1.5 semanas para que el efecto de la remielinización espontánea que se produce tras suspender el tratamiento con cuprizona pueda distinguirse del posible efecto promielinizante de β -CCB.

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is the most common inflammatory demyelinating pathology of the central nervous system (CNS). There are immunosuppressive therapies that have offered great advances in the management of this disease, however, exploring other therapeutic targets such as selective modulation of the oligodendrocytes (OLG), could enrich the therapeutics and improve the prognosis of patients with MS. The aim of this project was to assess whether N-butyl-beta-carboline-3-carboxylate (β -CCB), a substance that enhances oligodendroglial GABAergic signaling *in vitro*, is a promoter of remyelination in the adult brain using a model of systemic demyelination of the CNS by the toxin bis-cyclohexanone oxaldihydrazone (cuprizone). To produce CNS demyelination, 0.3% cuprizone was administered in the diet of male 8 weeks old mice for 3 consecutive weeks. Diffusion weighted magnetic resonance imaging (dMRI) and light microscopy images of histological sections using the myelin-specific stain black gold II (BGII) were acquired to measure the demyelination of the corpus callosum (CC) 6 weeks after starting the cuprizone treatment. We used dMRI to follow-up longitudinally the demyelination process, which was evident from week 5 after starting the cuprizone. At week 6 after starting the cuprizone, CC demyelination was confirmed by dMRI and histology. β -CCB was then administered daily at a dose of 1 mg/kg intraperitoneally (i.p.) during 1.5 and 3 weeks. In both cases, histology did not show any promyelinating effect of β -CCB, possibly due to the high dispersion of

observations or the recovery of the white matter damage in these temporalities. In addition, the exploratory behavior was studied during the remyelinating period with the open field test. Results suggest that the daily administration of β -CCB at 1 mg/kg i.p. during 2 weeks in adult mice, does not produce adverse effects on exploratory or locomotor behavior. In order to evaluate whether β -CCB promotes CC remyelination using the cuprizone model, we consider that it is necessary to expand the study sample and use another methodology that allows the acute study of the remyelination process in periods of time minor than 1.5 weeks so that the effect of remyelination that occurs after the discontinuation of the cuprizone treatment can be distinguished from the possible promyelinating effect of β -CCB.

I. Introducción

La mielina, una estructura lipoprotéica que recubre los axones, propicia el aumento de la velocidad de propagación de los potenciales de acción, que es esencial para llevar a cabo funciones sensoriales, motoras y cognitivas. Así mismo, esta estructura ofrece soporte trófico y protección al axón (Nave y Werner, 2014; Murphy y Franklin, 2017; Bothwell, 2017). En el SNC, la mielina es producida por células gliales llamadas oligodendrocitos maduros o mielinizantes (OLG). Para llegar a la etapa mielinizante, los OLG proliferan a partir de células precursoras de oligodendrocitos (OPC), migran a la zona correspondiente, se diferencian como células del linaje oligodendroglial y maduran ahí hasta su estadio mielinizante (Emery y Lu, 2015). Estos pasos secuenciales se refieren al proceso de mielinización, mismo que involucra una serie de señales entre neuronas y células del linaje oligodendroglial como factores de crecimiento y neurotransmisores, tal como el ácido γ -aminobutírico (GABA) (Berger, Walz, Schnitzer y Kettenmann, 1992; Vélez-Fort, Audinat y Angulo, 2012; Boulanger y Messier, 2014). Recientemente, se ha sugerido que los receptores a GABA del tipo A ($GABA_A$ R) en las células del linaje oligodendroglial participan en el proceso de mielinización (Zonouzi *et al.*, 2015; Hamilton *et al.*, 2017). Además, hallazgos recientes indican que los $GABA_A$ R de las células del linaje oligodendroglial tienen un perfil farmacológico diferente a los $GABA_A$ R neuronales. Por ejemplo, existe un grupo de moléculas llamadas β -carbolinas que ejercen efectos diferentes sobre los $GABA_A$ R neuronales y los $GABA_A$ R oligodendrogliales en modelos *in vitro* (Arellano *et al.*, 2016; Ordaz *et al.*, 2021). Un caso particular es el de la β -carbolina N-butil- β -carbolina-3-carboxilato (β -CCB), una sustancia que potencia la actividad sobre los $GABA_A$ R oligodendrogliales, pero que no tiene efecto sobre los $GABA_A$ R neuronales (Arellano *et al.*, 2016; Ordaz *et al.*, 2021). Apoyados en estos estudios *in vitro*, también se observó que la administración sistémica de β -CCB promueve la remielinización del pedúnculo cerebeloso inferior en un modelo animal de desmielinización local por inyección de bromuro de etidio (Cisneros-Mejorado *et al.*, 2020). Esto sugiere que la

potenciación de la señalización GABAérgica sobre los GABA_AR en células del linaje oligodendroglial es importante durante el proceso de mielinización y que, aunque aún no están claros los mecanismos que se desencadenan a nivel molecular y celular, la β -CCB es un modulador alostérico específico del GABA_AR en dicho linaje y un posible promotor de la mielinización en modelos *in vivo*. Así, la posibilidad de una modulación farmacológica celular dirigida determina una pauta clave para la investigación del efecto de la señal GABAérgica en el proceso de mielinización.

Con objetivo de evaluar el posible efecto promielinizante de β -CCB *in vivo*, en el presente proyecto usamos un modelo murino de desmielinización por cuprizona, ya que este modelo permite además estudiar la remielinización (Carlton, 1967; Doan *et al.*, 2013). Usando imagenología por resonancia magnética (IRM) para el estudio longitudinal e histología para los estudios transversales, se estudió la desmielinización. Después, por histología se estudió el proceso de remielinización durante la administración de β -CCB. Debido a problemas con los equipos de resonancia magnética y por la contingencia de COVID-19, no fue posible monitorear este período por IRM. Una vez comprobada la desmielinización por IRM e histología, se administró β -CCB en dosis de 1 mg/kg vía intraperitoneal (i.p.) por 1.5 semanas y 3 semanas. Tanto a 1.5 como a 3 semanas de tratamiento, la histología no mostró algún efecto promielinizante de β -CCB, posiblemente por la alta dispersión de observaciones o por la recuperación del daño de la sustancia blanca en estas temporalidades. Además del estudio de la mielinización, se empleó la prueba de campo abierto para estudiar la conducta exploratoria y locomotora durante el tratamiento de β -CCB. Los hallazgos conductuales sugieren que la administración de β -CCB en dosis de 1 mg/kg i.p. en ratones adultos no produce efectos adversos sobre la conducta exploratoria ni locomotora.

Creemos ideal el modelo de cuprizona para investigar el posible efecto promielinizante de β -CCB *in vivo* en etapas adultas, pero consideramos necesario ampliar la muestra estudiada y emplear alguna otra metodología que permita estudiar el proceso de remielinización en períodos menores a 1.5 semanas para que el efecto de la remielinización espontánea que se produce tras suspender el tratamiento con cuprizona pueda distinguirse del posible efecto promielinizante de β -CCB.

II. Antecedentes

1. Funciones de la mielina

La mielina es una estructura que recubre los axones y promueve la conducción saltatoria de los potenciales de acción, lo que facilita la propagación rápida de estos, siendo esencial este mecanismo para llevar a cabo funciones sensoriales, motoras y cognitivas en algunos vertebrados. Así mismo, la mielina ofrece soporte trófico y protección al axón (Figura 1) (Nave y Werner, 2014; Murphy y Franklin, 2017; Bothwell, 2017). La composición de la mielina consiste en aproximadamente 30 % de proteínas, siendo las principales la proteína básica de la mielina (MBP) y la proteína proteolipídica y 70 % de lípidos con altas concentraciones de colesterol y fosfolípidos. (Murphy y Franklin, 2017; Nave y Werner, 2014; Stadelmann *et al.*, 2019). Es por esta naturaleza rica en lípidos que la mielina actúa como aislante y restringe los potenciales de acción a segmentos cortos no mielinizados llamados nodos de Ranvier. Esta compartimentalización de los axones en nodos de Ranvier (segmentos no mielinizados) e internodo y paranodos (segmentos cubiertos de mielina) es la base estructural para la conducción saltatoria del potencial de acción que aumenta la velocidad de conducción de 20 - 100 veces en comparación con axones no mielinizados del mismo diámetro (Koester y Siegelbaum, 2013). El tamaño típico de un nodo de Ranvier varía entre 1 - 2 μm y esto puede depender incluso del subtipo neuronal; por ejemplo, en las neuronas corticales se ha observado que las neuronas GABAérgicas presentan nodos más cortos que las neuronas no GABAérgicas (Lubetzki *et al.*, 2020).

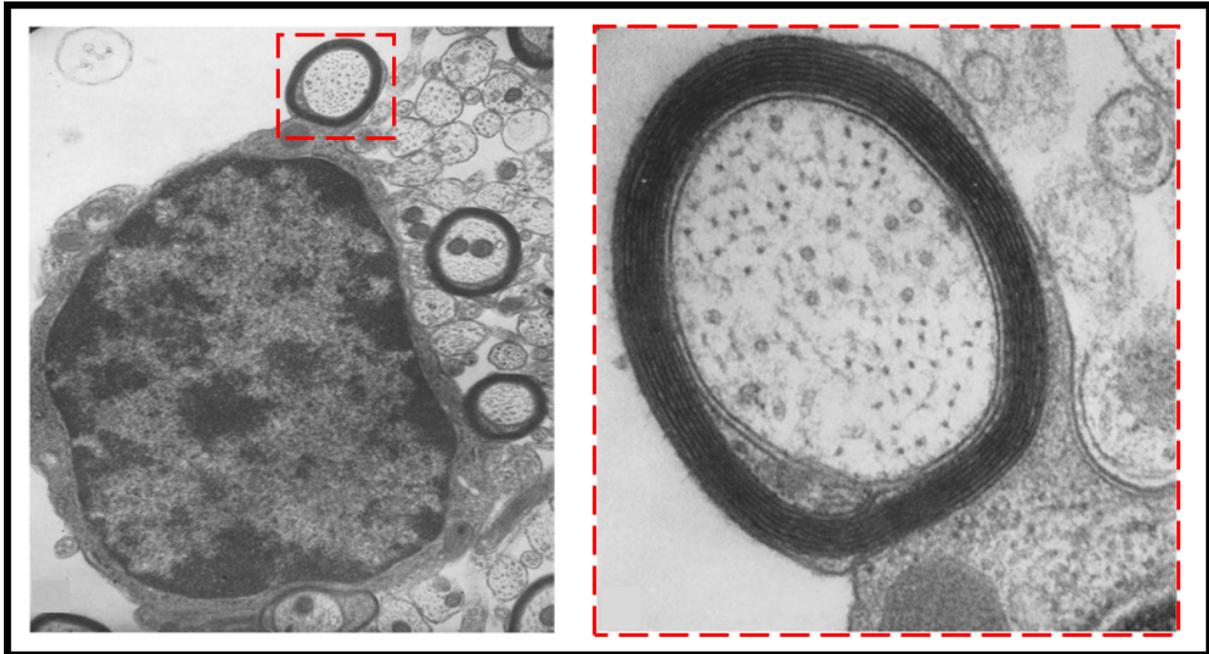


Figura 1. Micrografías de un oligodendrocito recubriendo con mielina a un axón.

Micrografía tomada a través de microscopía electrónica de transmisión. A la izquierda una célula oligodendroglial en la sustancia blanca del cerebro de una rata adulta. En la parte indicada con el recuadro rojo se observa el corte transversal de un axón recubierto por una vaina de mielina madura (capturada a 5,000 X). A la derecha imagen ampliada (capturada a 110,000 X) (adaptado de Hirano, A., 1968).

En el SNC existen diferentes neuronas inhibitorias que ayudan a la construcción de circuitos corticales. Estas neuronas exhiben características fenotípicas específicas según sus funciones especializadas. Micheva *et al.* (2018) estudiaron la mielinización axonal como una de las características que distinguen a las neuronas inhibitorias. Encontraron que, en comparación con los axones mielinizados de neuronas excitatorias, los axones de neuronas inhibitorias tienen nodos de Ranvier más cortos y más MBP en su vaina de mielina. Además, observaron que estos axones de células inhibitorias tienen más mitocondrias, probablemente para sostener las altas demandas metabólicas.

La mielinización, además de acelerar la conducción del potencial de acción, ofrece soporte trófico y metabólico al axón (Bothwell, 2017). Se ha propuesto que los nodos de Ranvier podrían actuar como centros funcionales para que las neuronas interactúen con las células gliales. Incluso, se ha propuesto que aumenta la

vulnerabilidad cuando los axones carecen de la compartimentalización que produce la mielina (Lubetzki *et al.*, 2020).

2. La mielinización requiere señalización GABAérgica

En el SNC, la mielina está formada por extensiones de la membrana citoplasmática de células oligodendrogliales en etapa mielinizante o madura. Antes de esta etapa, los OPC deben migrar, proliferar y al llegar al sitio a mielinizar, diferenciarse y madurar a la etapa final mielinizante (Figura 2). A este proceso se le conoce como mielinización (Skaper, 2019).

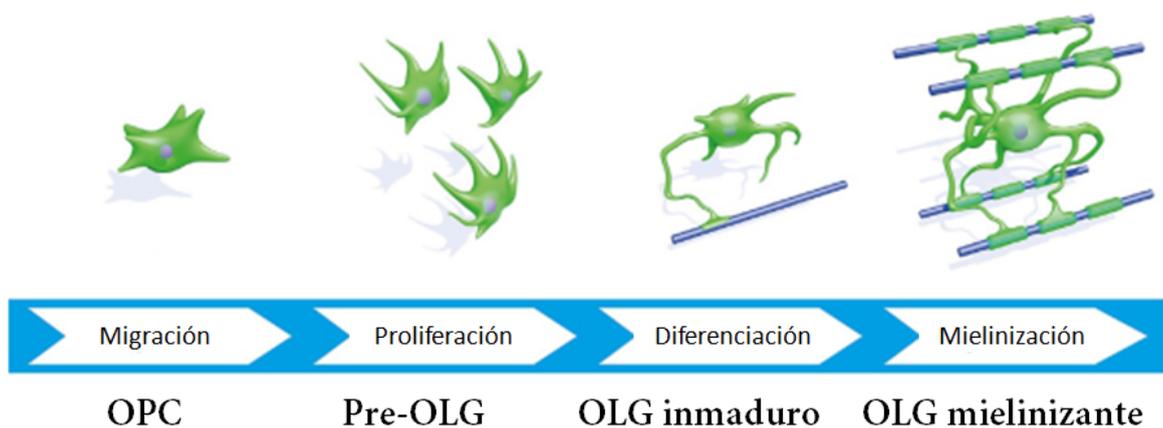


Figura 2. Orden de maduración de un oligodendrocito mielinizante.

Los OPC migran desde la zona subventricular a la región a mielinizar en el encéfalo. En este proceso, factores de crecimiento y neurotransmisores representan un papel importante para la señalización entre neuronas y células del linaje oligodendroglial. Además de la migración de los OPC, el proceso de mielinización consiste en la proliferación y diferenciación celular, en donde también se ven implicadas diferentes moléculas de señalización como neurotransmisores. (OPC: célula precursora de oligodendrocito; pre-OLG: pre-oligodendrocito; OLG inmaduro: oligodendrocito inmaduro; OLG mielinizante: oligodendrocito mielinizante o maduro) (adaptado de Skaper, 2019).

El programa de mielinización involucra una cascada de señales entre neuronas y células del linaje oligodendroglial. Algunas de las moléculas claves que se han propuesto como parte de esta comunicación son factores de crecimiento y neurotransmisores. Se ha mostrado que la maduración de OPC a OLG mielinizantes

depende de la actividad de axones vecinos, ya que las células oligodendrogiales reciben información glutamatérgica y GABAérgica de las neuronas cercanas (Gallo *et al.*, 1996; Lin y Bergles, 2004; Arellano *et al.*, 2016).

Se ha estudiado que las células del linaje oligodendroglial expresan receptores para el ácido γ -aminobutírico (GABA) (Hoppe y Kettenmann, 1989). Además, se ha encontrado que estas células reciben señales de neuronas GABAérgicas en etapas tempranas del desarrollo y que en OLG maduros la sensibilidad a GABA va en decremento (Berger *et al.*, 1992), lo que sugiere un rol específico de la señalización GABAérgica en el desarrollo del linaje oligodendroglial y durante estadíos iniciales de mielinización y/o reconocimiento axonal (Berger *et al.*, 1992; Vélez-Fort *et al.*, 2012).

En experimentos más recientes, Zonouzi *et al.* (2015) observaron disminución de la maduración de las células de Purkinje, neuronas GABAérgicas, en el cerebelo de ratones en un modelo de lesión difusa de sustancia blanca por exposición a hipoxia. Consecuente a la disminución del número de células de Purkinje funcionales, disminuyó hasta 50 % la frecuencia de disparo de estas neuronas. Esto conllevó a menor señalización GABAérgica para los OPC cercanos y proliferación extensa de OPC, pero disminución en la cantidad de OLG maduros. Como consecuencia, hubo pérdida de mielina. Además, observaron que los efectos desmielinizantes que provocó la hipoxia se revirtieron al inhibir con tiagabina el catabolismo y la recaptura neuronal de GABA (Figura 3) (Zonouzi *et al.*, 2015).

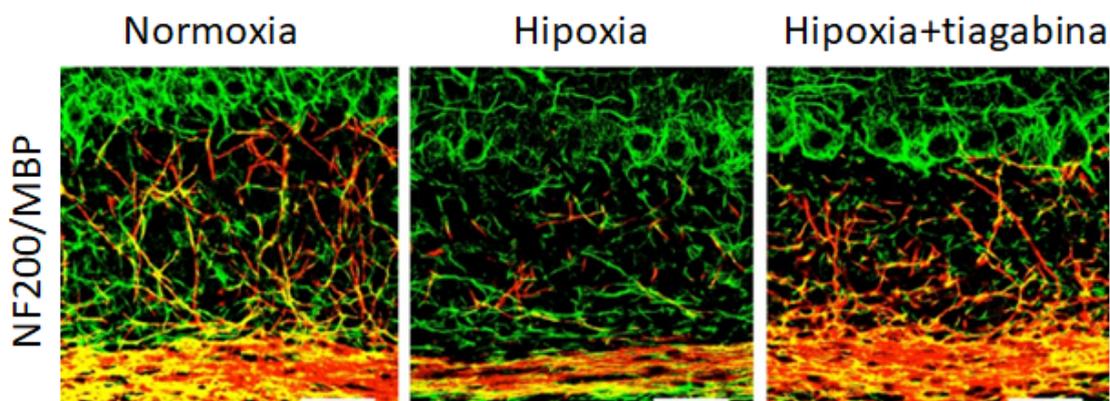


Figura 3. Imágenes de inmunofluorescencia donde se muestra el efecto desmielinizante de la hipoxia.

Imágenes de cortes sagitales de cerebelo de ratones con inmunomarcaje para neurofilamento 200 (NF200; neuronas, en verde) y proteína básica de la mielina (MBP, en rojo). Se observa a la izquierda un corte de ratón en condiciones normóxicas; en el centro un corte de ratón expuesto a hipoxia durante 8 días (P3 - P11) y a la derecha un corte de ratón expuesto a hipoxia durante 8 días (P3 - P11) y al que se le aplicó tiagabina, un inhibidor de la recaptura neuronal de GABA. Barra de escala: 50 μ m (adaptado de Zonouzi *et al.*, 2015).

Estos hallazgos indican que las señales mediadas por GABA pueden ser un mecanismo de control sobre la diferenciación de OPC a OLG.

GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC en mamíferos y su señalización es fundamental para la coordinación de las funciones cerebrales (Farrant y Nusser, 2005). Los efectos inhibitorios del GABA dependen de dos tipos de receptores:

1. Receptor GABA_A (GABA_AR), ionotrópico y de acción rápida que está conformado por un canal de cloro (Cl⁻).
2. Receptor GABA_B (GABA_BR), metabotrópico acoplado a proteína G y de acción lenta.

Tanto OPC como OLG expresan ambos tipos de receptores. Para fines del presente trabajo, se continuará describiendo únicamente a los GABA_AR. Los GABA_AR están ampliamente distribuidos en el SNC y son miembros de la familia de los receptores pentaméricos ionotrópicos activados por ligando. Los receptores de esta familia están conformados por cinco subunidades que rodean un poro central, en este caso,

conductor de Cl⁻ y bicarbonato (Farrant y Nusser, 2005). La activación del GABA_AR resulta en un aumento de la conductancia membranal al Cl⁻, causando en neuronas aumento de Cl⁻ en el interior e hiperpolarización de la membrana, mientras que en OLG causa despolarización dosis-dependiente (Gilbert *et al.*, 1984). Se ha propuesto que la mayoría de GABA_AR neuronales del SNC están compuestos por subunidades α , β , y γ . Aproximadamente del 50 - 60 % de GABA_AR neuronales son del subtipo $\alpha 1:\beta 2:\gamma 2$ (Figura 4), siendo esta la isoforma más prevalente, presente en casi todas las regiones del cerebro (Chua y Chebib, 2017). Sin embargo, es posible que distinta conformación de subunidades exista entre las células del linaje oligodendroglial y neuronas dado los diferentes efectos farmacológicos que se han explorado (Arellano *et al.*, 2016; Cisneros-Mejorado *et al.*, 2020; Ordaz *et al.*, 2021). Este supuesto se ha indicado en estudios más recientes, sugiriendo que la composición principal del GABA_AR en células del linaje oligodendroglial es $\alpha 3:\beta 2:\gamma 1$ (Ordaz *et al.*, 2021).

Históricamente, el GABA_AR neuronal ha sido muy estudiado por su farmacología diversa. El sitio de unión a GABA se encuentra en el dominio extracelular entre las subunidades β y α . Sin embargo, los GABA_AR neuronales pueden ser activados por una gran variedad de drogas debido a la heterogeneidad de sus subunidades (Chua y Chebib, 2017). Por ejemplo, existe un sitio de unión para benzodiazepinas (BZD) entre α (1, 2, 3 o 5) y γ . Las BZD clásicas son un grupo de fármacos que potencian la activación de los GABA_AR neuronales. Algunos de los efectos principales y evidentes de las BZD son sedación, relajación muscular, amnesia, ansiolisis y prevención de convulsiones. Por eso, el descubrimiento de sitios de unión de alta afinidad para BZD en los GABA_AR neuronales del SNC proporcionó una herramienta experimental importante.

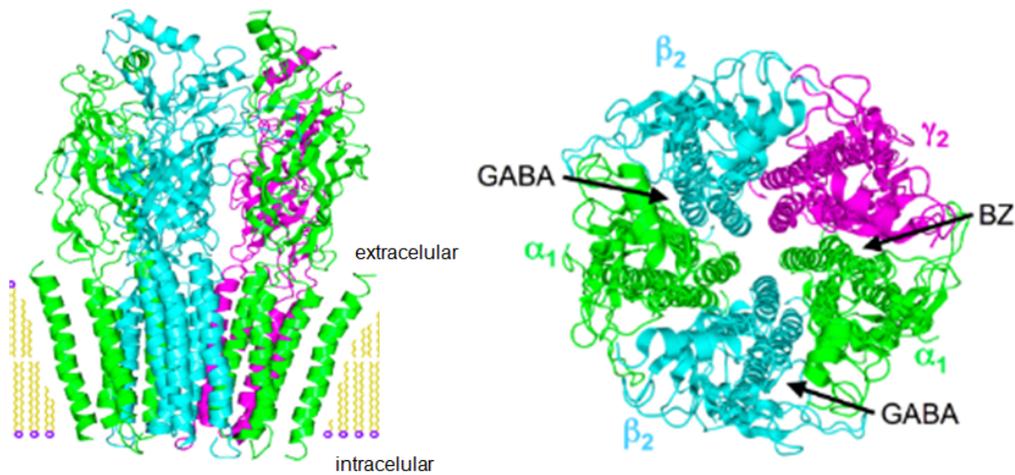


Figura 4. Esquema de un receptor GABA_A neuronal.

Cinco subunidades (la secuenciación del genoma humano ha identificado al menos 19 genes de las subunidades del GABA_AR: α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ , π y ρ 1-3) se unen para formar un canal heteropentamérico permeable a Cl⁻. A pesar de la heterogeneidad de las subunidades, la mayoría de los GABA_AR neuronales expresados en el cerebro consisten en dos subunidades α , dos subunidades β y una subunidad γ . El sitio de unión a GABA se encuentra en la interfase entre las subunidades α y β y permite la apertura del canal, permitiendo el flujo de Cl⁻ al interior de la célula. El sitio de unión a BZD se encuentra en la interfase entre la subunidad α (1, 2, 3 o 5) y γ , al activarse se potencia el flujo de Cl⁻ inducido por GABA (Chua y Chebib, 2017) (Boghog2, Public domain, via Wikimedia Commons https://commons.wikimedia.org/wiki/File:NAChR_2BG9.png).

3. β -CCB: modulador de los receptores GABA_A en células del linaje oligodendroglial

Desde el descubrimiento de un sitio de unión específico para las BZD en el GABA_AR neuronal, se promovió investigación que buscaba posibles sustancias endógenas en el cerebro que pudieran interactuar fisiológicamente con él. La nicotinamida, las purinas y algunos péptidos y proteínas son sustancias que interactúan con baja afinidad (Novas *et al.*, 1988). En 1980, Braestrup y colaboradores identificaron una sustancia capaz de interactuar con alta afinidad al sitio de unión de las BZD. La identificaron como un éster del ácido etil β -carbolina-3-carboxílico, hoy conocida como la β -carbolina β -CCE, una sustancia que más tarde mostró ser un artefacto del procedimiento de extracción (Peña *et al.*, 1986; Novas *et al.*, 1988). Poco después, se encontró que otra β -carbolina, la

β -CCB, tenía efectos similares a la β -CCE, pero aseguraban un origen endógeno (Medina *et al.*, 1989). Las β -carbolinas se caracterizan por ser alcaloides indólicos naturales formados de un anillo tricíclico pirido -3, -4 indol. Han sido aisladas de tejidos y fluidos humanos en condiciones fisiológicas y representan una variedad de productos psicoactivos que provocan diversos efectos conductuales dosis-dependiente (Patel *et al.*, 2012). Por ejemplo, se ha demostrado que algunas β -carbolinas inducen una amplia gama de efectos funcionales a menudo atribuibles a la inhibición de la enzima mono amino oxidasa A (MAO-A). Como consecuencia de esta interacción, las propiedades funcionales asociadas con algunas β -carbolinas endógenas pueden atribuirse a la modulación de la noradrenalina, la dopamina y la 5-hidroxitriptamina (5-HT). De hecho, la unión de algunas β -carbolinas al receptor 5-HT 2A está asociada con alucinaciones; sin embargo, entre las β -carbolinas del cerebro, se cree que sólo la pinolina es alucinógena, quizás por su alta afinidad al sitio de recaptación de la 5-HT (Robinson *et al.*, 2003).

Arellano y colaboradores (2016) mostraron que los OLG que se encontraban co-cultivados con neuronas expresaban GABA_AR funcionales. Más tarde, Ordaz y colaboradores (2021) mostraron que el GABA_AR de OLG presentaba un perfil farmacológico distinto al GABA_AR neuronal. Observaron que ante la exposición a diferentes β -carbolinas, los GABA_AR neuronales y oligodendrogiales respondían de manera diferente (Figura 5). Por ejemplo, la administración de β -CCB no producía efectos sobre el receptor neuronal; sin embargo, en el receptor oligodendrogial mostró potenciar la respuesta a GABA hasta en 300 %.

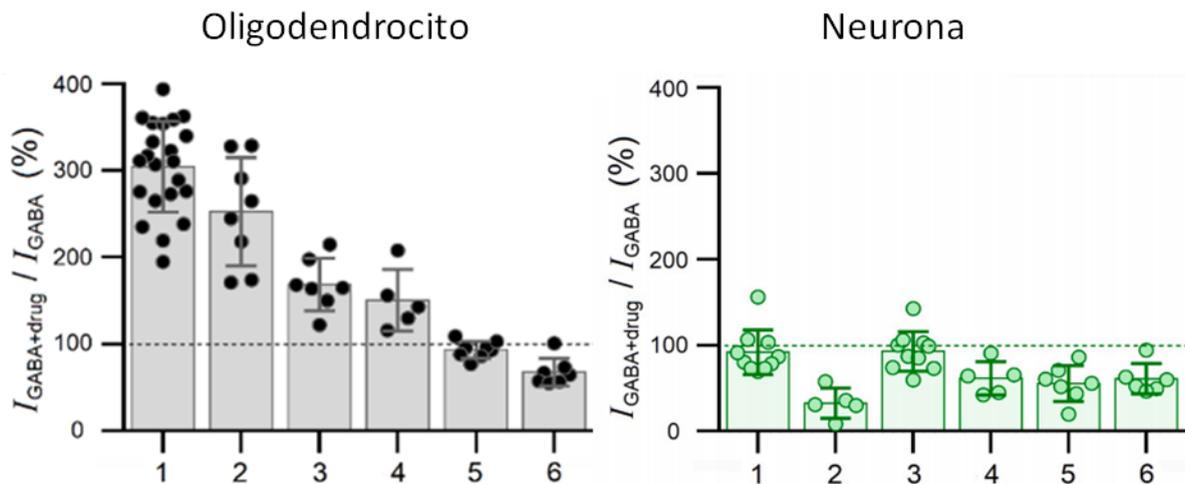


Figura 5. Efecto de distintas β -carbolinas en oligodendrocitos y neuronas en cultivo. Respuesta normalizada de la amplitud de la corriente iónica inducida por GABA (10 μ M) y la aplicación de distintas β -carbolinas: 1. N-butil- β -carbolina-3-carboxilato (β -CCB, 10 μ M); 2. Ácido N-metilamida β -carbolina-3-carboxilato (β -CCA, 10 μ M); 3. Etil- β -carbolina-3-carboxilato (β -CCE, 10 μ M); 4. tert-butil β -carbolina-3-carboxilato (β -CCT, 10 μ M); 5. 3-(hidroximetil)- β -carbolina (β -CHM, 10 μ M) y 6. Éster del ácido metil-4-etil-6,7-dimetoxi-9H-pirido[3,4-b]indole-3-carboxílico (DMCM, 10 μ M). A la izquierda aplicación en oligodendrocitos maduros y a la derecha aplicación en neuronas. Respuesta representada en porcentaje respecto de la respuesta que induce GABA por sí solo (100 %). Experimentos realizados mediante la técnica de patch clamp en configuración de célula completa (adaptado de Ordaz *et al.*, 2021).

Aunque se han estudiado diversos sitios de unión para las β -carbolinas, como el sitio de unión a las BZD en el GABA_AR neuronal y otros sitios en receptores opiáceos y serotoninérgicos, hoy se sabe que la farmacología de estas sustancias es compleja y con gran variedad de interacciones sobre diferentes tejidos en mamíferos. Ordaz y colaboradores (2021) exploraron en cultivos de OLG la respuesta de GABA al aplicar simultáneamente β -CCB y flumazenil, un antagonista competitivo del sitio de unión de BZD. Observaron que el efecto potenciador de la β -CCB no se veía bloqueado por el flumazenil. Lo anterior sugiere un sitio de unión para la β -CCB distinto al de las BZD en OLG.

Tomando en cuenta la importancia de la señalización GABAérgica en el proceso de mielinización y las características de la β -CCB en relación a la modulación selectiva del GABA_AR oligodendroglial, existe interés de investigar los efectos de esta sustancia en el proceso de mielinización en modelos *in vivo*. Cisneros-Mejorado y

colaboradores (2020) probaron el efecto del tratamiento sistémico de β -CCB en ratas adultas a las que se les indujo desmielinización local del pedúnculo cerebeloso caudal por aplicación dirigida de bromuro de etidio. Observaron la recuperación de las intensidades de tinción específica para mielina tras la aplicación de β -CCB en pedúnculos previamente lesionados (Figura 6). Los hallazgos sugieren un efecto pro-mielinizante atribuible a la administración de β -CCB.

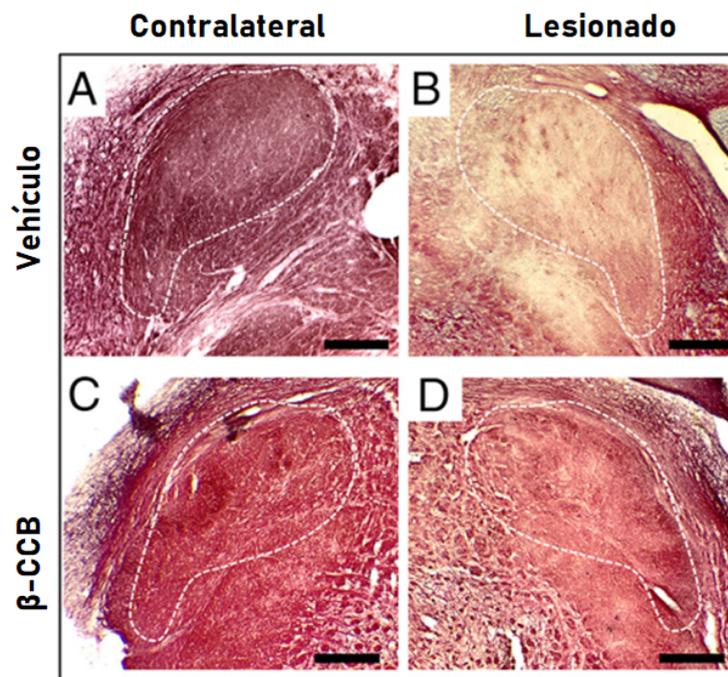


Figura 6. Imágenes de cortes histológicos de pedúnculos cerebelosos caudales donde se visualiza un efecto pro-mielinizante de β -CCB.

Micrografías de secciones coronales de pedúnculos cerebelosos caudales (p.c.c.) (líneas punteadas) teñidas con la tinción específica para mielina black gold II. Las preparaciones corresponden a 35 días post-inyección de bromuro de etidio (BrEt, 2 μ L al 0.05 %) en los p.c.c. lesionados. Los cortes de la izquierda (**A** y **C**) corresponden a los p.c.c. no lesionados, mientras que los cortes de la derecha (**B** y **D**) corresponden a los p.c.c. lesionados. **A** y **B** corresponden a un ratón tratado con vehículo, mientras que **C** y **D** corresponden a un ratón tratado con β -CCB (1 mg / kg i.p.). Nótese en **B** menor grado de tinción en el p.c.c. lesionado en comparación con **A**, lo que indica persistencia de la lesión desmielinizante. Nótese **D** en comparación con **B**, el tratamiento con β -CCB produjo mayor grado de tinción en el p.c.c. previamente lesionado, lo que sugiere un efecto pro-mielinizante. Barras de escala: 500 μ m (adaptado de Cisneros-Mejorado *et al.*, 2020).

4. Cuprizona: un modelo de desmielinización

La desmielinización del SNC ha sido estudiada usando varios modelos, desde animales transgénicos, como modelos de encefalomielitis viral, modelos de hipoxia y otros en los que se usan diversas toxinas que inducen desmielinización. El modelo de desmielinización por ingesta de cuprizona es un ejemplo de estos últimos. La cuprizona es un quelante de cobre que al ser administrado en la dieta de ratones produce desmielinización del SNC (Carlton, 1967). Este modelo ha sido utilizado desde los años 60 y aunque no fue establecido usando ratones C57BL/6, ahora se prefiere esta cepa debido a su uso común en estudios de ratones transgénicos y knock-out, al mismo tiempo que son sensibles a menores dosis de cuprizona. Al alimentar a ratones adultos jóvenes con este quelante de cobre, se produce desmielinización del SNC que se ha relacionado con perturbaciones de los OLG, como se ha probado por la rápida disminución de genes para la MBP y apoptosis (Matsushima y Morell, 2001). Hay reportes que indican que la barrera hematoencefálica permanece intacta ante la intoxicación con cuprizona, sin embargo, se ha observado acumulación de microglía y macrófagos, aumento en el nivel de producción de sustancias proinflamatorias, así como cambios morfológicos de los astrocitos y astrogliosis (Matsushima y Morell, 2001).

El mecanismo de acción exacto por el cual se produce la intoxicación por cuprizona sigue siendo tema de estudio. Varios blancos enzimáticos se han propuesto, por ejemplo, la inhibición de la monoamino-oxidasa, alteraciones en los complejos de la cadena de transporte de electrones y malfuncionamiento de la superóxido dismutasa de cobre y zinc (Acs *et al.*, 2013), cambios que concluyen en la disfunción de las mitocondrias. Ha sido generalmente aceptado que a partir de 3 semanas de tratamiento se producen megamitocondrias debido a los niveles elevados de especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS). A su vez, la formación de megamitocondrias da como resultado una escasez de ATP y aumento de las concentraciones de ROS/RNS que eventualmente promueve estrés del retículo endoplásmico (RE). La combinación de estrés oxidativo

y estrés del RE dan como resultado trastornos en la síntesis de proteínas y lípidos. Los OLG son particularmente sensibles a estos trastornos dado sus altas demandas metabólicas, por lo que las alteraciones conllevan a la desintegración de las vainas de mielina y, en cuestión de semanas, a la apoptosis de los OLG (Praet *et al.*, 2014). En un estudio más reciente, Taraboletti y colaboradores (2017), usaron cromatografía líquida y espectrometría de masa para detectar cambios moleculares y desregulación en las vías metabólicas y encontraron que la intoxicación por cuprizona era capaz de promover el mal funcionamiento de la piridoxal-5-fosfato, una vitamina que funge como coenzima esencial para el metabolismo de algunos aminoácidos. Lo que sugiere otra causa del daño a OLG. Además, el hierro es necesario para las funciones normales del cerebro y su metabolismo está relacionado con la homeostasis del cobre. Pandur y colaboradores (2019) observaron un aumento en la expresión de ferritinas y daño oxidativo inducido por la deposición de hierro en un modelo de cuprizona.

En cuanto al modelo de desmielinización, algunas estrategias en las que se expone a ratones adultos jóvenes de 8 semanas de edad a un tratamiento con 0.2 % cuprizona vía oral durante 6 semanas, han mostrado un grado máximo de desmielinización del cuerpo calloso alrededor de la semana 5 del tratamiento continuo con cuprizona (Matsushima y Morell, 2001). Otros protocolos, sin embargo, han mostrado que un tratamiento con cuprizona durante 3 semanas continuas, seguidas de otras 2 semanas de dieta normal (supresión de cuprizona) promueven el mismo efecto que un tratamiento continuo de 5 semanas (Doan *et al.*, 2013). En ambos esquemas de tratamiento, la disminución de OLG, la acumulación de microglía y el aumento de astrocitos, iniciaban a partir de la semana 3 de tratamiento, observándose el grado máximo de desmielinización en la semana 5 después de haberse iniciado la cuprizona.

Una gran ventaja de este modelo es que ha sido ideal para estudiar fenómenos de remielinización, ya que tras suspender el tratamiento se ha descrito remielinización espontánea. Algunos protocolos han descrito que la remielinización máxima ocurre entre la semana 6 y 7 a partir del inicio del tratamiento con cuprizona (Stidworthy *et*

al., 2003) (Figura 7). De hecho, Doan y colaboradores (2013) mostraron que la remielinización del cuerpo calloso que se produce a la semana 7 no era diferente entre los grupos que fueron tratados con cuprizona durante 3 semanas y posteriormente alimentados con dieta normal por 4 semanas en comparación con aquellos ratones tratados con cuprizona durante 6 semanas y una semana de dieta normal. Con estas observaciones, se sugiere que una vez que los OLG son afectados durante las primeras 3 semanas de tratamiento con cuprizona, la progresión a la desmielinización máxima para la semana 5 no requiere de mayor exposición al tratamiento; además, de acuerdo con sus hallazgos, la suspensión temprana de cuprizona no promueve la remielinización más tempranamente.

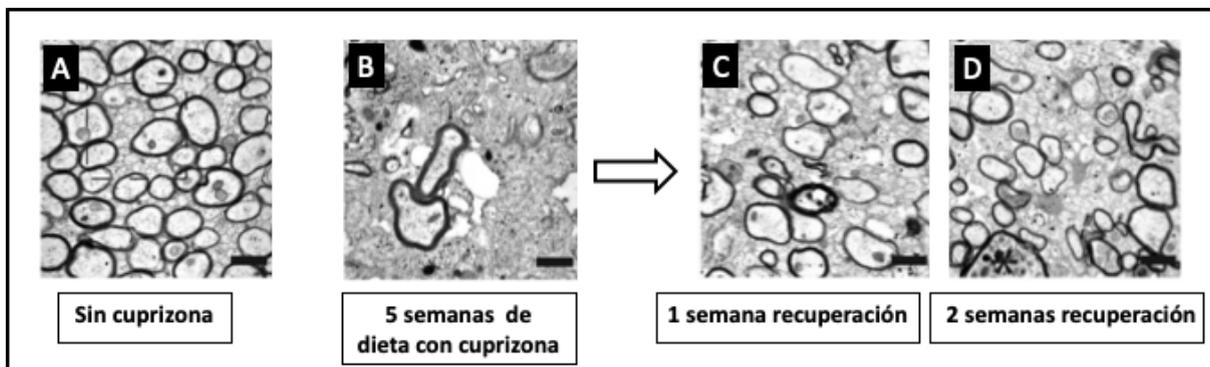


Figura 7. Micrografías de axones del cuerpo calloso de ratones a los que se les indujo desmielinización con cuprizona.

Micrografías tomadas a través de microscopía electrónica de transmisión. **A** Ratón control. **B** Ratón tratado con cuprizona al 0.2 % durante 5 semanas. **C** Ratón tratado con cuprizona al 0.2 % durante 5 semanas y una semana de suspensión de cuprizona. **D** Ratón tratado con cuprizona al 0.2 % durante 5 semanas y dos semanas de suspensión de cuprizona. Barra de calibración = 1 μ m (adaptado de Stidworthy *et al.*, 2003).

4.1 Imágenes de resonancia magnética permiten evaluar el estado de la mielina durante la desmielinización por cuprizona

En las últimas décadas, la resonancia magnética se ha empleado para evaluar y monitorear la actividad de enfermedades inflamatorias desmielinizantes del SNC. Brück y colaboradores (1997) correlacionaron casos de desmielinización del SNC comprobada por biopsia con resultados de imágenes por resonancia magnética pesadas al contraste T2. Las lesiones activas tempranas se observaron

con un borde hipointenso (más oscuro) en comparación con el centro de la lesión, mientras que las lesiones tardías se observaron como hiperintensidades (más brillantes).

Además, desde su introducción a principios de la década de 1990, la imagenología por resonancia magnética pesada a difusión (dMRI) ha sido un método sobresaliente para evaluar de forma no invasiva la microestructura de tejidos cerebrales *in vivo*. El principio de esta técnica está basado en la difusión de las moléculas de agua. La difusión del agua en un espacio ilimitado es isotrópica o aleatoria; sin embargo, si el espacio presenta barreras, como en tejidos biológicos, el movimiento de las moléculas de agua se restringe dependiendo de las paredes de la estructura en la que se encuentren. Entre más restringido esté el movimiento aleatorio, aumenta la anisotropía y disminuye la isotropía de la difusión. En efecto, el perfil de desplazamiento de las moléculas de agua en la microestructura del tejido cerebral presenta una dirección particular según el estado del tejido y la difusión puede ser sondeada usando resonancia magnética. Es decir, se relaciona la señal en la presencia de la sensibilización a difusión con la señal de una imagen por lo demás idéntica, pero sin sensibilización a difusión. De esta manera se proporciona una medida cuantitativa del proceso de difusión en una dimensión. Repitiendo el experimento varias veces, se puede mostrar el comportamiento de la difusión en 3 dimensiones y así es posible usar modelos matemáticos para reconstruir el perfil de difusión pixel por pixel (o voxel, en 3 dimensiones). Las mediciones de difusión proporcionan información sobre características promedio del tejido contenido en ese espacio (Sufiría y Martínez, 2007; Concha, 2014).

Para reconstruir el perfil de difusión se ha utilizado comúnmente el modelo del tensor (DTI), que se basa en generar una matriz a partir de la serie de imágenes pesadas a difusión. Posteriormente, se calculan para cada voxel tres valores propios o difusividades (λ_1 , λ_2 y λ_3) mediante la diagonalización de la matriz con respecto a vectores base de un marco de referencia. El valor mayor resultante de la diagonalización y su vector correspondiente (λ_1) indican la dirección principal de difusión dentro del voxel. En la sustancia blanca del SNC, este valor se ha

interpretado como la difusividad del agua paralela a las fibras axonales; se denomina difusividad axial ($\lambda_{||}$) y se ha correlacionado con daño axonal. Así mismo, los valores y vectores restantes se han interpretado como las difusividades del agua perpendiculares a las fibras axonales (λ_2 y λ_3) y al promediarse se denominan difusividad radial ($\lambda_{\perp} = (\lambda_2 + \lambda_3) / 2$) y se ha correlacionado con la integridad de la mielina, el diámetro y la densidad axonal, así como con la coherencia de las fibras axonales. (Song *et al.*, 2003, 2005; Sun *et al.*, 2006; Concha, 2014). La visualización geométrica de las direcciones principales de difusión se hace mediante elipsoides donde los vectores y valores propios definen su orientación y longitud, respectivamente. La difusión isotrópica se representa como una esfera (Figura 8 A-B), mientras que la difusión anisotrópica se representa como un cilindro (Figura 8 C-D).

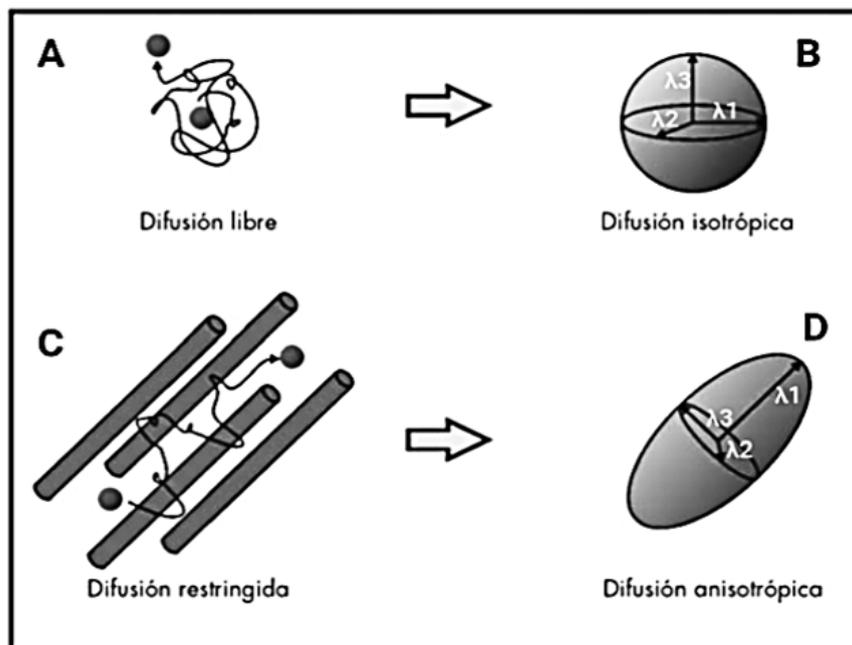


Figura 8. Ejemplificación de la difusión de las moléculas de agua y su esquematización en elipsoides.

En difusión libre (A) el camino recorrido por una molécula puede ser largo, pero su desplazamiento al cabo de un tiempo es poco (B). Los ejes de dispersión forman una esfera. Si existen barreras en el camino (C), el recorrido estará restringido por la geometría del tejido. En estos casos se habla de difusión anisotrópica y su representación de dispersión forma un elipsoide con un eje dominante (D) (Adaptado de Zufiría y Martínez, 2007).

Además, DTI permite calcular índices como la fracción de anisotropía (FA), que representa la cantidad de asimetría de difusión en un voxel. El valor de FA varía entre 0 y 1. Para una difusión isotrópica perfecta la $FA = 0$. Con anisotropía progresiva la $FA \rightarrow 1$. La sustancia gris, al estar altamente organizada, produce perfiles de difusión anisotrópicos (Sufiría y Martínez, 2007).

Song y colaboradores (2005) han explorado parámetros derivados del DTI para caracterizar la progresión de la desmielinización y remielinización en el cuerpo calloso de ratones usando el modelo de cuprizona. Reportaron un aumento de λ_{\perp} que correlaciona proporcionalmente con la gravedad de la desmielinización en el cuerpo calloso y también demostraron una correlación entre la disminución de λ_{\perp} y la progresión de la remielinización.

Cisneros-Mejorado y colaboradores (2020), encontraron hallazgos similares usando un modelo de desmielinización local por inyección de bromuro de etidio en el pedúnculo cerebeloso caudal. Observaron un aumento en λ_{\perp} en los pedúnculos lesionados. Al explorar la FA encontraron mayor isotropía en el pedúnculo lesionado en comparación con un pedúnculo sin intervención desmielinizante. En cuanto a la λ_{\parallel} , no encontraron alteraciones.

Durante mucho tiempo, el grado de mielinización de algunas estructuras como el cuerpo calloso podía ser medido sólo con técnicas invasivas como preparaciones histológicas. La dMRI y DTI son herramientas que han permitido estudiar de manera no invasiva la integridad de la mielina (Song *et al.*, 2003, 2005; Sun *et al.*, 2006).

4.2 Cambios conductuales en ratones tratados con cuprizona

Las vibrisas que presentan algunos mamíferos como las ratas y los ratones, les ayudan para orientarse espacialmente. Esto se puede observar como la preferencia de caminar en la periferia de una habitación, ya que de esta manera las vibrisas tienen contacto con las paredes. La prueba de campo abierto consiste en la

observación de la actividad locomotora, que se determina por la distancia total recorrida durante cierto tiempo; y la actividad exploratoria, que se interpreta a partir del trayecto recorrido entre el centro y la periferia del piso de la caja en cierto tiempo. Misslin y Cigrang (1986) describieron que la confrontación a un ambiente nuevo es normalmente estresante para los ratones y produce una conducta relacionada con ansiedad, lo que algunos autores han interpretado como la persistencia de mantenerse en la periferia de la caja durante la prueba de campo abierto. Por otro lado, el aumento de la distancia recorrida y del tiempo que pasan los ratones en el área central, así como la disminución de la latencia para pasar por el centro de la caja, se han interpretado como parámetros de una conducta ansiolítica, como la producida por algunos fármacos como las BZD (Misslin y Cigrang, 1986; Prut y Belzung, 2003).

Xiao y colaboradores (2008) reportaron comportamientos anormales como hiperlocomoción en ratones tratados con cuprizona. Makinodan y colaboradores (2009) emplearon el modelo de cuprizona y encontraron que, en etapas tempranas de desmielinización, los ratones presentaban menor conducta de exploración y se mantenían en la periferia.

Wang y colaboradores (2013) usaron el modelo de desmielinización por cuprizona en ratones de la cepa C57BL/6 y evaluaron diferencias conductuales en ratones que iniciaron el tratamiento a las 3 semanas, 6 semanas y 8 meses de edad. Usando la prueba de campo abierto encontraron que, independientemente de la edad de inicio del tratamiento, los ratones presentaron reducción en la actividad exploratoria. Sin embargo, la actividad locomotora no cambió, es decir, la distancia recorrida no se vio alterada.

La disminución de la actividad exploratoria, es decir, menos distancia y menos tiempo recorrido en centro de la caja es un resultado consistente en el modelo de cuprizona; sin embargo, la actividad locomotora o la distancia total recorrida durante la prueba no parece ser concluyente, algunos estudios muestran un mayor trayecto y otros estudios no reportan cambios (Xiao *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2013).

Por su parte, Novas y colaboradores (1988) usaron la prueba de campo abierto y describieron disminución de la actividad exploratoria dosis-dependiente (de 1 a 30 mg/kg, es decir, dosis bajas a moderadas) en ratones adultos de la cepa A₂G tratados con β -CCB.

La prueba de campo abierto es sencilla de aplicar y permite obtener información sobre la conducta exploratoria y locomotora en situaciones fisiológicas o como consecuencia de algún tratamiento (Prut y Belzung, 2003).

III. Planteamiento del problema

La esclerosis múltiple (EM) es la patología inflamatoria desmielinizante del SNC más común y afecta aproximadamente a 35.9 personas por cada 100,000 habitantes (Walton *et al.*, 2020). A la fecha, se han empleado estrategias terapéuticas como los corticoesteroides y la plasmaféresis para aminorar la inflamación durante las recaídas. Otros fármacos para ralentizar el curso de la enfermedad son los inmunomoduladores con INF- β , el acetato de glatimer, fármacos inmunosupresores y anticuerpos monoclonales; todos ellos actúan sobre las células de la inmunidad (Melzer y Meuth, 2014). Sin embargo, las terapias dirigidas a la modulación de los OLG para estimular la remielinización aún no han sido profundamente exploradas. Aunque los inmunosupresores han ofrecido grandes avances en el manejo de la EM, explorar otros blancos terapéuticos como las células gliales, particularmente los OLG, podría ayudar a modificar y ralentizar el curso de esta enfermedad para mejorar el pronóstico de los pacientes. Conocer si β -CCB promueve la remielinización en un modelo murino de desmielinización sistémica del SNC en la etapa adulta, proveerá evidencia sobre la eficacia de esta sustancia en la potenciación selectiva de los GABA_AR oligodendrogiales *in vivo* y la importancia de la potenciación de estos receptores para el proceso de remielinización en etapas adultas.

IV. Pregunta de investigación

Usando el modelo de desmielinización por cuprizona, ¿será posible hacer más eficaz el proceso de remielinización al aplicar un potenciador de GABA_AR oligodendrogial como la β -CCB?

V. Hipótesis

La administración sistémica de β -CCB producirá un efecto promielinizante en el cuerpo calloso en ratones previamente desmielinizados por cuprizona.

VI. Objetivos

Evaluar el efecto de β -CCB durante el proceso de remielinización en un modelo murino de desmielinización por cuprizona.

1. Examinar mediante histología específica para mielina (tinción BGII) el grado de mielinización del cuerpo calloso después de la administración de cuprizona y posterior a la administración de β -CCB 1 mg/kg i.p. en ratones previamente desmielinizados por ingesta de cuprizona.
2. Monitorear *in vivo* las métricas del tensor de difusión (DTI) en el cuerpo calloso y cuantificar y analizar aquellas que se han correlacionado con alteraciones de la mielina durante la desmielinización, la remielinización espontánea y la remielinización con administración de β -CCB 1 mg/kg i.p. en ratones previamente desmielinizados por ingesta de cuprizona.
3. Explorar la conducta mediante la prueba de campo abierto durante la desmielinización, la remielinización espontánea y la remielinización con administración de β -CCB 1 mg/kg i.p. en ratones previamente desmielinizados por ingesta de cuprizona.

VII. Metodología

1. Procedimientos con animales

Todos los experimentos (administración de fármacos, obtención de imágenes, pruebas de conducta e histología) fueron realizados con autorización del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales en Experimentación (CICUAL) del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México (INB/UNAM). Los experimentos *in vivo* se realizaron con ratones de la cepa C57BL/6 y se trataron de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Se hicieron esfuerzos para cumplir los estándares de las 3 Rs de Russell y Burch (Russell y Burch, 1959): Reemplazar, Reducir y Refinar (Respetar) para minimizar el sufrimiento animal.

2. Modelo de desmielinización-remielinización por cuprizona

Ratones macho de la cepa C57BL/6 de 7 semanas de edad se agruparon aleatoriamente en grupos de 4 - 5 ratones por caja y se mantuvieron en condiciones estándar de laboratorio en las instalaciones del bioterio del INB-UNAM con alimento y agua a voluntad.

A las 8 semanas de edad los ratones se sometieron a una dieta a base de pellets preparados con 0.3 % de cuprizona, la cual se mantuvo durante 3 semanas. Posteriormente, se suspendió la cuprizona y se restableció una dieta con pellets estándar (Figura 9).

En experimentos destinados a probar el efecto de β -CCB, los ratones fueron tratados diariamente con β -CCB 1 mg/kg i.p. en un volumen de 10 ml/kg usando como vehículo dimetilsulfóxido (DMSO). El tratamiento se inició después de 3

semanas de haberse suspendido el tratamiento con cuprizona y la administración se mantuvo durante 1.5 y 3 semanas (Figura 9).

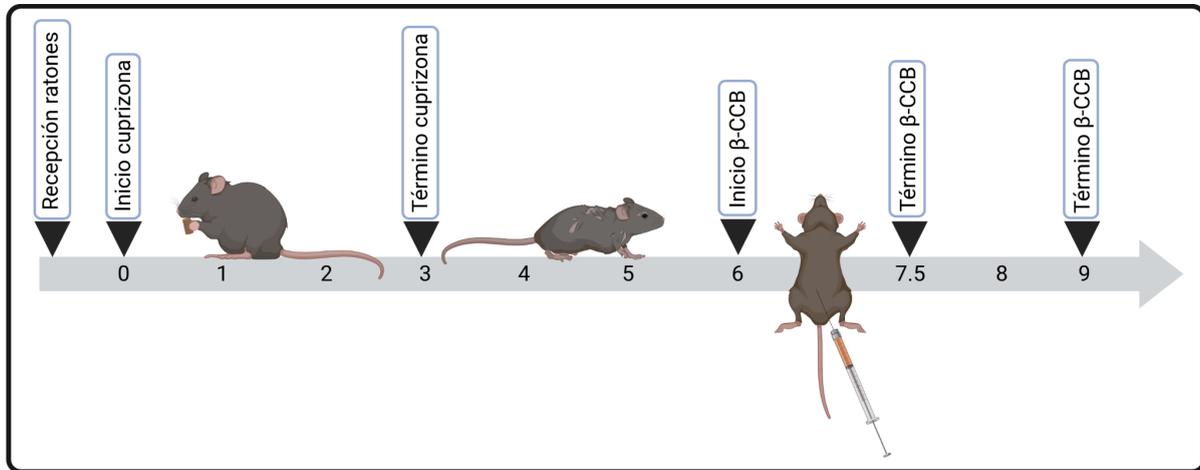


Figura 9. Orden de períodos donde se administró y suspendió la cuprizona y en donde se administró β-CCB.

Ratones macho de la cepa C57BL/6 de 7 semanas de edad fueron agrupados aleatoriamente. A las 8 semanas de edad se inició el tratamiento vía oral con cuprizona al 0.3% y se administró por 3 semanas consecutivas. Después, se restableció la dieta a pellets estándar. 3 semanas de suspendido el tratamiento con cuprizona, se inició la administración de β-CCB vía intraperitoneal. La numeración de las semanas se define a partir del inicio del tratamiento con cuprizona (Creado con BioRender.com).

3. BGII, histología para mielina

Los análisis longitudinales histológicos se realizaron en distintas etapas:

- Al término del tratamiento con cuprizona.
- Después de 3 semanas de suspendido el tratamiento con cuprizona.
- Después de 1.5 y 3 semanas de tratamiento con β-CCB (Figura 10).

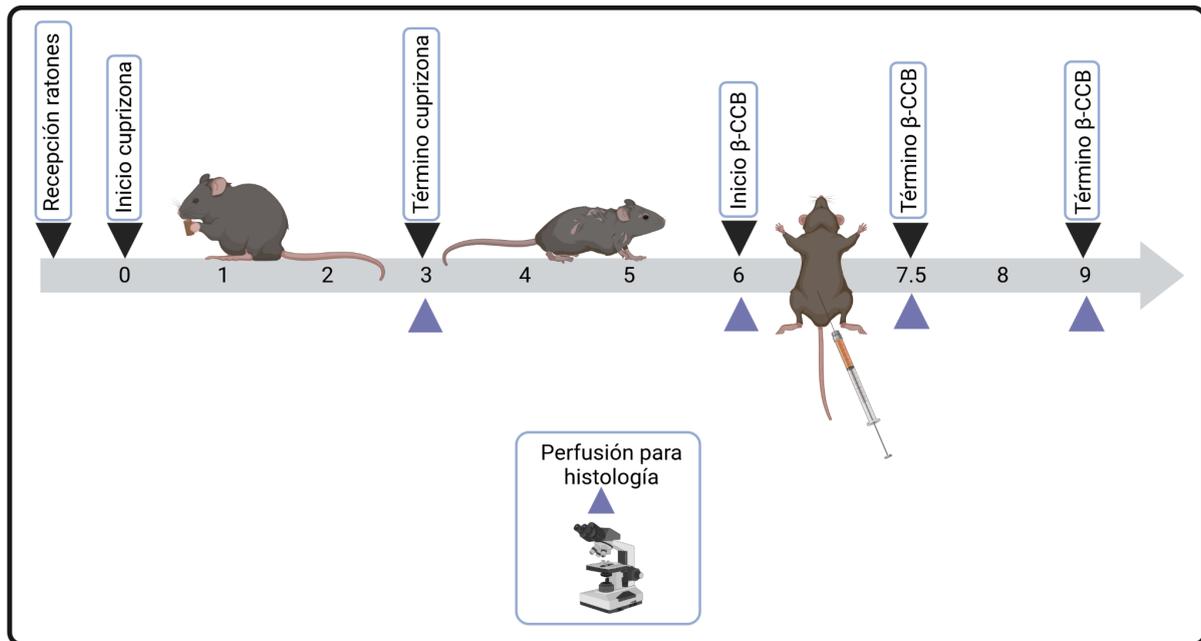


Figura 10. Orden de períodos donde se realizaron perfusiones de ratones para las histologías.

En flechas moradas se indican los períodos en los que se evaluó la des-remielinización por histología. La numeración de las semanas se define a partir del inicio del tratamiento con cuprizona (Creado con BioRender.com).

Para ello, los ratones fueron sacrificados con dosis única de pentobarbital (100 mg/kg vía i.p.) y perfundidos con buffer fosfato salino (PBS) y paraformaldehído (PFA 4 %). Tras la perfusión, se disecaron los cerebros y se mantuvieron en PFA al 4 % durante 24 h. Posteriormente, el tejido estuvo inmerso en un gradiente de sacarosa (10-30 %) a -4 °C por 24-48 horas y después fue cortado en el criostato con técnica de criosección. Se hicieron cortes coronales de tejido cerebral con grosor de 40 μ m y se montaron en portaobjetos electrocargados para resguardarse hasta su tinción con BGII (EMD, Millipore Corp., Billerica, MA, EUA).

Para teñir los cortes, estos primero fueron rehidratados en una solución de cloruro de sodio (NaCl 0.9 %) durante 2 minutos a 25 °C. Después, se retiró el exceso de NaCl y los cortes se impregnaron en una solución con tinción BGII (0.3 %, disuelto en 0.9 % NaCl) a 60-65 °C durante 15-20 min. Enseguida, se lavaron los cortes por 2 minutos en NaCl (0.9 %) y se transfirieron a una solución con sodio tiosulfato (1 %) por 3 minutos a 60-65 °C y posteriormente se lavaron dos veces en NaCl (0.9 %) durante 2 minutos cada lavado (modificado de Schmued *et al.*, 2008). Finalmente,

los portaobjetos se sellaron con medio de montaje DPX y cubreobjetos.

Las micrografías se adquirieron en un microscopio óptico de luz Leica a 10X para los análisis y a 4X para las reconstrucciones cualitativas.

Usando el software ImageJ (versión 1.52g, <https://imagej.nih.gov/ij/>) se delimitaron regiones de interés del cuerpo caloso y se analizó la intensidad óptica de la tinción promedio de las áreas seleccionadas mediante la siguiente fórmula:

$$(IF-IROI)/IF$$

en donde IF es el promedio de 3 mediciones de la intensidad del fondo (áreas sin tejido) e IROI es la intensidad promedio de 3 secciones (sección medial y secciones completas) del cuerpo caloso, la región de interés (Hakkarainen *et al.*, 2016; Cisneros-Mejorado *et al.*, 2020).

4. Imagenología por resonancia magnética

En el Laboratorio Nacional de Imagenología por Resonancia Magnética (LANIREM) del INB/UNAM, se adquirieron imágenes de resonancia magnética pesadas al contraste T2 y a difusión en diferentes tiempos:

- Previo inicio del tratamiento con cuprizona.
- 1, 2 y 3 semanas a partir de iniciado el tratamiento con cuprizona.
- 1, 2 y 3 semanas a partir de suspendido el tratamiento con cuprizona (Figura 11).

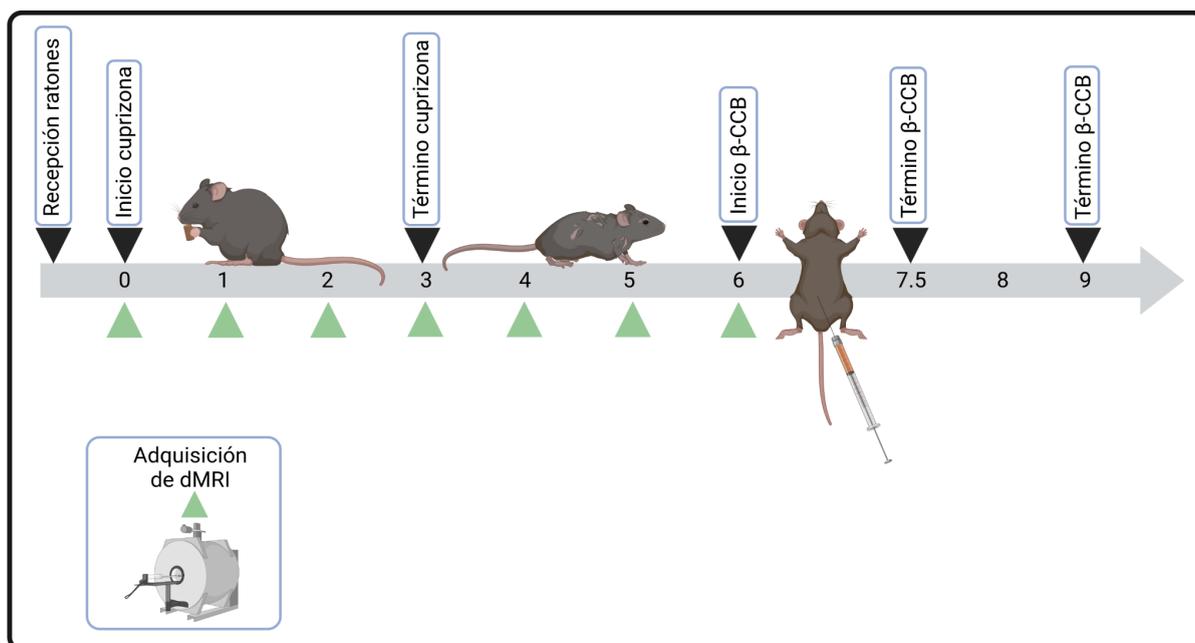


Figura 11. Orden de períodos donde se adquirieron IRM

En flechas verdes se indican los períodos en los que se adquirieron IRM. La numeración de las semanas se define a partir del inicio del tratamiento con cuprizona (Creado con BioRender.com).

Para ello, los animales se anestesiaron con isoflurano (2 %, en aire comprimido) en una cámara anestésica y se mantuvieron con flujo de 0.5-0.8 % durante la adquisición en el resonador para pequeñas especies Bruker de 7 T (Bruker Pharmascan 70/16US). Las imágenes T2 fueron adquiridas usando una secuencia *spin-echo, single-shot, echo-planar* con grosor de rebanada de 0.5 mm, interespaciado de 0.15 mm, FOV = 20 x 16 mm, Tamaño de la imagen = 256 x 256, TR = 3 s, TE = 33 ms y tiempo total de escaneo de 4 minutos con 48 segundos. Los parámetros de adquisición para las imágenes pesadas a difusión fueron: grosor de rebanada = 0.65 mm, sin interespaciado, FOV = 20 x 20 mm, tamaño de la imagen = 150 x 150 mm, 40 direcciones de difusión, $b = 650 \text{ s/mm}^2$, 1 promedio, 30 rebanadas, TR = 2.1 s, TE = 23.4 ms y el tiempo total de escaneo de 17 minutos. Utilizando el software MRtrix3 (Tournier *et al.*, 2019), se pre-procesaron las imágenes pesadas a difusión para disminuir artefactos de la adquisición. Después, con orientación en el atlas paxinos de ratón (Paxinos y Franklin, 2019), se delimitaron manualmente, rebanada por rebanada en cortes coronales, regiones de

interés representativas del cuerpo calloso en cada uno de los cerebros en cada uno de los ratones en cada etapa de adquisición. Finalmente, usando la máscara del cuerpo calloso, se obtuvieron mapas cuantitativos de la fracción de fracción de anisotropía (FA) y de difusividad radial (λ_{\perp}) para después agrupar los datos y analizarlos.

5. Prueba conductual de campo abierto

Las pruebas conductuales se realizaron en la Unidad de Análisis Conductual del INB/UNAM en diferentes períodos:

- Previo inicio del tratamiento con cuprizona.
- Al término del tratamiento con cuprizona.
- Previo inicio del tratamiento con β -CCB.
- Tras 2 semanas de tratamiento con β -CCB (Figura 12).

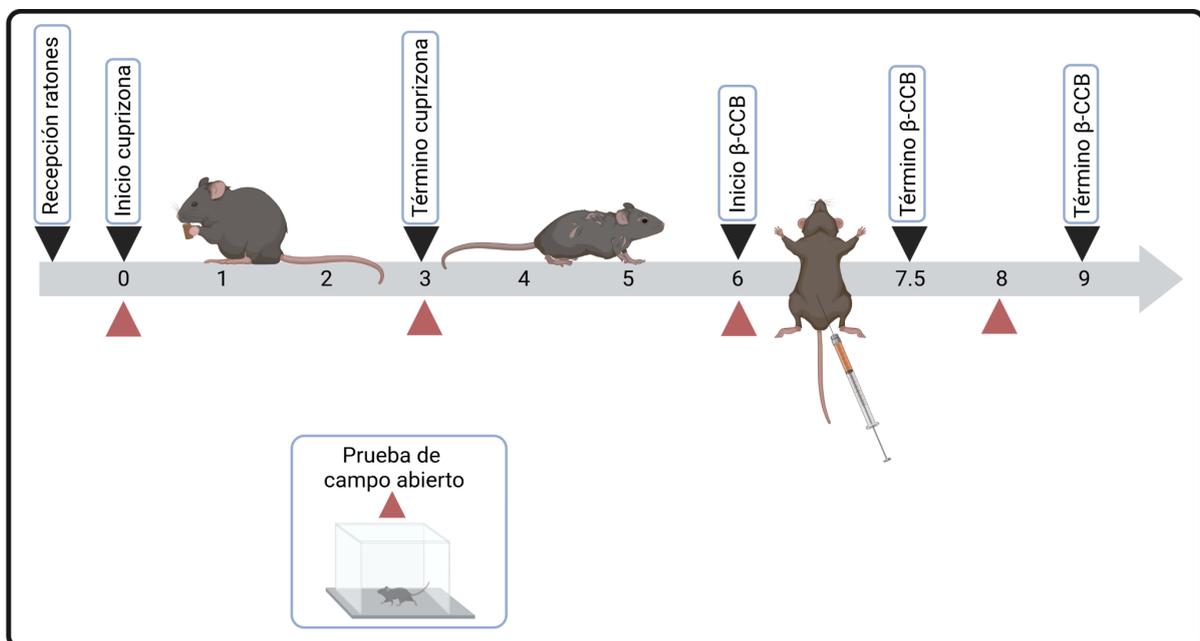


Figura 12. Orden de períodos donde se realizaron pruebas conductuales en el campo abierto.

En flechas rojas se indican los períodos en los que se realizó la prueba de campo abierto. La numeración de las semanas se define a partir del inicio del tratamiento con cuprizona (Creado con BioRender.com).

Para ello, los ratones se transportaron al cuarto de experimentación y se les permitió aclimatarse durante 30 minutos antes de iniciar la prueba. Previa a la colocación de los ratones en el área de campo abierto, se limpió el interior de las cajas con alcohol al 70 % y sanitas. La prueba se inició al colocar a los ratones en el centro del piso de la caja de campo abierto y concluyó después de permitirles libre exploración durante 15 minutos. Al terminar la prueba, los ratones fueron colocados de vuelta a sus cajas habituales. Usando el software Fusion (Omnitech Electronics, Inc.) se extrajeron las métricas de la distancia total recorrida y la distancia recorrida en el centro del campo (área central de 4 x 4 cm), medidas que permiten evaluar la locomoción y actividad exploratoria.

En la figura 13 se resumen los períodos en los que se usaron las diferentes técnicas para evaluar la mielinización y la conducta en el modelo de cuprizona.

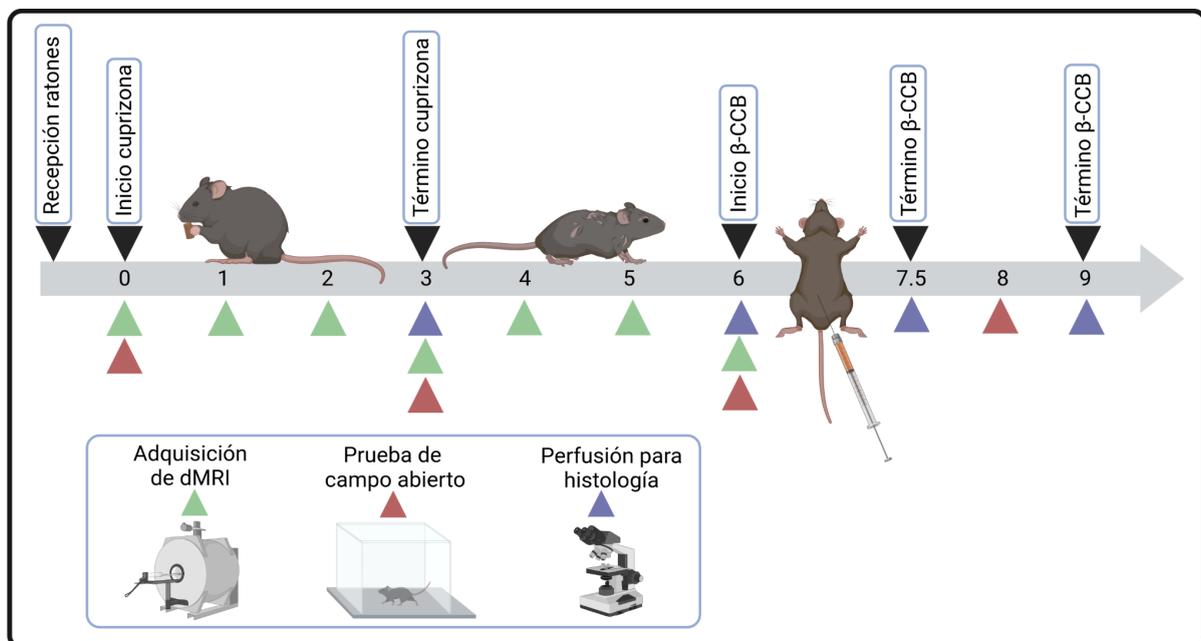


Figura 13. Orden de períodos donde se realizaron las distintas metodologías.

En flechas moradas se indican los períodos en los que se evaluó la des-remielinización por medio de histología. En flechas verdes se indican los períodos en los que se evaluó la desmielinización por medio de imagenología por resonancia magnética. En flechas rojas se indican los períodos en los que se evaluó la conducta exploratoria por medio de la prueba de campo abierto. La numeración de las semanas se define a partir del inicio del tratamiento con cuprizona (Creado con BioRender.com).

6. Análisis Estadístico

Los datos se describen como media \pm D.E. Las medias de dos grupos se compararon usando la prueba t de Student. En el caso de comparar medias de 3 grupos se realizó un análisis de varianza (ANOVA de una vía). En el caso de los parámetros del tensor de difusión, se usaron análisis de modelos mixtos para comparar grupos con observaciones no equilibradas en las diferentes etapas de escaneo. Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron en R versión 4.1.0 (R Core Team, 2021) y se usó el paquete ggplot2 versión 3.3.3 (Wickham, 2016) para la realización de las gráficas. Complementariamente se usó el software Origin8 (<https://www.originlab.com/>).

VIII. Resultados

1. Período de desmielinización

En este apartado se describirán los resultados obtenidos en diferentes puntos temporales antes y durante el proceso de desmielinización, haciendo énfasis en el punto previo al tratamiento con cuprizona, tras 3 semanas de tratamiento con cuprizona y a partir de 6 semanas del inicio del tratamiento con cuprizona.

1.1 Evaluación histológica del proceso de desmielinización

1.1.1 Evaluación histológica en la intoxicación aguda por cuprizona

Tras la administración de cuprizona durante 3 semanas, se evaluó el grado de desmielinización usando como referencia la intensidad de la tinción específica para mielina BGII. Para ello, se tiñeron algunos cortes de la porción anterior del cerebro, en donde se observa el cuerpo calloso a la altura del caudado putamen, correspondientes a Bregma 0.98 mm aproximadamente; y cortes de cerebro más posterior, donde se encuentra el cuerpo calloso a la altura del hipocampo, correspondiente a Bregma -1.94 mm aproximadamente (Figura 14).

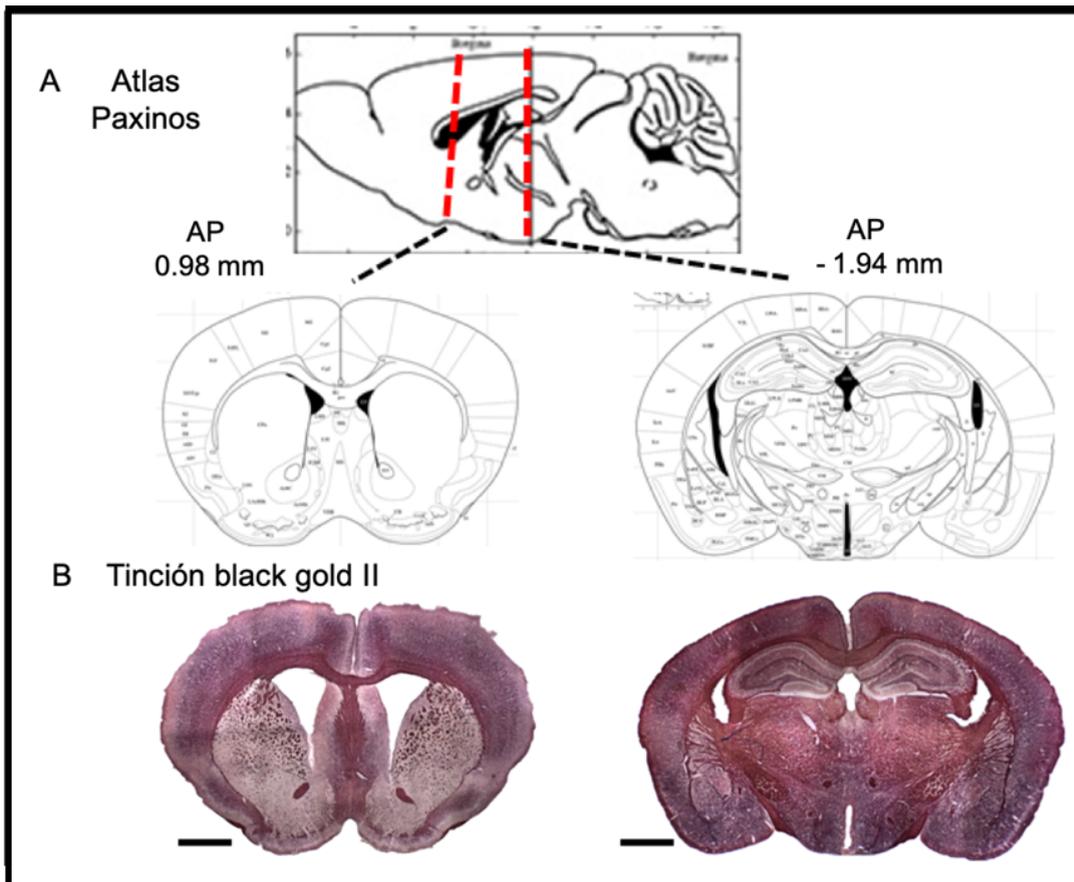


Figura 14. Ubicación anatómica antero-posterior de los cortes estudiados.

A Cortes coronales del cuerpo calloso usados como referencia del atlas paxinos.

B Composiciones panorámicas de micrografías de cortes coronales teñidos con BGII capturadas a 4X. Barra de escala: 1 mm.

Para analizar la intensidad de tinción con BGII, se capturaron imágenes amplificadas a 10X del área central del cuerpo calloso en ambas regiones, anterior y posterior. En la Figura 15 se muestran algunos cortes representativos de la porción posterior de animales control y animales tratados con cuprizona durante 3 semanas consecutivas (Figura 15-B 4-6).

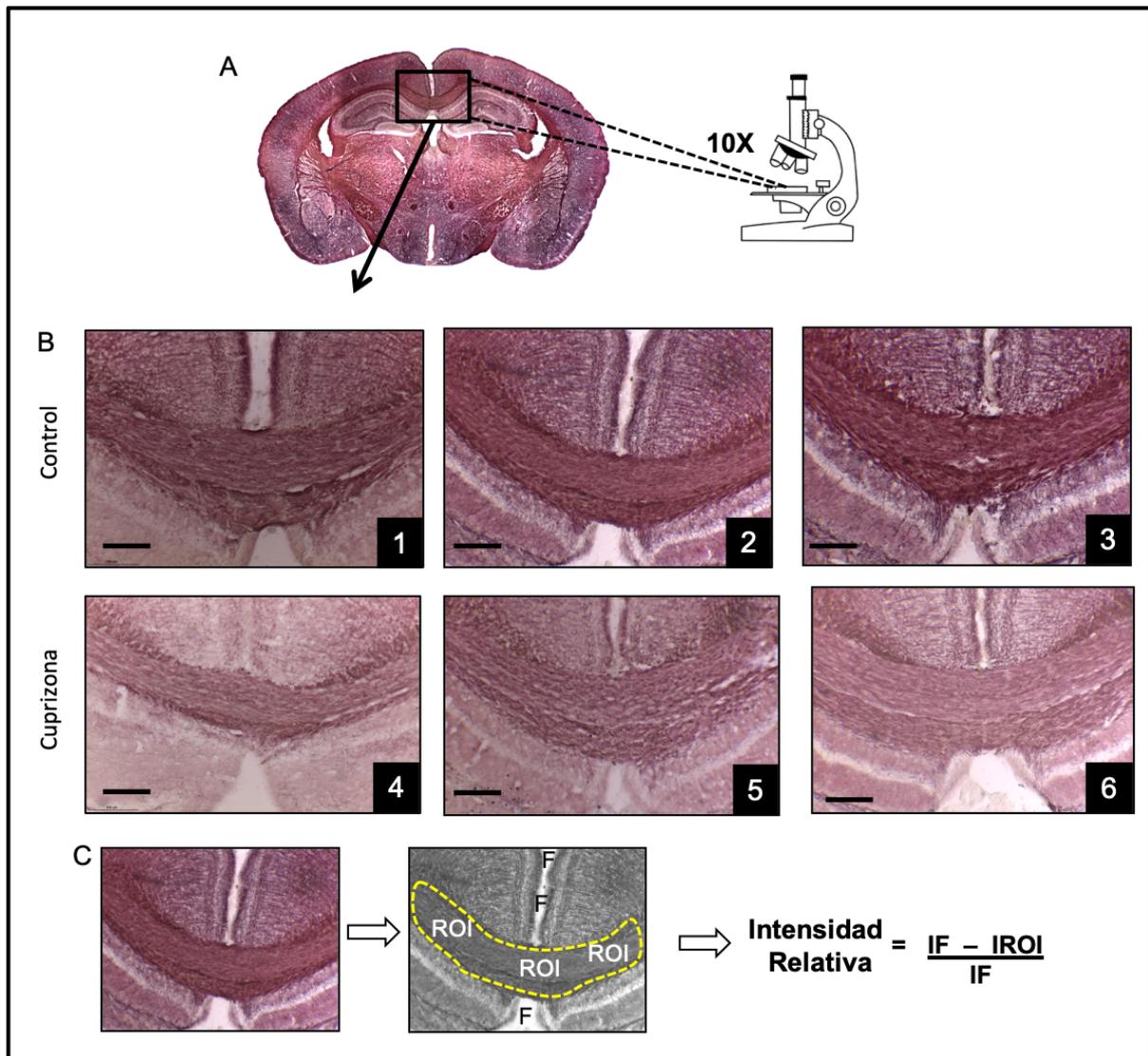


Figura 15. Porciones posteriores del cuerpo calloso tras 3 semanas de tratamiento con cuprizona y ejemplificación de la normalización de la región de interés.

A Muestra una composición panorámica de un corte coronal de cuerpo calloso en porción posterior, correspondiente a la coordenada Bregma -1.94 mm aproximadamente y que muestra el nivel aproximado de captura de fotografías para análisis. **B** Micrografías capturadas a 10X de cortes coronales del cuerpo calloso en porciones posteriores. Se muestran imágenes de tres animales como ejemplo por grupo (Control 1-3; Cuprizona 4-6). **C** Procedimiento del análisis de las imágenes: las imágenes adquiridas son convertidas a escala de grises. Se compara la intensidad entre la región de interés y la intensidad del fondo (intensidad relativa) usando la fórmula: $(IF - IROI) / IF$ donde IF es el promedio de 3 mediciones de la intensidad del fondo (áreas sin tejido) e IROI es la región de interés correspondiente a la intensidad promedio de 3 zonas del cuerpo calloso (línea amarilla punteada). Barra de escala: 200 μ m.

Para cuantificar estas imágenes, se calculó la intensidad relativa del grado de tinción de los distintos cortes, como se indica en la sección de metodología (Figura

15-C). No se encontró diferencia significativa en los cortes evaluados de la porción anterior del cuerpo caloso (Control 0.606 ± 0.09 , Cuprizona 0.576 ± 0.09 , $t = 0.461$, $p = 0.327$) (Figura 16-B). Se encontró disminución del 13.37 % en la intensidad relativa de tinción en la región posterior del cuerpo caloso en aquellos ratones tratados (Control 0.658 ± 0.06 , Cuprizona 0.57 ± 0.06 , $t = 2.014$, $p = 0.045$) (Figura 16-B).

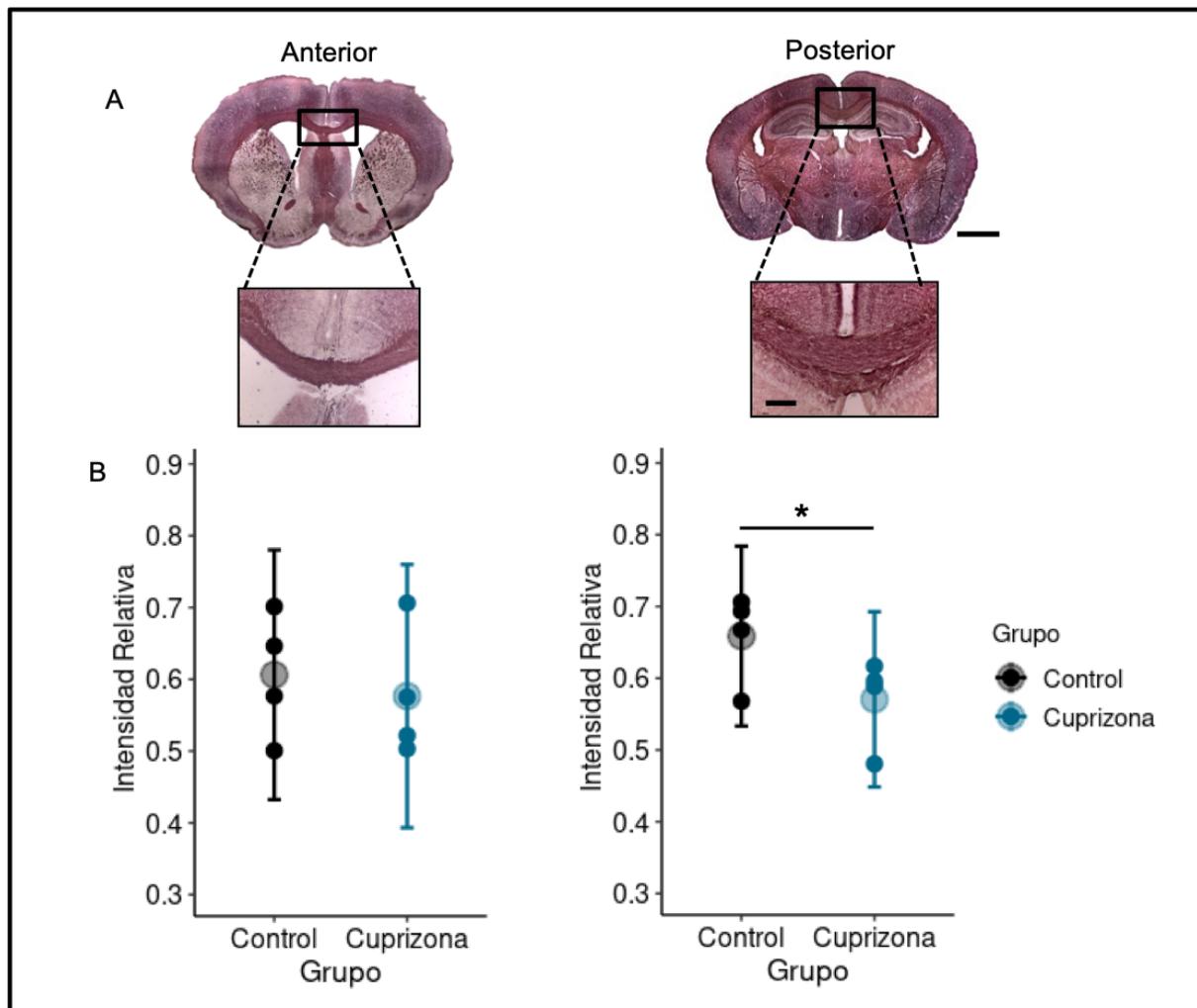


Figura 16. Diferencias entre grupos control y cuprizona en cortes de porciones anteriores y posteriores del cuerpo caloso tras 3 semanas de tratamiento con cuprizona.

A Composiciones panorámicas de micrografías de cortes coronales de la porción anterior (izquierda) y de la porción posterior (derecha) del cuerpo caloso. Ampliación de la región de interés para el análisis cuantitativo. **B** Grado de intensidad relativa de tinción en imágenes histológicas de cortes anteriores y posteriores. Gráfica de dispersión intensidad relativa vs grupo. Observaciones en puntos rellenos, promedios en puntos difuminados, barra de desviación estándar. * $P < 0.05$ ($n = 4$ en grupo Control, $n = 4$ en grupo Cuprizona). Barras de escalas: 1 mm en micrografía reconstruida y 200 μm en micrografías de 10X.

1.1.2 Evaluación histológica del grado de desmielinización después de la suspensión de cuprizona

Después de la evaluación de la desmielinización ocasionada por la ingesta de cuprizona durante 3 semanas, se exploró el grado de mielinización en cortes de la porción posterior del cuerpo calloso a 6 semanas de iniciado el tratamiento, es decir, 3 semanas de tratamiento con cuprizona y 3 semanas de dieta estándar. Se encontró que permanece el grado de desmielinización en cortes de la porción posterior (Figura 17), la intensidad relativa de tinción fue 14.39 % menor en el grupo tratado con cuprizona (Control 0.674 ± 0.04 ; Cuprizona 0.577 ± 0.05 , $t = 2.45$, $p = 0.035$).

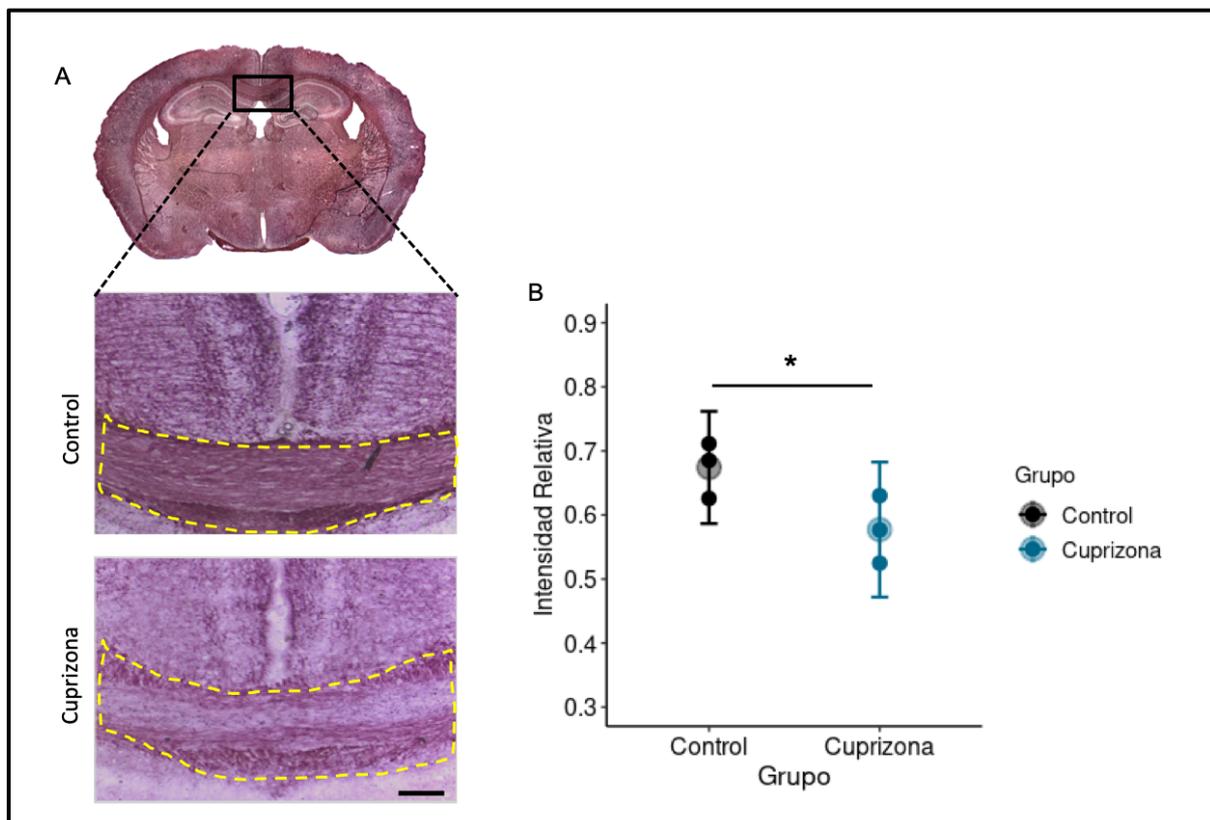


Figura 17. Diferencias entre control y cuprizona en cortes de la porción posterior del cuerpo calloso tras 6 semanas de iniciado el tratamiento con cuprizona.

A Composición panorámica de una micrografía como referencia de ubicación anatómica (arriba). Micrografías de capturas 10X de la porción posterior del cuerpo calloso (región punteada en amarillo); control arriba y tratado con cuprizona abajo. **B** Gráfica de dispersión intensidad relativa vs grupo. Observaciones en puntos rellenos, promedios en puntos difuminados, barra de desviación estándar. ($n = 3$ en grupo Control, $n = 3$ en grupo Cuprizona). Barra de escala: 200 μm .

Dadas estas observaciones, se determinó que persiste la desmielinización en la porción posterior en este punto temporal, es decir, tras 3 semanas de la suspensión de la cuprizona. Se consideró este punto temporal como una etapa factible para hacer la evaluación de los posibles efectos pro-mielinizantes del tratamiento farmacológico con β -CCB en este nivel anatómico del cuerpo calloso.

1.2 Imagenología por resonancia magnética

1.2.1 Imágenes anatómicas pesadas a T2 durante el proceso de desmielinización

Al examinar las imágenes pesadas al contraste T2 en cortes coronales, se observó aumento de la intensidad en porciones posteriores del cuerpo calloso después de 3 semanas de tratamiento con cuprizona (Figura 18-B), lo que también se observa 6 semanas a partir del inicio del tratamiento con cuprizona (Figura 18-C). Aunque la región de interés para exploración fue el cuerpo calloso, también se encontró aumento de la intensidad en el hipocampo. Esta exploración cualitativa inicial permite evidenciar alteraciones debidas a la ingesta de cuprizona, hallazgos que están en acuerdo con otros estudios similares (Brück *et al.*, 1997); sin embargo, es necesario analizar cuantitativamente estas imágenes.



Figura 18. Imágenes estructurales pesadas a contraste T2 en el modelo de cuprizona. Se muestran cortes cerebrales coronales de la porción posterior del cuerpo calloso a nivel de hipocampos. **A** Previo al inicio de tratamiento con cuprizona; **B** Tras 3 semanas de tratamiento con cuprizona; **C** A las 6 semanas a partir del inicio del tratamiento con cuprizona. Nótese cómo aumenta la intensidad de la señal en la región del cuerpo calloso durante la intoxicación aguda con cuprizona, en comparación con el período previo a la exposición de cuprizona en donde la región es más hipodensa (recuadros amarillos).

1.2.2 La fracción de anisotropía disminuye durante la desmielinización

La disminución de la FA se ha correlacionado con daño a la sustancia blanca. De este modo, se evaluó el índice de FA antes del tratamiento con cuprizona y semanalmente durante 6 semanas en la región del cuerpo calloso (promedio de regiones anteriores, medias y posteriores). Se encontró disminución de los valores de FA en el grupo cuprizona a partir de la semana 4 de iniciado el tratamiento (semana 4: Control 0.607 ± 0.016 , Cuprizona 0.535 ± 0.015 , contraste entre grupos 0.0719 , $p = 0.0015$; semana 5: Control 0.609 ± 0.012 , Cuprizona 0.502 ± 0.011 , contraste entre grupos 0.1066 , $p < 0.0001$; semana 6: Control 0.644 ± 0.018 , Cuprizona 0.539 ± 0.011 , contraste entre grupos 0.1042 , $p < 0.0001$) (Figura 19). Estos datos están en acuerdo con antecedentes en procesos de daño axonal consecuente a daño en la sustancia blanca (Huisman *et al.*, 2004).

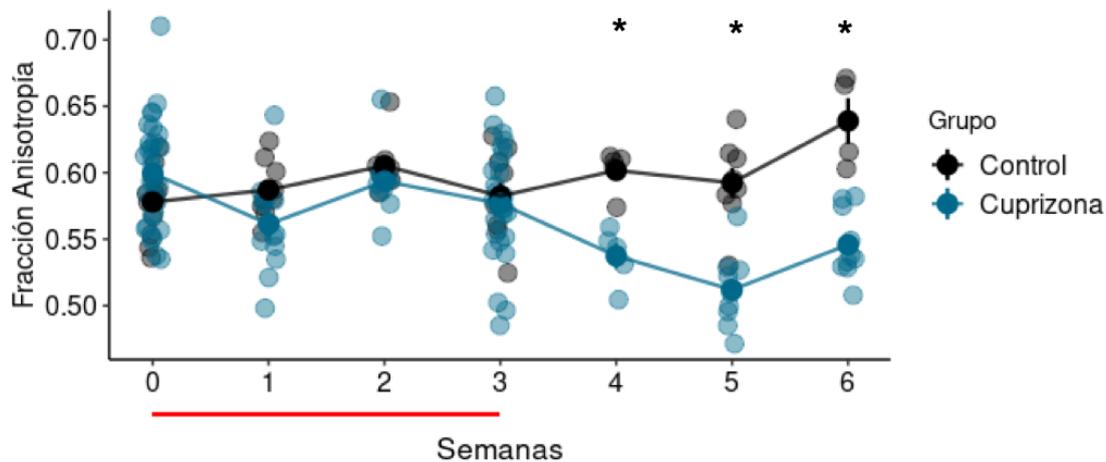


Figura 19. Fracción de anisotropía en la región del cuerpo calloso (promedio de las porciones anteriores, medias y posteriores) durante el proceso de desmielinización.

Se muestra la evolución de la fracción de anisotropía en los grupos Control y Cuprizona desde la semana 0 (previa al tratamiento) hasta la semana 6 a partir de iniciado el tratamiento. Se indica con línea roja el período de tiempo que se mantuvo la ingesta con cuprizona. Análisis de modelos mixtos. En puntos rellenos se muestran los promedios por grupos con error estándar. * $P < 0.05$, Control vs Cuprizona ($n \geq 4$ grupo Control en cada punto, $n \geq 10$ grupo Cuprizona en cada punto).

1.2.3 La difusividad radial aumenta durante la desmielinización

Los cambios de FA sugieren alteraciones en la sustancia blanca; sin embargo, no es específica de esta y algunos antecedentes han mostrado que también refleja daño axonal (Song *et al.*, 2002; Song *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2009). Dado lo anterior, se evaluó también la λ_{\perp} , métrica cuyos cambios se correlacionan con alteraciones en la mielina. Se observó un aumento de la λ_{\perp} en la región del cuerpo calloso (promedio de regiones anteriores, medias y posteriores) durante el proceso de desmielinización, siendo significativo este aumento a partir de 5 semanas del inicio del tratamiento con cuprizona (semana 5: Control $6.1^{-4} \pm 1.57^{-5}$, Cuprizona $6.9^{-4} \pm 1.43^{-5}$, contraste entre grupos $-8.04e-05$, $p = 0.0002$; semana 6: Control $6.06^{-4} \pm 2.28^{-5}$, Cuprizona $7.69^{-4} \pm 1.44^{-5}$, contraste entre grupos $-1.63e-04$, $p < 0.0001$) (Figura 20). Estos hallazgos sugieren un efecto de desmielinización que persiste a las 6 semanas de iniciado el tratamiento con cuprizona, similar a lo

reportado en otros estudios (Song *et al.*, 2005) y que está en acuerdo con los hallazgos histológicos previamente mostrados.

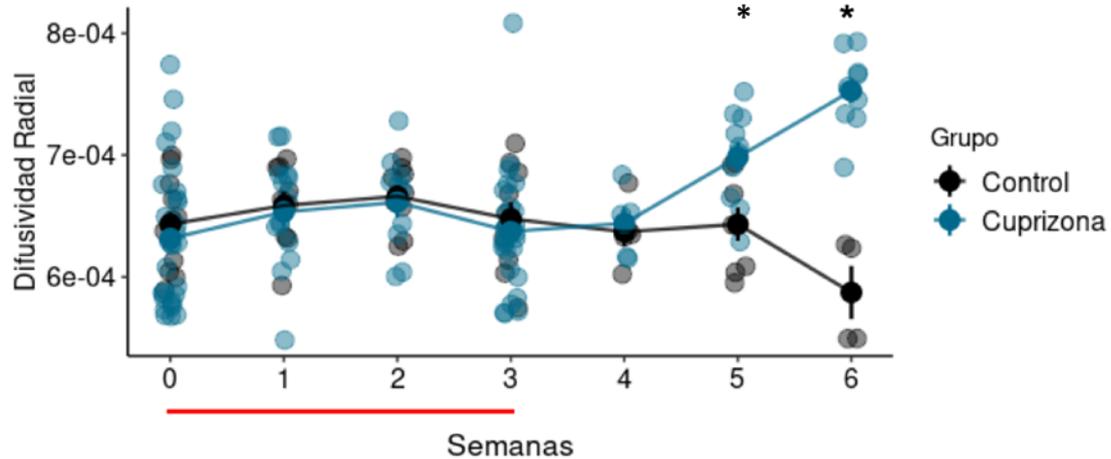


Figura 20. Difusividad radial en la región del cuerpo calloso (promedio de las porciones anteriores, medias y posteriores) durante el proceso de desmielinización.

Se muestra la evolución de la difusividad radial en los grupos Control y Cuprizona desde la semana 0 (previa al tratamiento) y hasta la semana 6 a partir de iniciado el tratamiento. Se indica en línea roja el período de tiempo que se mantuvo la ingesta con cuprizona. Análisis de modelos mixtos. En puntos rellenos se muestran los promedios por grupos con error estándar. *P < 0.05 Control vs Cuprizona (n ≥ 4 grupo Control, n ≥ 10 grupo Cuprizona).

1.3 Evaluación de la conducta exploratoria durante la desmielinización

Se evaluó la actividad exploratoria usando la prueba de campo abierto. Para esto, se tomó como referencia la distancia recorrida en el centro de la caja (área central de 16 cm²) respecto a la distancia total recorrida durante 15 minutos de la prueba. Antes de iniciar el tratamiento con cuprizona, los grupos presentaron porcentajes similares de la distancia recorrida en el centro de la caja (Control 20.64 %, Cuprizona 22.37 %, t = 1.346, p = 0.11). A 3 semanas de tratamiento con cuprizona, el porcentaje de la distancia recorrida en el centro disminuyó para el grupo tratado (Control 29.47 %; Cuprizona 14.42 %, t = -4.97, p = 0.0008) (Figura 21-B). Después de 6 semanas de haber iniciado el tratamiento con cuprizona, no se observaron diferencias en la conducta exploratoria entre grupos (Control 24.28 %; Cuprizona 23.66 %, t = 0.08, p = 0.471) (Figura 21-B).

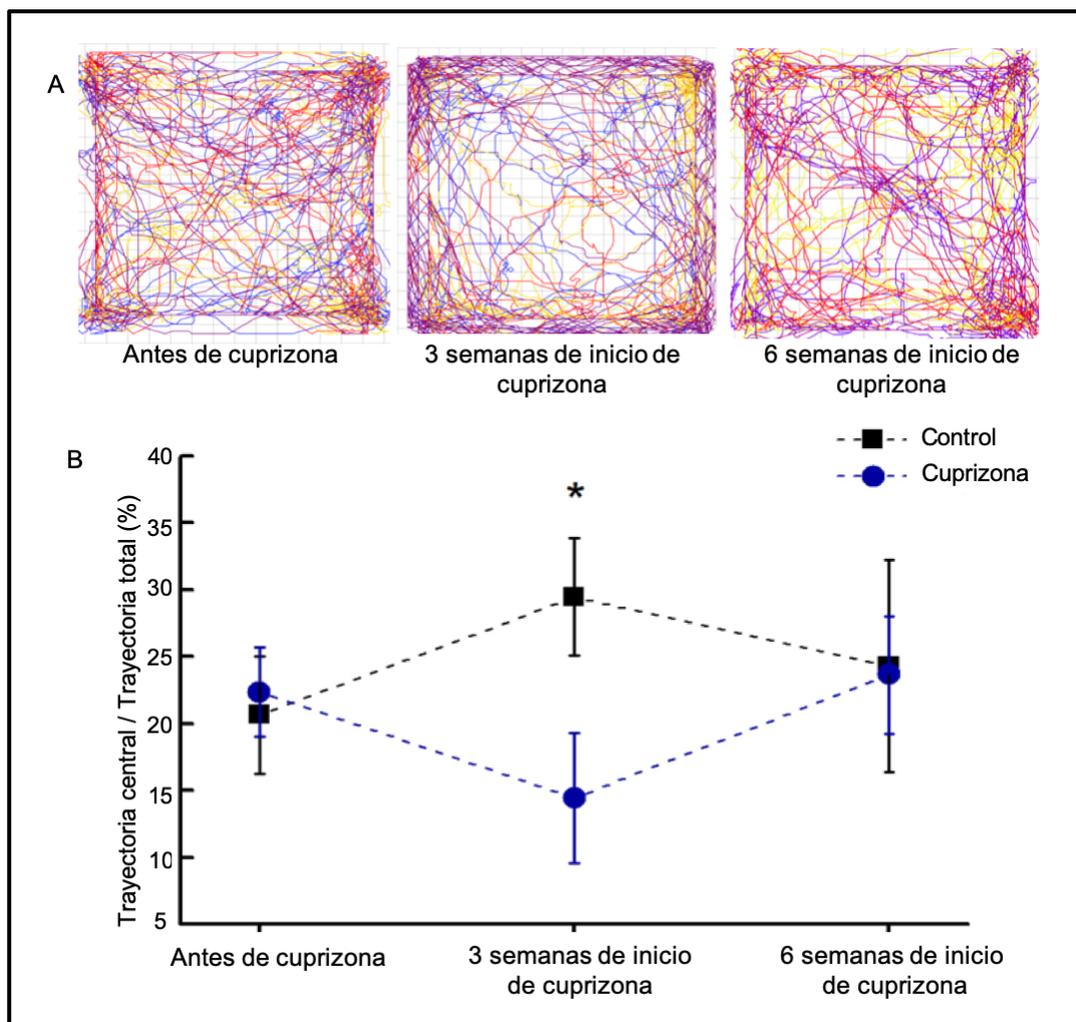


Figura 21. Trayectorias recorridas en el campo abierto previo al tratamiento con cuprizona y a 3 y 6 semanas de iniciado el tratamiento.

A Mapas de trayectorias recorridas durante 5 minutos previa intoxicación con cuprizona (izquierda), después de 3 semanas de tratamiento con cuprizona (medio) y a 6 semanas de haber iniciado el tratamiento con cuprizona (derecha) (n = 4). **B** Porcentaje de la distancia recorrida en el centro respecto a la distancia total recorrida. Gráfica temporal. Promedios de porcentajes por grupos con desviación estándar. *P < 0.05, Control vs Cuprizona (n ≥ 5 en cada caso).

Estos hallazgos sugieren que la prueba de campo abierto es sensible para evaluar alteraciones en la conducta exploratoria tras el período de intoxicación aguda por cuprizona, pero no es sensible para evaluar cambios en la conducta exploratoria durante todo el período de desmielinización. Franco-Pons *et al.* (2007) encontraron hallazgos similares cuando evaluaron la actividad exploratoria en ratones tratados

con cuprizona al 0.2% durante 6 semanas consecutivas, no observaron cambios en la conducta exploratoria a 6 semanas de inicio del tratamiento desmielinizante.

2. Exploración del tratamiento farmacológico con β -CCB

La β -CCB es un modulador alostérico del GABA_AR oligodendroglial que potencia la respuesta a GABA. Así que con objetivo de evaluar un posible efecto promielinizante en el cuerpo calloso y tomando como referencia la ventana de desmielinización monitoreada por histología e imagenología, se hicieron dos evaluaciones del efecto de β -CCB a dosis de 1 mg/kg i.p. Una evaluación fue a 3 semanas de tratamiento y la otra a 1.5 semanas de tratamiento. Ambos esquemas iniciaron la β -CCB a partir de la semana 6 de iniciado el tratamiento de cuprizona.

2.1 Evaluación histológica a 3 semanas de tratamiento con β -CCB

Usando la tinción específica para mielina BGII, se realizó la primera evaluación del grado de mielinización tras 3 semanas de tratamiento con β -CCB. Inicialmente, se exploró el efecto de β -CCB en un grupo tratado previamente con cuprizona y posteriormente con β -CCB (grupo β -CCB) y se comparó con un grupo control de la misma edad sin previo tratamiento con cuprizona (grupo Control), un grupo previamente tratado con cuprizona y posteriormente con vehículo i.p. (grupo Vehículo) y un grupo previamente tratado únicamente con cuprizona (grupo Cuprizona) (Figura 22).

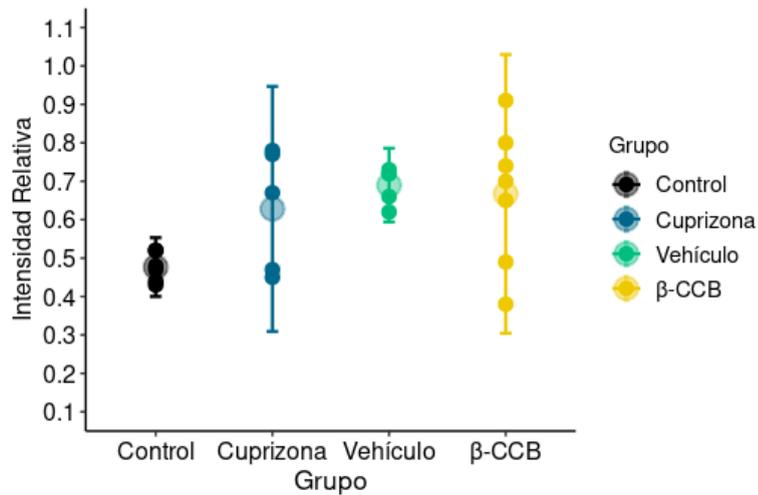


Figura 22. Intensidad relativa en la porción posterior del cuerpo caloso por grupos tras la administración de β -CCB durante 3 semanas.

Gráfica de dispersión intensidad relativa vs grupo. Observaciones en puntos rellenos, promedios en puntos difuminados, barra de desviación estándar ($n \geq 5$ en cada grupo).

Como se observa en la Figura 22, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Control 0.48 ± 0.04 , Cuprizona 0.63 ± 0.16 , Vehículo 0.69 ± 0.05 , β -CCB 0.67 ± 0.18 ; comparación Cuprizona-Control = 0.151, $p = 0.245$; comparación Vehículo-Control = 0.213, $p = 0.058$; comparación β -CCB-Control = 0.19, $p = 0.067$; comparación Vehículo-Cuprizona = 0.062, $p = 0.87$; comparación β -CCB-Cuprizona = 0.039, $p = 0.953$; comparación β -CCB-Vehículo = 0.022, $p = 0.99$). Esto podría sugerir que los animales expuestos a cuprizona sufrieron un proceso de remielinización espontánea en esta etapa, lo que ocasiona un grado de mielinización similar entre grupos e imposibilita evaluar si β -CCB promueve remielinización *per se*. Dado lo anterior, se decidió hacer una exploración histológica en un punto temporal previo, a 1.5 semanas de tratamiento.

Además, se consideró que la alta dispersión de los datos los hace no confiables para evaluar el efecto de β -CCB en esta etapa, por lo que se sugieren más experimentos para apoyar estos resultados.

2.2 Evaluación histológica a 1.5 semanas de tratamiento con β -CCB

Al evaluar un posible efecto promielinizante en el cuerpo calloso tras 1.5 semanas de tratamiento con β -CCB, las histologías usando BGII mostraron que los grados de intensidades de tinción en cortes posteriores eran similares entre grupos (Control 0.47 ± 0.07 , Cuprizona 0.48 ± 0.05 , β -CCB 0.51 ± 0.03 ; comparación Cuprizona-Control = 0.009, $p = 0.974$, comparación β -CCB-Control = 0.042, $p = 0.603$, comparación β -CCB-cuprizona = 0.033, $p = 0.727$) (Figura 23).

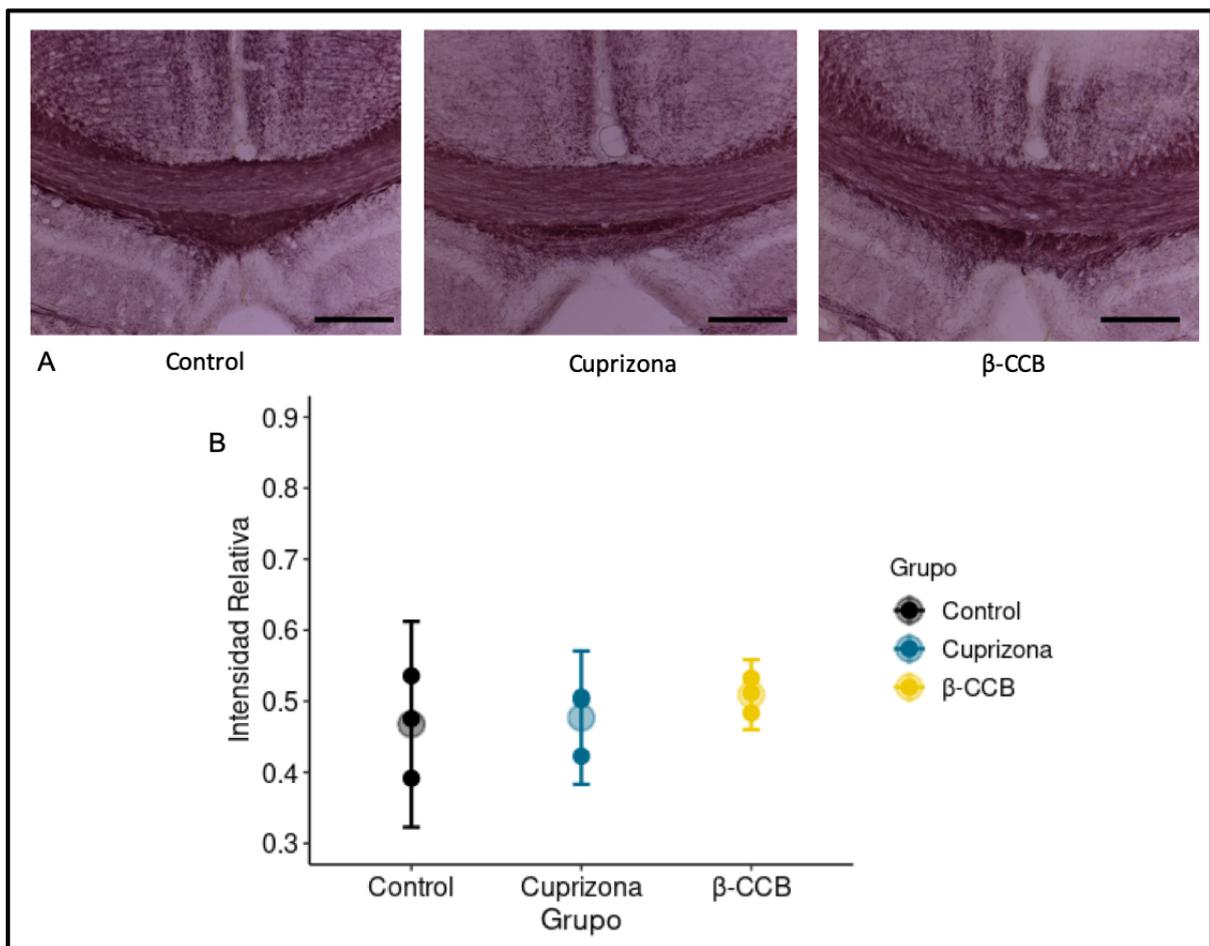


Figura 23. Intensidad relativa en la porción posterior del cuerpo calloso por grupos tras la administración de β -CCB durante 1.5 semanas.

A Cortes representativos 10X de la porción posterior del cuerpo calloso. De lado izquierdo ratón Control, en medio ratón tratado con cuprizona sin tratamiento i.p. (Cuprizona) y a la derecha ratón tratado con cuprizona + β -CCB (β -CCB). **B** Intensidad relativa de la región posterior del cuerpo calloso en cortes coronales. Gráfica de dispersión intensidad relativa vs grupo. Observaciones en puntos rellenos, promedios en puntos difuminados, barra de desviación estándar ($n = 3$ en cada grupo). Barra de escala: 200 μ m.

Los resultados en esta ventana de monitoreo y bajo este protocolo de tratamiento indican que no es posible observar cambios significativos en el grado de mielinización entre grupos usando histología con BGII. Lo anterior puede deberse a que las dosis de β -CCB son insuficientes para mostrar un efecto promielinizante o nuevamente, a la posibilidad de que la remielinización espontánea enmascara el efecto promielinizante de β -CCB en este punto temporal.

2.3 Evaluación del tratamiento con β -CCB sobre la conducta exploratoria

Novas y colaboradores (1988) exploraron la conducta de animales tratados con β -CCB mediante la prueba de campo abierto y observaron conductas ansiogénicas dosis dependientes. De este modo, se exploró si la administración de β -CCB a 1 mg/kg i.p. promovía alteraciones conductuales en animales previamente tratados con cuprizona. Para ello se comparó la conducta exploratoria de un grupo de ratones tratados previamente con cuprizona y posteriormente con β -CCB durante 2 semanas (β -CCB) contra un grupo tratado con cuprizona y sin tratamiento i.p. (Cuprizona) y un grupo control sin ningún tratamiento (Control) de la misma edad. No se encontraron diferencias en el porcentaje de distancia recorrida en el centro respecto a la distancia total recorrida (Control 20.05%, Cuprizona 21.73%, β -CCB 24.98%, $f = 1.546$, $p = 0.259$) (Figura 24).

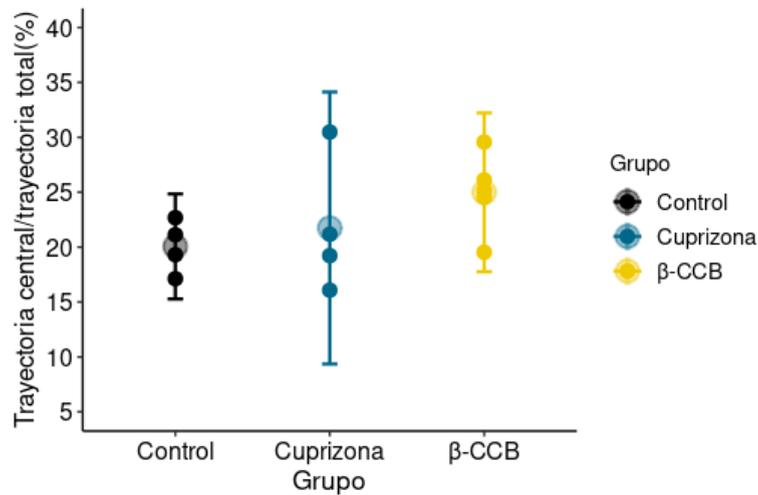


Figura 24. Gráfica del porcentaje de distancia recorrida en el centro respecto de la distancia total recorrida por grupos tras la administración de β -CCB durante 2 semanas.

Observaciones en puntos rellenos, promedios en puntos difuminados, barra de desviación estándar (n = 4 en grupo Control y Cuprizona, n = 5 en grupo β -CCB).

Si bien, un estudio más exhaustivo es necesario para complementar estas observaciones, estos datos sugieren que el tratamiento con β -CCB 1 mg/kg vía i.p. durante dos semanas en animales previamente tratados con cuprizona no promueve efectos adversos sobre la conducta exploratoria medida con la prueba de campo abierto.

IX. Discusión

Investigaciones que incluyen abordajes *in vitro* e *in vivo* han indicado que la señalización GABAérgica tiene un papel fundamental en el proceso de mielinización (Berger *et al.*, 1992; Vélez-Fort *et al.*, 2012; Zonouzi *et al.*, 2015). También, se ha reportado que el aumento de la disponibilidad de GABA promueve la recuperación del daño en la sustancia blanca en un modelo *in vivo* (Zonouzi *et al.*, 2015), mientras que la inhibición del GABA_AR neuronal altera la arquitectura miélnica (Hamilton *et al.*, 2017). Por su parte, mediante una caracterización electrofisiológica y farmacológica, se ha mostrado que las β -carbolinas tienen un papel modulador alostérico de los GABA_AR, actuando de manera diferencial entre células del linaje oligodendroglial y neuronas (Arellano *et al.*, 2016; Cisneros-Mejorado *et al.*, 2020; Ordaz *et al.*, 2021). Ha sido de particular interés la N-butil- β -carbolina-3-carboxilato (β -CCB), β -carbolina que actúa como un potenciador selectivo del GABA_AR oligodendroglial y que se ha usado para promover remielinización en zonas focales desmielinizadas en un modelo *in vivo* (Cisneros-Mejorado *et al.*, 2020). Considerando que más experimentos y con más estrategias experimentales deberían ser dirigidos con el propósito de medir y comprobar la eficacia mielinizante de β -CCB, en este proyecto se consideró como una potencial herramienta farmacológica que podría promover el proceso de remielinización en un modelo sistémico de desmielinización por cuprizona. En el contexto de daños a la sustancia blanca, el modelo de desmielinización generalizada del SNC por ingesta oral de cuprizona ha permitido estudiar el proceso de remielinización espontánea en animales adultos, por lo que se consideró un modelo de desmielinización apropiado para el estudio *in vivo* de la potenciación del GABA_AR oligodendroglial durante la remielinización evaluada en edades adultas, así que se eligió para evaluar si los efectos de β -CCB son robustos y similarmente promielinizantes a los observados en un modelo de lesión desmielinizante focal (Cisneros-Mejorado *et al.*, 2020). En la actualidad, la microestructura de la mielina ha podido ser monitoreada indirectamente mediante técnicas de imagenología no invasiva como la imagenología por resonancia magnética pesada a difusión (dMRI) y el modelo del

tensor (DTI) que han permitido inferir alteraciones o daño en sustancia blanca en diversos modelos desmielinizantes (Concha, 2014; Song *et al.*, 2002, 2003, 2005; Tagge *et al.*, 2016). En este proyecto se exploró el proceso de desmielinización por cuprizona (0.3 % vía oral durante 3 semanas) en ratones adultos jóvenes mediante técnicas de imagenología e histología y el consecuente proceso de remielinización mediante técnicas histológicas. Los hallazgos histológicos mostraron mayor desmielinización en la parte posterior del cuerpo calloso a 6 semanas de iniciada la cuprizona, sugiriendo un gradiente espacial de afectación a la sustancia blanca; lo que está de acuerdo con previos reportes (Tagge *et al.*, 2016). Es posible sugerir que la distribución diferencial de nichos del linaje oligodendroglial en distintas localizaciones del cerebro (Acs *et al.*, 2013) es lo que promueve la heterogeneidad de la desmielinización del cuerpo calloso en el modelo de cuprizona, aunque es necesario llevar a prueba esta idea. Así mismo, como se ha descrito previamente (Song *et al.*, 2005), por dMRI y usando el modelo del tensor (DTI) se observó incremento de la difusividad radial (λ_{\perp}) a las 5 semanas de iniciada la ingesta de cuprizona, lo que se ha correlacionado con daño a la mielina; además, en este estudio la fracción de anisotropía (FA) mostró también cambios significativos desde la semana 4 de iniciado el tratamiento con cuprizona. Así, mientras que la λ_{\perp} se ha correlacionado con alteraciones en la mielina, el índice de FA podría, además, indicar algún otro cambio como daño axonal (Song *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2009). La utilización de DTI como una estrategia longitudinal no invasiva contiene amplia información cuantitativa del modelo desmielinizante, aunque su sensibilidad para evaluar desmielinización parece observarse hasta las 6 semanas de iniciado el tratamiento con cuprizona (Song *et al.*, 2005). Es importante recordar que los resultados obtenidos por dMRI deben correlacionarse con hallazgos histológicos específicos u otras metodologías, ya que la información obtenida se convierte a partir de mediciones indirectas de la microestructura. Habiendo observado desmielinización por imagenología e histología, se evaluó el efecto potenciador de la señalización GABAérgica oligodendroglial que produce β -CCB (Arellano *et al.*, 2016; Cisneros-Mejorado *et al.*, 2020; Ordaz *et al.*, 2021), que además se ha propuesto como una molécula endógena (Medina *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2012). Inicialmente se administró por 3 semanas, pero al examinarse la histología se

observó el mismo grado de mielinización entre ratones tratados con β -CCB y ratones sólo tratados con cuprizona, por lo que se pensó que el efecto de la posible remielinización espontánea producido por la suspensión de cuprizona enmascaraba el efecto promielinizante de β -CCB en este período y se decidió hacer otra exploración en un punto temporal previo, a 1.5 semanas de tratamiento con β -CCB. Sin embargo, los resultados tampoco mostraron diferencias en este punto temporal. Para detallar el posible efecto promielinizante de β -CCB usando el modelo de cuprizona, consideramos necesaria la realización de más experimentos que se dirijan a este objetivo y que complementen, usando otras metodologías, los análisis en etapas previas a lo explorado aquí y que permitan detallar las regiones de interés con distintos niveles anatómicos antero-posterior y ventro-lateral. Es de notar que el tratamiento con β -CCB fue genuino sobre las conductas locomotora y exploratoria medidas con la prueba de campo abierto. Si bien son necesarias otras pruebas conductuales, nuestros resultados sugieren que esta molécula a dosis de 1 mg/kg i.p. no ejerce efectos negativos en la conducta exploratoria.

Es importante mencionar que, debido a dificultades técnicas (averías en los equipos de resonancia magnética) y a las condiciones actuales de contingencia (pandemia por COVID-19), no fue posible monitorear mediante imagenología a los animales en el período de remielinización, por lo que también serán necesarios más experimentos con esta metodología en futuros proyectos.

En resumen, estos hallazgos sugieren que el efecto desmielinizante producido por el modelo de 0.3% de cuprizona puede ser monitoreado longitudinalmente por dMRI-DTI midiendo la λ_{\perp} , al mismo tiempo que se correlacionan con análisis histológicos específicos para mielina. La evaluación farmacológica del posible efecto promielinizante de β -CCB en el cuerpo calloso se debe monitorear midiendo regiones de interés finas que tomen en cuenta el gradiente de desmielinización anteroposterior y en períodos de tiempo menores a 1.5 semanas cuando se use el modelo de desmielinización por cuprizona. Más experimentos y más metodologías deben usarse como estrategias experimentales para evaluar la eficacia promielinizante *in vivo* de la potenciación GABAérgica oligodendroglial con β -CCB.

X. Conclusiones

La ingesta de 0.3 % de cuprizona durante tres semanas promueve la desmielinización del cuerpo caloso y su efecto se observa hasta la semana 5 y 6 de haberse iniciado el tratamiento.

A las 5 semanas de iniciado el tratamiento con cuprizona 0.3 % administrado por 3 semanas, es posible monitorear indirectamente las alteraciones de la sustancia blanca del cuerpo caloso cuantificando la λ_{\perp} mediante dMRI-DTI y es posible corroborar el daño a la mielina del cuerpo caloso por histología usando la tinción BGII en la semana 6 de iniciado el tratamiento con cuprizona.

La remielinización espontánea máxima del cuerpo caloso en el modelo de desmielinización aguda por cuprizona se ha comprobado en períodos entre 1 y 2 semanas después de la desmielinización máxima, esta temporalidad debe ser tomada en cuenta al evaluar algún efecto promielinizante del tratamiento farmacológico con β -CCB 1 mg/kg i.p.

El curso temporal de la remielinización del cuerpo caloso durante el tratamiento farmacológico con β -CCB 1 mg/kg i.p. usando el modelo de desmielinización aguda por cuprizona debe monitorearse con regiones de interés que tomen en cuenta los gradientes espaciales de desmielinización y usando técnicas metodológicas que permitan la evaluación del estado de la mielina longitudinalmente y en períodos de tiempo menores a 1.5 semanas.

El tratamiento farmacológico con β -CCB 1 mg/kg i.p. durante dos semanas, no promueve efectos adversos en las conductas de exploración y locomoción medidas con la prueba de campo abierto.

XI. Citas bibliográficas

Acs, P., Selak, M. A., Komoly, S. y Kalman, B. (2013). Distribution of oligodendrocyte loss and mitochondrial toxicity in the cuprizone induced experimental demyelination model. *Journal of Neuroimmunology*, 262(1-2), 128-131.

Arellano, R. O., Sánchez-Gómez, M. V., Alberdi, E., Canedo Antelo, M., Chara, J. C., Palomino, A., ... y Matute, C. (2016). Axon to glia interaction regulates GABA_A receptor expression in oligodendrocytes. *Molecular pharmacology*, 89(1), 63-74.

Berger, T., Walz, W., Schnitzer, J. y Kettenmann, H. (1992). GABA and glutamate activated currents in glial cells of the mouse corpus callosum slice. *Journal of neuroscience research*, 31(1), 21-27.

Boghog2, Public domain, via Wikimedia Commons
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:NAchR_2BG9.png

Bothwell, M. (2017). Mechanisms and medicines for remyelination. *Annual review of medicine*, 68, 431-443.

Boulanger, J. J. y Messier, C. (2014). From precursors to myelinating oligodendrocytes: contribution of intrinsic and extrinsic factors to white matter plasticity in the adult brain. *Neuroscience*, 269, 343-366.

Braestrup, C., Nielsen, M. y Olsen, C. E. (1980). Urinary and brain beta carboline 3 carboxylates as potent inhibitors of brain benzodiazepine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(4), 2288-2292.

Brück, W., Bitsch, A., Kolenda, H., Brück, Y., Stiefel, M. y Lassmann, H. (1997). Inflammatory central nervous system demyelination: correlation of magnetic resonance imaging findings with lesion pathology. *Annals of neurology*, 42(5), 783-793.

Carlton, W. W. (1967). Studies on the induction of hydrocephalus and spongy degeneration by cuprizone feeding and attempts to antidote the toxicity. *Life sciences*, 6(1), 11-19.

Chen, X., Cromer, B. A. y Lynch, J. W. (2009). Molecular determinants of β -carboline inhibition of the glycine receptor. *Journal of neurochemistry*, 110(5), 1685-1694.

Chua, H. C. y Chebib, M. (2017). GABAA receptors and the diversity in their structure and pharmacology. *Advances in pharmacology*, 79, 1-34.

Cisneros-Mejorado, A. J., Garay, E., Ortiz Retana, J., Concha, L., Moctezuma, J. P., Romero, S. y Arellano, R. O. (2020). Demyelination–Remyelination of the Rat Caudal Cerebellar Peduncle Evaluated with Magnetic Resonance Imaging. *Neuroscience*, 439, 255-267.

Concha, L. (2014). A macroscopic view of microstructure: using diffusion-weighted images to infer damage, repair, and plasticity of white matter. *Neuroscience*, 276, 14-28.

Doan, V., Kleindienst, A. M., McMahon, E. J., Long, B. R., Matsushima, G. K. y Taylor, L. C. (2013). Abbreviated exposure to cuprizone is sufficient to induce demyelination and oligodendrocyte loss. *Journal of neuroscience research*, 91(3), 363-373.

Emery, B. y Lu, Q. R. (2015). Transcriptional and epigenetic regulation of oligodendrocyte development and myelination in the central nervous system. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(9), a020461.

Farrant, M. y Nusser, Z. (2005). Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA A receptors. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(3), 215-229.

Franco Pons, N., Torrente, M., Colomina, M. T. y Vilella, E. (2007). Behavioral deficits in the cuprizone induced murine model of demyelination/remyelination. *Toxicology letters*, 169(3), 205-213.

Gallo, V., Zhou, J. M., McBain, C. J., Wright, P., Knutson, P. L. y Armstrong, R. C. (1996). Oligodendrocyte progenitor cell proliferation and lineage progression are regulated by glutamate receptor mediated K⁺ channel block. *Journal of Neuroscience*, 16(8), 2659-2670.

Gilbert, P., Kettenmann, H. y Schachner, M. (1984). Gamma aminobutyric acid directly depolarizes cultured oligodendrocytes. *Journal of Neuroscience*, 4(2), 561-569.

Hakkarainen, H., Sierra, A., Mangia, S., Garwood, M., Michaeli, S., Gröhn, O. y Liimatainen, T. (2016). MRI relaxation in the presence of fictitious fields correlates with myelin content in normal rat brain. *Magnetic resonance in medicine*, 75(1), 161-168.

Hamilton, N. B., Clarke, L. E., Arancibia Carcamo, I. L., Kougioumtzidou, E., Matthey, M., Káradóttir, R., ... y Attwell, D. (2017). Endogenous GABA controls oligodendrocyte lineage cell number, myelination, and CNS internode length. *Glia*, 65(2), 309-321.

Hirano, A. (1968). A confirmation of the oligodendroglial origin of myelin in the adult rat. *The Journal of cell biology*, 38(3), 637.

Hoppe, D. y Kettenmann, H. (1989). GABA triggers a Cl⁻ efflux from cultured mouse oligodendrocytes. *Neuroscience letters*, 97(3), 334-339.

Huisman, T. A., Schwamm, L. H., Schaefer, P. W., Koroshetz, W. J., Shett Alva, N., Ozsunar, Y., ... y Sorensen, A. G. (2004). Diffusion tensor imaging as potential biomarker of white matter injury in diffuse axonal injury. *American Journal of Neuroradiology*, 25(3), 370-376.

Koester, J. y Siegelbaum, S. A. (2013). Membrane potential and the passive electrical properties of the neuron. *Principles of neural science*, Ed, 5, 126-147.

Kumar, R., Gupta, R. K., Husain, M., Chaudhry, C., Srivastava, A., Saksena, S. y Rathore, R. K. (2009). Comparative evaluation of corpus callosum DTI metrics in acute mild and moderate traumatic brain injury: its correlation with neuropsychometric tests. *Brain injury*, 23(7-8), 675-685.

Lin, S. C. y Bergles, D. E. (2004). Synaptic signaling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature neuroscience*, 7(1), 24-32.

Lubetzki, C., Sol Foulon, N. y Desmazières, A. (2020). Nodes of Ranvier during development and repair in the CNS. *Nature Reviews Neurology*, 1-14.

Makinodan, M., Yamauchi, T., Tatsumi, K., Okuda, H., Takeda, T., Kiuchi, K., ... y Kishimoto, T. (2009). Demyelination in the juvenile period, but not in adulthood, leads to long-lasting cognitive impairment and deficient social interaction in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 33(6), 978-985.

Matsushima, G. K. y Morell, P. (2001). The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system. *Brain pathology*, 11(1), 107-116.

Medina, J. H., de Stein, M. L. y de Robertis, E. (1989). n [3H] butyl β carboline 3 carboxylate, a putative endogenous ligand, binds preferentially to subtype 1 of central benzodiazepine receptors. *Journal of neurochemistry*, 52(3), 665-670.

Melzer, N. y Meuth, S. G. (2014). Disease-modifying therapy in multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy: common and divergent current and future strategies. *Clinical & Experimental Immunology*, 175(3), 359-372.

Micheva, K. D., Chang, E. F., Nana, A. L., Seeley, W. W., Ting, J. T. y Cobbs, C. (2018). Distinctive structural and molecular features of myelinated inhibitory axons in human neocortex. *Eneuro*, 5(5).

Misslin, R. y Cigrang, M. (1986). Does neophobia necessarily imply fear or anxiety?. *Behavioural processes*, 12(1), 45-50.

Murphy, N. A. y Franklin, R. J. (2017). Recruitment of endogenous CNS stem cells for regeneration in demyelinating disease. *Progress in brain research*, 231, 135-163.

Nave, K. A. y Werner, H. B. (2014). Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annual review of cell and developmental biology*, 30, 503-533.

NOM-062-ZOO-1999, N. O. M., Y LA PRODUCCIÓN, E. T. P. (1999). Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Novas, M. L., Wolfman, C., Medina, J. H. y de Robertis, E. (1988). Proconvulsant and 'anxiogenic' effects of n butyl β carboline 3 carboxylate, an endogenous benzodiazepine binding inhibitor from brain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 30(2), 331-336.

Ordaz, R. P., Garay, E., Limon, A., Pérez-Samartín, A., Sánchez-Gómez, M. V., Robles-Martínez, L., ... y Arellano, R. O. (2021). GABA_A Receptors Expressed in Oligodendrocytes Cultured from the Neonatal Rat Contain α 3 and γ 1 Subunits and Present Differential Functional and Pharmacological Properties. *Molecular pharmacology*, 99(2), 133-146.

Pandur, E., Pap, R., Varga, E., Jánosa, G., Komoly, S., Fórizs, J. y Sipos, K. (2019). Relationship of iron metabolism and short term cuprizone treatment of C57BL/6 mice. *International journal of molecular sciences*, 20(9), 2257.

Patel, K., Gadewar, M., Tripathi, R., Prasad, S. K. y Patel, D. K. (2012). A review on medicinal importance, pharmacological activity and bioanalytical aspects of beta carboline alkaloid "Harmine". *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 2(8), 660-664.

Paxinos, G. y Franklin, K. B. (2019). *Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic press.

Peña, C. J. M. A. E., Medina, J. H., Novas, M. L., Paladini, A. C. y 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*, 83(13), 4952-4956.

Praet, J., Guglielmetti, C., Berneman, Z., Van der Linden, A. y Ponsaerts, P. (2014). Cellular and molecular neuropathology of the cuprizone mouse model: clinical relevance for multiple sclerosis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 47, 485-505.

Prut, L. y Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology*, 463(1-3), 3-33.

R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Robinson, E. S. J., Anderson, N. J., Crosby, J., Nutt, D. J. y Hudson, A. L. (2003). Endogenous β -Carbolines as Clonidine-Displacing Substances. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1009(1), 157-166.

Russell, W. M. S. y Burch, R. L. (1959). *The principles of humane experimental technique*. Methuen.

Schmued, L., Bowyer, J., Cozart, M., Heard, D., Binienda, Z. y Paule, M. (2008). Introducing Black-Gold II, a highly soluble gold phosphate complex with several unique advantages for the histochemical localization of myelin. *Brain research*, 1229, 210-217.

Skaper, S. D. (2019). Oligodendrocyte precursor cells as a therapeutic target for demyelinating diseases. In *Progress in brain research* (Vol. 245, pp. 119-144). Elsevier.

Song, S. K., Sun, S. W., Ramsbottom, M. J., Chang, C., Russell, J. y Cross, A. H. (2002). Dysmyelination revealed through MRI as increased radial (but unchanged axial) diffusion of water. *Neuroimage*, 17(3), 1429-1436.

Song, S. K., Sun, S. W., Ju, W. K., Lin, S. J., Cross, A. H. y Neufeld, A. H. (2003). Diffusion tensor imaging detects and differentiates axon and myelin degeneration in mouse optic nerve after retinal ischemia. *Neuroimage*, 20(3), 1714-1722.

Song, S. K., Yoshino, J., Le, T. Q., Lin, S. J., Sun, S. W., Cross, A. H. y Armstrong, R. C. (2005). Demyelination increases radial diffusivity in corpus callosum of mouse brain. *Neuroimage*, 26(1), 132-140.

Stadelmann, C., Timmler, S., Barrantes Freer, A. y Simons, M. (2019). Myelin in the central nervous system: structure, function and pathology. *Physiological reviews*, 99(3), 1381-1431.

Stidworthy, M. F., Genoud, S., Suter, U., Mantei, N. y Franklin, R. J. (2003). Quantifying the early stages of remyelination following cuprizone induced demyelination. *Brain pathology*, 13(3), 329-339.

Sun, S. W., Liang, H. F., Le, T. Q., Armstrong, R. C., Cross, A. H. y Song, S. K. (2006). Differential sensitivity of in vivo and ex vivo diffusion tensor imaging to evolving optic nerve injury in mice with retinal ischemia. *Neuroimage*, 32(3), 1195-1204.

Tagge, I., O'Connor, A., Chaudhary, P., Pollaro, J., Berlow, Y., Chalupsky, M., ... y Rooney, W. (2016). Spatio-temporal patterns of demyelination and remyelination in the cuprizone mouse model. *PLoS one*, 11(4), e0152480.

Taraboletti, A., Walker, T., Avila, R., Huang, H., Caporoso, J., Manandhar, E., ... y Shriver, L. P. (2017). Cuprizone intoxication induces cell intrinsic alterations in oligodendrocyte metabolism independent of copper chelation. *Biochemistry*, 56(10), 1518-1528.

Tournier, J. D., Smith, R. E., Raffelt, D., Tabbara R., Dhollander, T., Pietsch, M., Christiaens, D., Jeurissen, B., Yeh, C. H. y Connelly, A. *MRtrix3: A fast, flexible and open software framework for medical image processing and visualisation. NeuroImage*, 202 (2019), pp. 116–37.

Vélez Fort, M., Audinat, E. y Angulo, M. C. (2012). Central role of GABA in neuron–glia interactions. *The Neuroscientist*, 18(3), 237-250.

Walton, C., Ring, R., Rechtman, L., Kaye, W., Leray, E., Marrie, R. A., ... y Baneke, P. (2020). Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS. *Multiple Sclerosis Journal*, 26(14), 1816-1821.

Wang, H., Li, C., Wang, H., Mei, F., Liu, Z., Shen, H. Y. y Xiao, L. (2013). Cuprizone-induced demyelination in mice: age-related vulnerability and exploratory behavior deficit. *Neuroscience bulletin*, 29(2), 251-259.

Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. URL <https://ggplot2.tidyverse.org>.

Xiao, L., Xu, H., Zhang, Y., Wei, Z., He, J., Jiang, W., ... y Li, X. M. (2008). Quetiapine facilitates oligodendrocyte development and prevents mice from myelin breakdown and behavioral changes. *Molecular psychiatry*, 13(7), 697-708.

Zonouzi, M., Scafidi, J., Li, P., McEllin, B., Edwards, J., Dupree, J. L., ... y Gallo, V. (2015). GABAergic regulation of cerebellar NG2 cell development is altered in perinatal white matter injury. *Nature neuroscience*, 18(5), 674-682.

Zufiría, L. O. y Martínez, J. L. (Eds.). (2007). *Aprendiendo los fundamentos de la resonancia magnética*. Editorial Médica Panamericana.