



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA**

**LOS RECEPTORES GABA<sub>A</sub> SE EXPRESAN SELECTIVAMENTE EN LA GLÍA NG2**  
**DE LA SUSTANCIA BLANCA CEREBELOSA**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:  
FRANCISCO EMMANUEL LABRADA MONCADA

DIRECTOR DE TESIS  
DR. DANIEL REYES HARO  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA  
COMITÉ TUTOR  
DR. ROGELIO ARELLANO OSTOA  
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA  
DR. IVÁN VELAZCO VELÁZQUEZ  
INSTITUTO DE FISIOLOGÍA CELULAR

QUERÉTARO QRO. MARZO DE 2022



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## ÍNDICE GENERAL

|   |    |
|---|----|
| ÍNDICE.....   | I  |
| Lista de figuras .....  | 3  |
| Lista de Abreviaturas.....                                    | 3  |
| Dedicatoria .....   | 5  |
| Agradecimientos.....  | 5  |
| Resumen .....   | 6  |
| Abstract .....  | 7  |
| Introducción .....  | 8  |
| I. Antecedentes .....   | 9  |
| 1.1 El cerebelo.....  | 9  |
| 1.2 Organización cerebelar.....                               | 10 |
| 1.3 Ácido $\gamma$ -aminobutírico (GABA).....                 | 12 |
| 1.4 Receptores GABA <sub>A</sub> .....                        | 15 |
| 1.6 Arreglo clásico del receptor GABA <sub>A</sub> .....      | 15 |
| 1.8 Glía.....   | 16 |
| 1.12 Microglía.....   | 17 |
| 1.12.1 Desarrollo de los fagocitos mononucleares del SNC..... | 17 |
| 1.9 Astroglía .....   | 18 |
| 1.10 Oligodendrocitos .....                                   | 19 |
| 1.11 Glía NG2 .....   | 20 |
| 1.11.1 Características electrofisiológicas de la NG2.....     | 21 |
| Antecedentes .....  | 22 |

|   |    |
|---|----|
| Justificación.....  | 23 |
| Objetivo general .....  | 23 |
| Objetivos específicos.....  | 23 |
| II. Materiales y métodos.....   | 23 |
| 2.1 Preparación de rebanadas de cerebelo.....   | 23 |
| 2.2 Tinción de astrocitos con sulforodamina.....  | 24 |
| 2.3 Difusión de biocitina a células vecinas y <i>patch-clamp</i> de célula completa .....   | 24 |
| 2.4 Imagen de calcio.....   | 25 |
| 2.5 Inmunofluorescencia .....   | 26 |
| III. Resultados .....   | 28 |
| 3.1 La enzima GAD67 está altamente expresada en la sustancia blanca cerebelosa .....  | 28 |
| 3.2 Los receptores GABA <sub>A</sub> se expresan funcionalmente en las células de la sustancia blanca cerebelosa (WMC) .....      | 29 |
| 3.3 Las células que responden a Muscimol no son SRB <sup>+</sup> .....  | 30 |
| 3.4 Las células de la sustancia blanca no expresan GABA <sub>B</sub> Rs.....  | 31 |
| 3.5 La expresión funcional de receptores GABA <sub>A</sub> ocurre selectivamente en la glía NG2 .....                             | 32 |
| 3.6 El GABA induce transitorios de calcio a través de los GABA <sub>A</sub> R.....  | 34 |
| 3.7 La glía NG2 recibe contactos sinápticos, pero la onda de calcio evocada no tiene efecto sobre la frecuencia de los sPSC ..... | 36 |
| IV. Discusión .....   | 38 |
| 4.1 El GABA <sub>A</sub> se expresa funcionalmente en la glía NG2 .....   | 39 |
| 4.2 La glía NG2 de la sustancia blanca recibe estímulos sinápticos .....  | 42 |
| 4.3 Las ondas de calcio evocadas no regulan la señalización directa de la glía NG2.....   | 43 |
| Conclusiones .....  | 44 |

|   |    |
|---|----|
| Referencias .....   | 46 |
| Apéndice 1: Análisis de imagen de calcio con fiji .....     | 51 |
| Apéndice 2: Uso de Nest-o-patch para electrofisiología..... | 61 |

## Lista de figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura A1. Regiones del cerebelo involucradas con distintas funciones (King et al., 2019).....                 | 3  |
| Figura A1. Organización de la corteza cerebelar.....   | 4  |
| Figura A2. Ciclo de síntesis, almacenamiento, liberación y recuperación de GABA en el SNC.....                 | 6  |
| Figura A3 Representación esquemática de un receptor GABAA y algunos de sus ligandos y su sitio de anclaje..... | 8  |
| Figura 1. Expresión de GAD67 en la sustancia blanca cerebelosa.....  | 20 |
| Figura 2. Las células gliales responden a muscimol pero no a baclofeno.....                                    | 21 |
| Figura 3. Las células que responden al muscimol no son marcadas con SRB.....                                   | 22 |
| Figura 4. La expresión funcional de los GABA <sub>A</sub> Rs sólo se detecta en la glía NG2.....               | 24 |
| Figura 5. GABA induce transitorios de calcio a través de los GABA <sub>A</sub> Rs.....                         | 26 |
| Figura 6. Las ondas de calcio no modulan la frecuencia de las sPSC ni la señalización a la glía NG2.....       | 28 |
| Figura 7. Conclusión gráfica .....   | 45 |

## Lista de Abreviaturas

aCSF - Líquido cefalorraquídeo artificial

ATP - Adenosina trifosfato

eGFP - Proteína verde fluorescente aumentada

GABA - Ácido  $\gamma$ -aminobutírico

GAD - Ácido glutámico descarboxilasa

GAT - Transportadores de GABA

GFAP - Proteína Acido Glial Fibrilar

NG2 - Proteoglicano "Neuron-Glia 2"

OPC - Célula progenitora de oligodendrocitos

PB - Buffer de fosfatos

SNC - Sistema nervioso central

sPSC - Corrientes post-sinápticas espontáneas

SRB - Sulforodamina B

TTX - Tetrodotoxina

VIATT - Vesículas transportadoras inhibitorias

WM - Sustancia blanca

WMC - Sustancia blanca cerebelosa

## **Dedicatoria**

A mi mamá.

A mi familia y a mis amigos, que son como familia.

## **Agradecimientos**

Al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Por la enorme oportunidad brinda que cada vez aprecio más.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT por la beca otorgada (640190).

Agradezco a AE. Espino, A. Castilla León, N. Hernández Ríos, M García Servín, L. Casanova Rico, N. Arandas y M.L. Lara Ayala (q.e.p.d.) por su apoyo técnico.

A mi tutor y los integrantes del comité tutor, por su tiempo y su apoyo.

Este trabajo se desarrolló con donativos PAPIIT-UNAM otorgados al Dr. Daniel Reyes Haro (IN205718 e IN209121).

## Resumen

Durante las primeras semanas postnatales, eventos neurogénicos, migración celular, así como el inicio de la mielinización ocurren en la sustancia blanca del cerebelo. El cerebelo está implicado en la coordinación del movimiento y en su composición celular predominan los tipos neuronales GABAérgicos. La liberación de GABA despolariza a las células gliales a través de la activación de los receptores GABA<sub>A</sub> (GABA<sub>A</sub>Rs). La señalización de GABA a través de estos receptores está involucrada en la proliferación, diferenciación y migración celular durante el desarrollo neurológico. La expresión funcional de los GABA<sub>A</sub>Rs se ha demostrado en células gliales durante el desarrollo postnatal temprano de la corteza cerebelosa. Sin embargo, se dispone de información limitada para la sustancia blanca del cerebelo (WMC). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue investigar si las células gliales expresan GABA<sub>A</sub>Rs funcionales durante el desarrollo postnatal (P7-P9) de la WMC en ratones. Nuestros estudios de inmunofluorescencia mostraron que la mitad de los astrocitos expresan GAD67, lo que sugiere una síntesis de GABA por las células gliales. Los estudios de imagen de calcio revelaron que los agonistas de los GABA<sub>A</sub>Rs, GABA y muscimol, evocaron transitorios de calcio en las células que no incorporaban sulforodamina B (SRB, marcador de astrocitos). En contraste, el agonista de los receptores GABA<sub>B</sub> baclofeno no produjo respuestas en la WMC. Los registros electrofisiológicos de células GFAP<sup>+</sup> mostraron una relación corriente-voltaje de tipo lineal que corresponde a un perfil de corriente pasivo, además la inclusión de biocitina en la pipeta de registro reveló la difusión de esta molécula a células vecinas, típico en los astrocitos. Sorprendentemente, estas células no respondieron al muscimol indicando que no cuentan con receptores GABA<sub>A</sub> funcionales. Adicionalmente se identificaron dos poblaciones de células GFAP<sup>+</sup>. En la primera población se observó la difusión de biocitina hacia células vecinas y la relación corriente-voltaje también fue de tipo lineal y no respondieron a la aplicación de los agonistas de los GABA<sub>A</sub>Rs. La segunda población presentó una relación de corriente-voltaje con rectificación saliente, respondió al agonista muscimol, y la biocitina no se difundió a células vecinas. Estas células fueron positivas al inmunomarcaje para NG2 y además se registraron corrientes postsinápticas espontáneas. Con base en estos resultados se concluyó que la señalización mediada por los GABA<sub>A</sub>Rs es selectiva para NG2-glia en la WMC.



## Abstract

The cerebellum is involved in the coordination of movement. Its cellular composition is dominated by GABAergic neuronal types, and glial cells are known to express functional receptors. GABAergic signaling regulates cell proliferation, differentiation, and migration during neurodevelopment. However, little is known about the functional expression of GABA receptors in the cerebellar white matter (WM). Thus, the aim of this study was to test whether glial cells express functional GABA receptors during postnatal development (P7-P9) of cerebellar WM. Immunofluorescence showed that half of the astrocytes express GAD67, suggesting that GABA is synthesized by glial cells. Calcium imaging in cerebellar slices revealed that GABA and the GABA<sub>A</sub> agonist muscimol evoked calcium transients in sulforhodamine B negative cells, whereas the GABA<sub>B</sub> agonist baclofen failed to evoke responses in cerebellar WM. Whole-cell patch-clamp recordings of GFAP<sup>+</sup> cells showed dye coupling and a passive current-voltage relation typical of astrocytes. Surprisingly, these cells did not respond to muscimol. Two additional populations were identified as GFAP<sup>-</sup> cells. The first population showed dye coupling, slow decaying inward and outward currents with no voltage dependence and did not respond to GABA<sub>A</sub> agonists. The second population showed an outward-rectifying current-voltage relationship and responded to muscimol, but dye coupling was absent. These cells received synaptic input and were NG2<sup>+</sup>, but evoked calcium waves failed to modulate the frequency of sPSCs nor signaling into NG2 glia. We conclude that GABA<sub>A</sub> receptor-mediated signaling is selective for NG2 glia in the WM of the cerebellum.

## Introducción

El cerebelo es responsable de controlar el movimiento y mantener el equilibrio al integrar información sensorial procedente de distintas regiones del sistema nervioso central (SNC) y periférico. En su arreglo celular se pueden identificar siete tipos neuronales que incluyen a las neuronas granulares y unipolares que sintetizan y liberan glutamato, mientras que las neuronas de Purkinje, estrelladas, en cesta, de Lugaro y de Golgi sintetizan y liberan ácido gama-aminobutírico (GABA) (Takayama and Inoue, 2004).

Una región importante del cerebelo es la sustancia blanca cerebelosa, en esta región predominan las células gliales. Se sabe que los astrocitos tienen actividad neurogénica que está restringida del día postnatal 1 a 12 (P1-P12) en ratones. Durante este período postnatal, los astrocitos son la fuente de origen de las interneuronas que forman la capa molecular del cerebelo (Silbereis et al., 2009). Otro suceso importante que ocurre durante las primeras semanas postnatales en el cerebelo del ratón es la mielinización. La cual se origina con el desarrollo de los oligodendrocitos. Los oligodendrocitos son la principal población celular en la WM (Sturrock, 1976; Reyes-Haro et al., 2013); se sabe que estas células se originan a partir de la glía NG2 (Nishiyama et al., 2016). Las células precursoras de oligodendrocitos (OPCs), son inmunopositivas al proteoglicano NG2 y se diferencian en oligodendrocitos a partir del día postnatal 12 (Foran and Peterson, 19920; Nishiyama et al., 2016). Por otro lado, se sabe que la señalización de GABA a través de los receptores de GABA<sub>A</sub> (GABA<sub>A</sub>Rs) está involucrada en la proliferación, diferenciación y migración celular de los precursores neuronales y gliales (Bolteus, 2004, Kilb et al., 2013).

Clásicamente, las células precursoras neuronales de linaje astrocítico responden a GABA en otras regiones diferentes del cerebelo, como el hipocampo (Seri et al., 2001, Ge et al., 2006) y la zona subventricular de los ventrículos laterales ((Bolteus, 2004, Liu et al., 2005). La expresión funcional de GABA<sub>A</sub>Rs también ocurre en la glía de Bergmann (Müller et al., 1994), las células endimales de la zona periventricular del cerebelo (Reyes-Haro et al., 2013) y en cultivos primarios de astrocitos del cerebelo (Pétriz et al., 2014). La expresión funcional de GABA<sub>A</sub>Rs en la glía NG2 de la sustancia blanca del cerebelo se describió con anterioridad (Zonouzi et al., 2015). No obstante, se desconoce si

la expresión de los GABA<sub>A</sub>Rs se presenta en otros tipos de glía en sustancia blanca cerebelosa, lo cual implicaría que GABA podría ser empleado por las células locales para regular procesos de neurogénesis, migración, transformación o mielinización.

## I. Antecedentes

### 1.1 El cerebelo

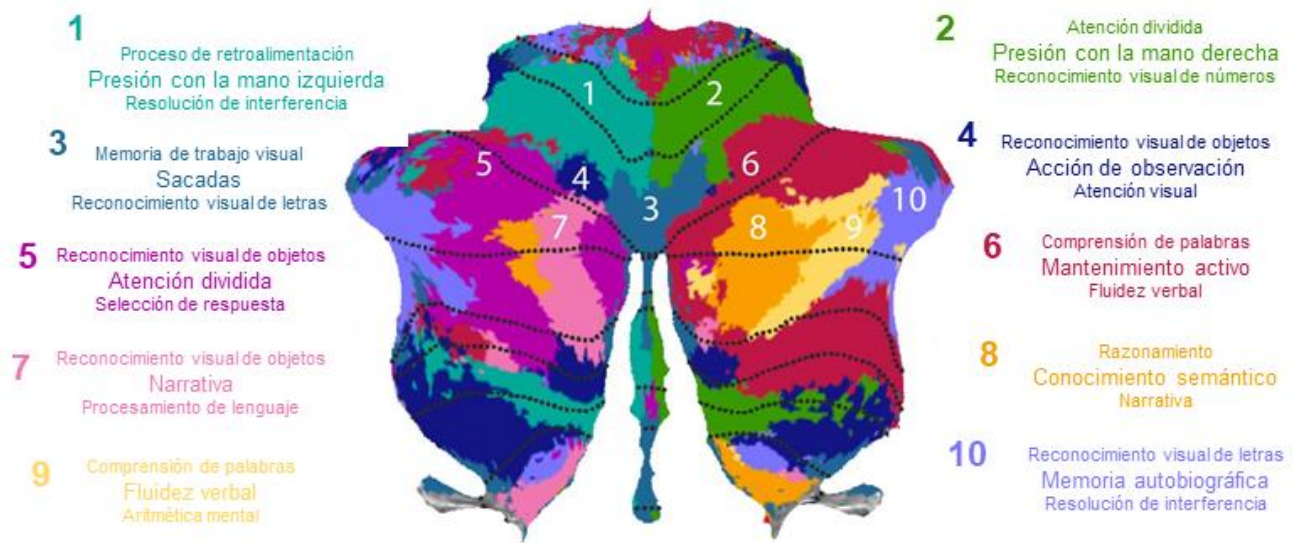
El cerebelo es parte del sistema nervioso central, consta de dos hemisferios cerebelosos y una parte intermedia denominada vermis. Conforman una porción del rombencéfalo y se encuentran localizados en la parte inmediatamente superior de la médula espinal, apoyados sobre el cuarto ventrículo en la parte posterior de la cavidad craneana, unidos al tronco del encéfalo por materiales fibrosos de sustancia blanca llamados pedúnculos cerebelosos (Purves, 2004).

El cerebro-cerebelo, ocupa la mayor parte del hemisferio lateral y recibe señales de varias áreas de la corteza cerebral; sus funciones son principalmente la regulación de movimientos que requieren de gran habilidad espacial y temporal, en especial el planeamiento y la ejecución de secuencias de movimiento, por ejemplo, el habla (Purves, 2004; King et al., 2019).

El vestíbulo-cerebeloso, que comprende los lóbulos caudales del cerebelo e incluye el flóculo y el nódulo, recibe señales del núcleo vestibular, se ocupa primordialmente de la regulación de movimientos relacionados con la postura y el equilibrio (Purves, 2004).

Por último, el espino-cerebelo ocupa la zona media y paramedia de los hemisferios y recibe señales directamente de la médula espinal, su parte lateral se encarga de los movimientos gruesos como los de las extremidades al caminar y su parte central, llamada vermis, se ocupa esencialmente de los movimientos de los músculos proximales y del movimiento ocular (Purves, 2004; King et al., 2019).

No obstante, diversos estudios sugieren que el cerebelo posee un rol importante en funciones cognitivas como la atención, el procesamiento del lenguaje, el aprendizaje e implicaciones en la memoria, el habla, la atención y las emociones (Strick et al., 2009; King et al., 2019).



**Figura A1. Representación de las regiones del cerebelo involucradas con distintas funciones.** Distintas regiones del cerebelo participan en funciones no clásicamente atribuidas al cerebelo. Los colores y números representan las correlaciones de actividad entre la región mostrada y el comportamiento escrito en el color correspondiente usando resonancia magnética funcional las cuales pueden ser divididas en 10 zonas. Las líneas representan las distintas regiones y lóbulos del cerebelo, interesantemente las funciones no necesariamente están restringidas a un mismo lóbulo. Además de las funciones clásicamente reconocidas en el cerebelo, como el mantenimiento del equilibrio y la regulación de movimientos finos, el cerebelo participa en funciones de aprendizaje, lenguaje, cognición, vista, memoria entre otras (modificado de King et al., 2019).

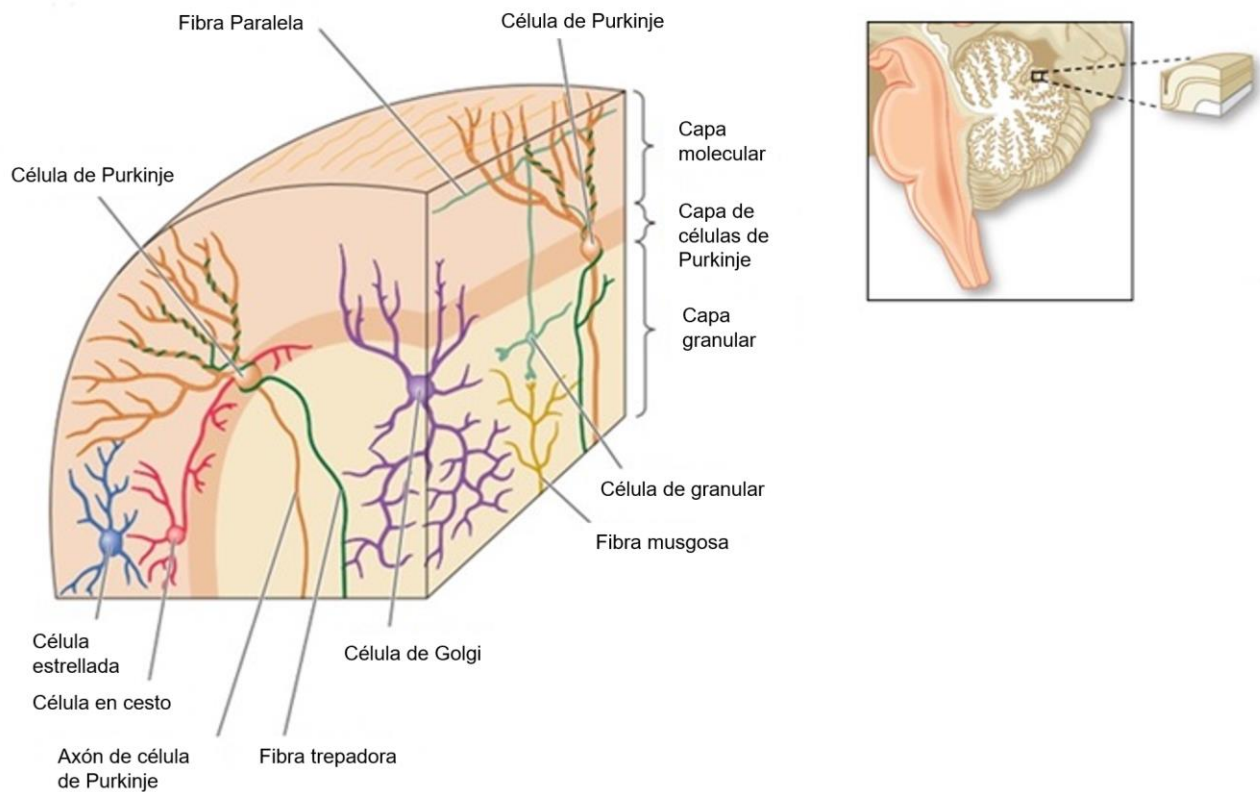
La función primaria del cerebelo es evaluar la información sensorial o cortical prediciendo las consecuencias de un movimiento y reaccionando en respuesta a ello (Bastian, 2011). Los daños al cerebelo no suelen producir parálisis, solo movimientos torpes, mal coordinados o con una percepción espaciotemporal disminuida.

## 1.2 Organización cerebelar

La composición celular del cerebelo consiste en una capa externa de sustancia gris y un núcleo de sustancia blanca. La sustancia gris se divide en 3 estratos: la capa exterior denominada capa molecular,

una capa intermedia llamada capa de células de Purkinje y la capa interna, llamada capa de células granulares (Purves, 2004).

La capa molecular contiene principalmente prolongaciones celulares y pocos somas neuronales, su espesor aproximado es entre 300 y 400  $\mu\text{m}$  y está cubierta por la pía madre. En ella se ubican las células estrelladas, las células en cesta. Además, las fibras paralelas y las fibras trepadoras arriban como aferencias (Purves, 2004). La capa de Purkinje se constituye por los somas de las células de Purkinje dispuestos de manera que forman una lámina celular. Además de las células de Purkinje se encuentra la glía de Bergman (Purves, 2004). La capa granular es la capa más profunda de la corteza, posee una anchura variable entre 500  $\mu\text{m}$  en zonas convexas y 100  $\mu\text{m}$  en surcos; ahí se ubican las células granulares. En esta capa se encuentran también las células de Golgi y los astrocitos velados. Las aferencias que llegan a esta capa son las fibras trepadoras y fibras musgosas (Purves, 2004). La sustancia blanca está constituida por axones junto con células gliales: astrocitos, glía NG2, oligodendrocitos y microglía (Purves, 2004).



**Figura A4. Organización de la corteza cerebelar.** La corteza cerebelar se compone de 3 capas, la capa más externa llamada capa molecular contiene las células estrelladas y las células en cesta, estas últimas proyectan axones que comunican con las células de Purkinje, también es la capa en la cual las células granulares proyectan las fibras paralelas, las cuales forman un circuito que comunica con las células estrelladas. La capa media es llamada capa de células de Purkinje la cual alberga las células con el mismo nombre, estas células reciben información de las células de la capa molecular y proyectan axones al núcleo profundo del cerebelo, adicionalmente reciben aferencias de la oliva superior de manera directa a través de las fibras trepadoras. Finalmente, la capa granular contiene las células Granulares, las células de Golgi y las fibras musgosas, las cuales son aferencias que llegan a la capa granular desde el núcleo profundo (modificado de Purves, 2004).

### 1.3 Ácido $\gamma$ -aminobutírico (GABA)

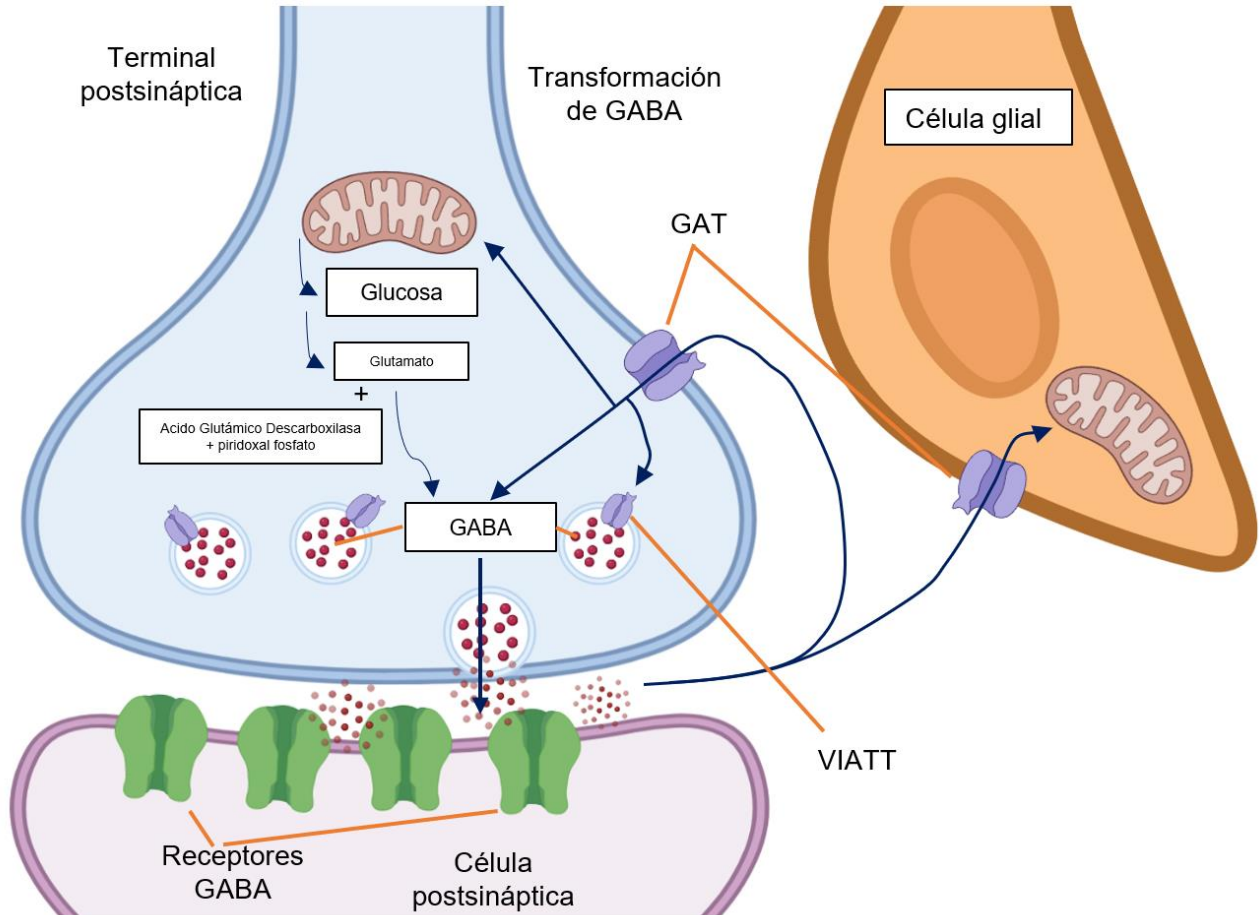
El GABA es un regulador crítico durante el desarrollo neuronal, restringiendo la proliferación y migración de células precursoras adultas y embrionarias (Zonouzi et al., 2015). En el cerebelo, 5 de

los 7 tipos neuronales descritos sintetizan GABA. Un aminoácido de cuatro carbonos que actúa como un neurotransmisor inhibitorio en la mayor parte de las sinapsis en el cerebro y la médula espinal y se encuentra especialmente en altas concentraciones en el cerebelo (Bear, 2007).

El precursor predominante para la síntesis de GABA es el glutamato el cual es descarboxilado por la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD). El glutamato por su parte puede obtenerse a partir de la glucosa que es catabolizada por la vía de los ácidos tricarboxílicos para posteriormente obtener piruvato. La GAD se encuentra preferencialmente en las neuronas GABAérgicas, aunque puede ser encontrada en otros tipos de neuronas no GABAérgicas. Se han identificado dos isoformas: GAD65 y GAD67, las cuales son producto de diferentes genes (GAD1 y GAD2, respectivamente) y difieren en tamaño molecular 65 y 67 kDa respectivamente, de ahí su nombre (585 y 594 aminoácidos respectivamente) y en presencia del cofactor piridoxal fosfato cataliza la descarboxilación de ácido glutámico en GABA y CO<sub>2</sub>. La GAD67 es una enzima principalmente citosólica la cual se distribuye en neuronas GABAérgicas, glía y está presente en cuerpos celulares y dendritas así como procesos axonales. Por otro lado, la GAD65 se encuentra de manera predominante en terminales nerviosas anclada a membranas vesiculares. La isoforma GAD65 es más dependiente de la presencia exógena de piridoxal fosfato que la GAD67 (Esclapez et al., 1994; Tavazzani et al., 2014). Una vez sintetizado el GABA se transporta para su almacenamiento en las vesículas presinápticas mediante VGAT. Ante una señal presináptica, el GABA será liberado sinápticamente mediante exocitosis para ejercer una acción postsináptica. Una ruta alternativa de producción de GABA, tanto en las neuronas como en la glía, es mediante la transformación de putrescina en GABA sintetizado por la enzima monoamina oxidasa (MAO). El GABA producido se libera mediante el canal bestrophin1 (Best1) mediando la inhibición tónica en el cerebelo (Yoon et al., 2014)

El mecanismo de remoción y recuperación de GABA requiere de transportadores de alta afinidad para GABA denominados GAT, transportadores presentes tanto en las neuronas como en la glía. A la fecha se conocen 4 genes que codifican para los transportadores GAT (GAT-1 a GAT-4), cada uno con características particulares en las secuencias de aminoácidos y sus propiedades farmacológicas. En el sistema nervioso central, GAT-1 y GAT-3 son los principales transportadores por afinidad de GABA. El GAT-1 tiene una amplia expresión en las neuronas, los

astrocitos, glia-NG2 y oligodendrocitos en sustancia blanca cortical. Mientras que GAT-3 solo se expresa en los astrocitos al menos, en el cerebelo (Fattorini et al., 2017; Yan and Ribak, 1998).



**Figura A5. Síntesis, almacenamiento, liberación y recuperación de GABA en el SNC.** El precursor predominante para la síntesis de GABA es la glucosa, que es metabolizada en glutamato por la enzima ácido glutámico descarboxilasa (GAD), que cataliza la conversión de glutamato en GABA. La GAD requiere el cofactor, fosfato de piridoxal, para su actividad. Una vez que se sintetiza el GABA, se transporta a las vesículas sinápticas a través de un transportador vesicular de aminoácidos inhibidores (VIATT).

El GABA ejerce su acción a través de la activación de receptores de tipo ionotrópico o metabotrópico. Los receptores ionotrópicos GABA<sub>A</sub> son canales activados por ligando en los que su permeabilidad a cloro produce una hiperpolarización en las neuronas, lo que resulta en la inhibición del potencial de acción. Los receptores GABA<sub>B</sub> son miembros de la súper familia de receptores con siete pasas transmembranales, acoplados a proteínas G heterotriméricas. La actividad de los receptores GABA<sub>B</sub>



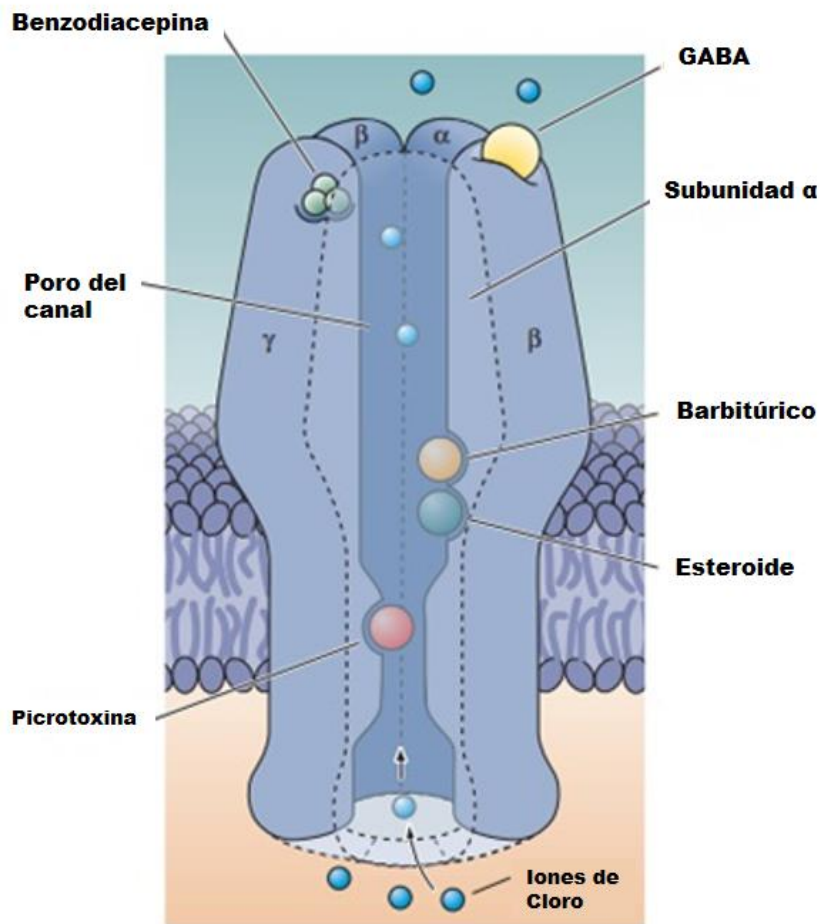
está mediada por la activación de proteínas G pertenecientes a la familia de las proteínas sensibles a la toxina pertussis; sus mecanismos efectores incluyen la actividad del adenilato ciclasa y las proteínas cinasas asociadas caseína cinasa II y proteína cinasa C que modulan la apertura de los canales presinápticos de potasio, con lo que regula la inhibición de largo plazo (Kaupmann et al., 1997). Los receptores GABA<sub>B</sub> son activados de manera selectiva por el agonista baclofeno y son insensibles a los moduladores (como las benzodiazepinas) y antagonistas del receptor GABA<sub>A</sub>.

#### 1.4 Receptores GABA<sub>A</sub>

El receptor GABA<sub>A</sub> es un receptor transmembranal ionotrópico pentamérico, que consiste en 5 subunidades acomodadas alrededor de un poro central que regula el paso de iones de manera selectiva. Usualmente se encuentran ubicados en la membrana postsináptica en las neuronas y glía, pero también pueden ubicarse extrasinápticamente (Cellot and Cherubini, 2013; Verkhratskiĭ and Butt, 2007). Estos receptores, son canales iónicos activados por ligando, su apertura ocurre tras la unión del ácido  $\gamma$ -aminobutírico, permitiendo el paso de iones de cloro (Cl<sup>-</sup>) a través de su poro. Dependiendo de la relación entre el potencial de membrana en reposo y el potencial de equilibrio de Cl<sup>-</sup> la membrana puede ser despolarizada o hiperpolarizada (MacVicar et al., 1989). Además, los receptores GABA<sub>A</sub> tienen relevancia clínica pues los barbitúricos y las benzodiazepinas ejercen un efecto modulador alostérico. La bicuculina y la picrotoxina son antagonistas selectivos del receptor GABA<sub>A</sub>.

#### 1.6 Arreglo clásico del receptor GABA<sub>A</sub>

Los receptores GABA<sub>A</sub> poseen la condición de tener al menos una subunidad  $\alpha$  adyacente a una beta. Debido a que el ácido  $\gamma$ -aminobutírico emplea como sitio de anclaje la interfaz entre estas subunidades y el canal no sería activable por GABA en la ausencia de ellas, excepto para los canales conformados por subunidades  $\rho$ . El arreglo clásico del receptor GABA<sub>A</sub> incluye dos subunidades  $\alpha$ , dos  $\beta$  y una  $\gamma$ , en ciertos casos la subunidad  $\gamma$  es sustituida por otras subunidades (Verkhratskiĭ and Butt, 2007).



**Figura A6 Representación esquemática de un receptor GABA<sub>A</sub> y algunos de sus ligandos y su sitio de anclaje.** El arreglo clásico del receptor GABA<sub>A</sub> consiste en 2 unidades α, 2 β y una γ. Este canal permea iones de cloro y posee sitios de anclaje para diversos fármacos de relevancia médica, como benzodiacepinas, barbitúricos o esteroides y es bloqueado por picrotoxina (modificado de Purves, 2004).

## 1.8 Glía

La glía suele ser organizada como macroglía y microglía, la primera integra a la astroglia, que realizan funciones estructurales, regulatorias, vasculares, entre otras; la oligodendroglía cuya principal función es el mielinizar axones y brindar soporte estructural, glía NG2, también llamadas OPCs o polidendrocitos, de las cuales se desconoce su función exacta en estadio maduro, pero se sabe que cuentan con la capacidad de dar origen a los oligodendrocitos por transformación directa. Por otra

parte, la microglía proviene de los macrófagos que invaden el cerebro durante el desarrollo temprano durante el día E9.5, son células de origen mesodérmico a diferencia de la macroglía; su función es integrar el sistema inmune del SNC (Cheung et al., 2009; Verkhatskiĭ and Butt, 2007).

## 1.12 Microglía

La microglía es una célula residente del cerebro que regula el desarrollo cerebral, el mantenimiento de las redes neuronales y la reparación de lesiones. La microglía actúa como macrófagos cerebrales, pero se distingue de otros macrófagos tisulares debido a su fenotipo homeostático único en el sistema nervioso central (SNC). Son responsables de la eliminación de microbios, células muertas, sinapsis redundantes, agregados de proteínas y otros antígenos particulados y solubles que pueden poner en peligro el SNC. Además, como fuente principal de citoquinas proinflamatorias, la microglía es un mediador fundamental de la neuroinflamación y puede inducir o modular un amplio espectro de respuestas celulares como inflamación inducida por el factor TNF $\alpha$  o neurotrofinas como BDNF que promueve supervivencia neuronal (Colonna and Butovsky, 2017; Verkhatskiĭ and Butt, 2007).

La microglía representa aproximadamente el 10% de las células y es el fagocito mononuclear más abundante en el sistema nervioso central (SNC). Durante el desarrollo, la microglía ayuda a dar forma a los circuitos neuronales modulando la fuerza de las transmisiones sinápticas y esculpiendo las sinapsis neuronales (Colonna and Butovsky, 2017; Verkhatskiĭ and Butt, 2007).

Un dato importante es que la evidencia experimental de expresión de receptores GABA<sub>A</sub> en la microglía es limitada, si bien se ha demostrado que responde a GABA, esta respuesta es mediada por receptores GABA<sub>B</sub> (Logiacco et al., 2021). Respuestas a muscimol han sido documentadas, pero se ha mostrado que estas respuestas son indirectas y no debido a la expresión de receptores GABA<sub>A</sub> en la microglía (Cheung et al., 2009). Por ello este tipo celular fue excluido de este trabajo.

### 1.12.1 Desarrollo de los fagocitos mononucleares del SNC

El SNC está dotado de una red difusa y eficiente de fagocitos mononucleares. La microglía es la célula más abundante de esta red. Los estudios de mapeo de destinos han demostrado que la microglía se origina a partir de progenitores mieloides tempranos en el saco vitelino embrionario que migran al tubo neural en desarrollo. Una vez llegan al saco vitelino, proliferan, colonizan todo el parénquima y

subsisten durante toda la vida del organismo mediante una división lenta. Los precursores mieloides derivados de la médula ósea no contribuyen al conjunto de la microglía (Colonna and Butovsky, 2017).

## 1.9 Astroglía

Son la segunda población más grande de células gliales en el SNC después de los oligodendrocitos, comprendiendo alrededor del 20% al 40% del total de células gliales en ratones (von Bartheld et al., 2016). Una característica de la astroglía es la expresión de filamentos intermedios, los cuales forman su citoesqueleto. Los principales tipos de proteínas que forman filamentos intermedios en la glía son la Proteína Acido Glial Fibrilar (GFAP) y la vimentina. La expresión de GFAP es usada comúnmente como un marcador específico para la identificación de la astroglía, sin embargo la expresión de esta proteína varía en distintas regiones del cerebro (Verkhatskiĭ and Butt, 2007).

La astroglía incluye distintos tipos de células gliales que tienen en común la expresión de GFAP: astrocitos fibrosos (sustancia blanca), astrocitos protoplasmáticos (sustancia blanca), glía radial y células endodiales.

Las funciones de los astrocitos son muchas y son totalmente indispensables para el funcionamiento del cerebro. Los astrocitos mantienen el ambiente adecuado para el funcionamiento neuronal. Forman la microarquitectura de la parénquima cerebral, mantienen la homeostasis cerebral, almacenan y distribuyen sustratos energéticos, controlan el desarrollo de células neurales, proporcionan mantenimiento sináptico y contribuyen en la defensa del cerebro siendo un elemento conformacional de la barrera hematoencefálica (Verkhatskiĭ and Butt, 2007).

Astrocitos protoplásmicos: Están presentes en la sustancia gris y tienen varios procesos finos de aproximadamente 50  $\mu\text{m}$  de longitud. (Oberheim et al., 2012; Verkhatskiĭ and Butt, 2007).

Astrocitos fibrosos: están presentes en la sustancia blanca, poseen procesos de hasta 300  $\mu\text{m}$  de longitud, pero son menos ramificados que los procesos de los astrocitos protoplasmáticos. (Oberheim et al., 2012; Verkhatskiĭ and Butt, 2007).

Glía radial: Son células bipolares, cada una con un cuerpo celular ovoide y procesos elongados. La glía radial es comúnmente una característica del cerebro en desarrollo debido a que son las primeras células en desarrollarse de los progenitores neurales, con excepción de la glía de Bergmann y la glía de Müller que permanecen en el cerebro adulto. En etapas muy tempranas del desarrollo embrionario la glía radial también forma un andamio el cual asiste a la migración neuronal. Después de la maduración del cerebro, la glía radial desaparece de muchas regiones y se transforma en astrocitos estrellados (Verkhatskiĭ and Butt, 2007).

Células endimales: Se encuentran en las paredes de los ventrículos en el cerebro y en el canal central de la espina dorsal. Están involucradas en la producción y el movimiento del fluido cerebroespinal. Forman una capa de separación entre el fluido cerebroespinal y los compartimientos celulares del sistema nervioso central, permitiendo un intercambio de sustancias entre ambos compartimientos (Verkhatskiĭ and Butt, 2007).

El cerebelo contiene glía radial especializada llamada glía de Bergmann, la cual tiene cuerpos de aproximadamente 15  $\mu\text{m}$  de diámetro y entre 3 y 6 procesos que se extienden de la capa de células de Purkinje a la capa de la superficie pial. La glía de Bergman al igual que otros tipos de glía radial tiene la capacidad de funcionar como precursor de astrocitos y neuronas por división asimétrica o por transformación directa en el caso de los astrocitos (Verkhatskiĭ and Butt, 2007).

Un tipo especializado de astrocitos en el cerebelo son los astrocitos velados, los cuales forman una cobertura rodeando neuronas granulares cerebelosas siendo que cada astrocito velado envuelve una sola neurona granular.

### 1.10 Oligodendrocitos

Los oligodendrocitos se definen por su función característica de la producción de las vainas de mielina que aíslan los axones en el sistema nervioso central (SNC), lo que acelera la propagación del potencial de acción y permite la sincronización del impulso nervioso que proviene de los ensambles neuronales promoviendo la conectividad cerebral (Reyes-Haro et al., 2021). La plasticidad del cerebro incluye la mielinización, un proceso que inicia en la etapa temprana del neurodesarrollo postnatal y continúa hasta la etapa adulta en el ser humano (Reyes-Haro et al., 2021).

Los oligodendrocitos rodean selectivamente los axones con diámetros superiores a 0,2  $\mu\text{m}$ . Las claves moleculares de este reconocimiento siguen siendo desconocidas. Curiosamente, los oligodendrocitos sólo tienen un breve periodo de tiempo para la mielinización dependiente de la madurez neuronal. Este periodo ocurre al principio de la diferenciación, y son relativamente incapaces de mielinizar una vez que han madurado (Bradl and Lassmann, 2010).

### 1.11 Glía NG2

La glía NG2 recibe su nombre con base en la expresión del proteoglicano "Neuron-Glia 2"; también se les conoce con el nombre de polidendrocitos, tienen forma de estrella con una alta densidad de ramificaciones. Son un tipo de células que han captado la atención en los últimos años debido a que es el único tipo glial que recibe contacto sináptico, se distribuyen en la sustancia blanca y gris, y se sabe que son células precursoras de oligodendrocitos (OPCs). Las células NG2 constituyen un 5-10% del número total de células en el SNC (Nishiyama et al., 2016) la glía NG2 en la sustancia gris en adultos se encuentra entre el 2-3% mientras que en la sustancia blanca es alrededor del 8-9%.

La glía NG2 posee características especiales que la diferencian de otros tipos gliales. Un ejemplo de ello es la expresión del proteoglicano NG2 y del receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas A (PDGFR $\alpha$ ): La glía NG2 da lugar a los oligodendrocitos pero no es positiva a algunos de sus marcadores y sólo tienen un 50% de posibilidades de generar uno de ellos. La glía NG2 no expresa GFAP, pero, algunos de ellos pueden expresar S100B (otro marcador de astroglia); también son negativos a IBA-1 o CD-45 (marcadores de microglía). En conjunto, estas características generan la necesidad de crear un cuarto tipo glial en el SNC.

La proporción de glía NG2 supera a la población de oligodendrocitos, en la etapa de desarrollo postnatal temprano, previo al inicio de la mielinización (<P12). En esta etapa el ciclo celular de la glía NG2 se completa en 2-3 días; posteriormente los OPCs comienzan a diferenciarse y la proporción cambia rápidamente en favor de los oligodendrocitos (>P12). A medida que el cerebro envejece la velocidad de proliferación de la glía NG2 disminuye y se calcula que sólo un 50% de la glía NG2 entra en el ciclo celular con una duración aproximada de 70 días en la corteza y en el cuerpo calloso (Kukley et al., 2008; Psachoulia et al., 2009).

Una característica adicional que define a la glía NG2 es que no forma un sincicio, pues la difusión de biocitina hacia células vecinas no se observa como sucede con la oligodendroglía y la astrogía gracias a la expresión de conexinas que permiten el establecimiento de uniones comunicantes (gap junctions). Aunque una proporción reducida de glía NG2 expresa la Cx32 en el giro dentado.

### 1.11.1 Características electrofisiológicas de la NG2

Los estudios electrofisiológicos de célula completa revelaron que la glía NG2 tiene un potencial de membrana de -70 a -90 mV, mientras que la resistencia de membrana oscila entre los 100-500 M $\Omega$ , con una capacitancia aproximada de 25 pF. Sin embargo, estos parámetros varían dependiendo de la región del cerebro y la edad del individuo. Por ejemplo, la glía NG2 de la sustancia blanca registrada durante el desarrollo postnatal temprano (P5-P10) presentó una capacitancia menor, de 8 pF, una resistencia de membrana superior a 1 G $\Omega$  y potenciales de membrana inferiores a -75 mV (Chittajallu et al., 2004).

El potencial de membrana en reposo de estas células está cerca del calculado para el K<sup>+</sup>, lo que sugiere que estos canales están abiertos en reposo, concretamente el canal Kir4.1 de rectificación hacia dentro y el canal K<sup>+</sup> de dos poros (K2P) (Larson et al., 2017, Verkhratsky y Butt, 2013).

La NG2-glía tiene canales de potasio tipo A, caracterizados por una rápida activación e inactivación (Kv3.3, Kv4.2 y Kv4.3), canales K<sup>+</sup> rectificadores retardados que poseen su nombre a una activación lenta y sin inactivación (Kv1.3, Kv1.5, Kv1.6, Kv2.1, Kv6.8 y Kv7.2), rectificadores internos con dos poros (K2p1.1, K2p2.1 y K2p10.1) y sus canales más expresados Kir4.1 y KCa $\beta$ 4 (Larson et al., 2016). La expresión de estos canales es la razón del potencial de membrana de la NG2-glía.

La NG2-glía expresa canales de Na<sup>+</sup> sensibles a la tetrodotoxina (TTX) y activados por voltaje (Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.8). Curiosamente estos canales están presentes en las neuronas y son esenciales para el disparo de potenciales de acción. Sin embargo, a pesar de tener la maquinaria necesaria para producir potenciales de acción, no se han observado en las células maduras de la NG2-glía sino en la NG2-glía de ratones de edad P5-P8. La NG2-glía muestra algunas características diferentes en comparación con los potenciales de las neuronas, como una amplitud más pequeña, una cinética más lenta y el disparo de un solo pico (De Biase et al., 2010; Larson et al., 2016; Verkhratskiĭ and Butt, 2007).

## Antecedentes

Una zona importante del cerebelo es la WMC, en esta zona predominan distintas poblaciones de células gliales y axones. La de mayor abundancia está integrada por las células precursoras de oligodendrocitos (OPCs), que son inmunopositivas al proteoglicano NG2 y se diferencian en oligodendrocitos a partir del día postnatal 12 (Foran and Peterson, 1992; Nishiyama et al., 2016). Adicionalmente, se identificó una población GFAP<sup>+</sup> con actividad neurogénica restringida (P1-P12). La expresión de GAD67 es una de las características de esta población de precursores neuronales (Yamanaka et al., 2004), que migran hacia la capa molecular para dar origen a las células estrelladas y en cesta durante los primeros 21 días postnatales (Silbereis et al., 2009). Adicional a la expresión de GAD67, las células precursoras de linaje astrocítico responden a GABA en otras regiones del cerebro, como el hipocampo (Ge et al., 2006; Seri et al., 2001) y la zona subventricular (Bolteus, 2004; Liu et al., 2005); mientras que esto se desconoce para las células GFAP<sup>+</sup> de la WMC.

La expresión funcional de los GABA<sub>A</sub>Rs también ocurre en la glía de Bergmann (Muller et al., 1994), las células endociliales de la zona periventricular del cerebelo (Reyes-Haro et al., 2013a) y en cultivos primarios de astrocitos del cerebelo (Pétriz et al., 2014). La expresión funcional de GABA<sub>A</sub>Rs en la glía NG2 de la sustancia blanca del cerebelo se describió con anterioridad (Zonouzi et al., 2015). No obstante, se desconoce si la expresión de los GABA<sub>A</sub>Rs se presenta en otros tipos de glía en la WMC. Esta señalización GABAérgica podría ser relevante durante el neurodesarrollo postnatal temprano del WMC. Las células gliales responden a la actividad neuronal con transitorios de calcio que se propagan a células vecinas (onda de calcio) (Bazargani and Attwell, 2016; Schipke et al., 2002) que está implicada en la proliferación, migración y diferenciación de las células precursoras neuronales (Weissman et al., 2004). Por otra parte, algunos estudios indican que la señalización a través de los receptores de GABA<sub>A</sub> (GABA<sub>A</sub>Rs) también está implicada en estos eventos (Bolteus, 2004; Gutiérrez-Castañeda et al., 2022; Kilb et al., 2013).



## Justificación

Durante el desarrollo postnatal temprano de la WMC ocurren eventos de proliferación, migración y diferenciación de los precursores neuronales y de los gliales. La señalización GABAérgica regula parte de estos procesos. Sin embargo, se desconoce si la expresión funcional de los receptores GABA ocurre para los distintos tipos gliales residentes en la WMC.

## Objetivo general

Investigar si los receptores a GABA son expresados en la WMC durante el desarrollo postnatal temprano del ratón.

## Objetivos específicos

- Investigar si hay expresión de GAD67 antes y durante la mielinización de la WMC.
- Investigar si hay expresión funcional de receptores GABA<sub>B</sub>.
- Investigar si hay expresión funcional de receptores GABA<sub>A</sub>.
- Identificar el o los tipos celulares que expresan receptores funcionales a GABA con base en su perfil electrofisiológico, morfológico o expresión de antígenos.

## II. Materiales y métodos

### 2.1 Preparación de rebanadas de cerebelo

Los experimentos se realizaron de acuerdo con las normas aprobadas por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del Instituto de Neurobiología. Se utilizaron ratones de la cepa CD1 o transgénicos GFAP-eGFP del día postnatal 7 al 9 (P7-P9) utilizando el protocolo previamente reportado (Nolte et al., 2001; Reyes-Haro et al., 2013a). Brevemente, los ratones fueron decapitados para aislar rápidamente los cerebros en líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF, por su siglas en inglés), a 4°C, con una composición (en mM): NaCl 134; KCl 2.5; MgCl<sub>2</sub> 1.3; CaCl<sub>2</sub> 2; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1.25; NaHCO<sub>3</sub> 26; D-glucosa 10; pH 7.4. Esta solución amortiguadora se oxigenó con carbógeno (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) y se utilizó para obtener rebanadas coronales del cerebelo (250 µm de grosor) con un vibratomo (VS100, Leica). Las rebanadas se transfirieron a una cámara de recuperación con aCSF oxigenado, a temperatura ambiente (~20-22°C) por al menos 30 minutos antes de iniciar con los experimentos. Posteriormente, las rebanadas se transfirieron a la cámara de registro montada en la platina de un microscopio vertical de inmersión (Olympus BX51) en donde fueron continuamente perfundidas con aCSF oxigenado. Los estudios de fijación de voltaje en las células gliales del cerebelo se realizaron de manera unitaria por rebanada. De esta manera “n” corresponde al número de rebanadas y “N” al número de ratones utilizados.

## 2.2 Tinción de astrocitos con sulforodamina

Los ratones se inyectaron intraperitonealmente con sulforodamina B (SRB; 20 mg / kg, Sigma S1402) 4 h antes de la preparación de los cortes cerebrales: este enfoque fue altamente eficiente para la tinción de astrocitos como se informó anteriormente (Appaix et al., 2012).

## 2.3 Difusión de biocitina a células vecinas y *patch-clamp* de célula completa

Las pipetas de registro se obtuvieron a partir de capilares de borosilicato (diámetro interno de 0,86 mm; diámetro externo de 1,5 mm; Sutter) usando un *Puller* de pipetas P-97 (Sutter) y se llenaron con una solución interna que consta de (en mM): NaCl 4; KCl 120; MgCl<sub>2</sub> 4; CaCl<sub>2</sub> 0.5; Hepes 10; EGTA 5; D-glucosa 5; 0.5% de biocitina (B4261, Sigma) a pH 7.4. La resistencia de las pipetas de registro fue de 5 a 8 MΩ. Al inicio del registro celular se aplicó un protocolo de pulsos de voltaje desde -140 a +60 mV con incrementos de 20 mV y una duración de 60 ms, partiendo de un potencial de mantenimiento de -70 mV; este protocolo nos permitió obtener el perfil de la corriente de las células registradas. El protocolo descrito se aplicó con ayuda de un amplificador EPC10-USB (HEKA), las corrientes fueron registradas a una frecuencia de 20 KHz y se filtraron a 2.9 kHz para las corrientes postsinápticas espontáneas; mientras que para las corrientes evocadas por aplicación extracelular de agonistas la frecuencia de muestreo utilizada fue de 5 KHz y se filtraron a 2.9 kHz. Los registros fueron monitoreados durante todo el experimento a través del software PatchMaster (HEKA). En

algunos experimentos se adicionó SRB al 0.1% a la solución intracelular, lo que permitió observar la morfología celular en primera instancia, mientras que la biocitina se reveló post-registro después de fijar la rebanada y realizar el protocolo de inmunofluorescencia correspondiente. Para más detalles sobre el análisis de las señales de calcio, ver apéndice Análisis de Patch.

Para determinar el potencial de inversión de la corriente entrante inducida por la aplicación extracelular de muscimol 50  $\mu\text{M}$  se utilizó un protocolo de pulsos de voltaje continuos desde -130 a 50 mV con incrementos de 30 mV a una periodicidad de 7 segundos.

#### *Inmufluorescencia para biocitina*

Posterior al registro intracelular, las rebanadas se fijaron en una solución amortiguadora de fosfatos de sodio (0.1 M) con paraformaldehído al 4%, a un pH de 7.4, durante 1-2h a 4°C y se procesaron para inmunofluorescencia. Las rebanadas se lavaron con PBS y posteriormente se incubaron en una solución que contenía 1% de Triton X-100 (TX-100), 5% de suero de burro y 10% de suero fetal bovino (FBS) en PB, a pH 7,4, durante 4 h para permeabilizar y bloquear la unión no específica. Finalmente, la biocitina se marcó con estreptavidina conjugada con DyLight 594 (1: 200, Vector Labs, SA-5594) para revelar si la célula registrada estaba acoplada o no a otras células.

#### 2.4 Imagen de calcio

El indicador fluorescente de calcio Fluo-4 AM (10  $\mu\text{M}$ , Life Technologies, Ex 495/506 nm) se adicionó al aCSF para incubar las rebanadas durante 30 minutos en una incubadora a 37 °C con una oxigenación continua (95% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub>). Posteriormente, el tejido se lavó con aCSF oxigenado durante al menos 20 minutos y se mantuvo en la cámara de recuperación/reposo hasta su uso para los estudios de imagen de calcio. Brevemente, las rebanadas se transfirieron a la cámara de registro en donde fueron perfundidas constantemente con aCSF oxigenado, a una velocidad de 2-3ml/min a temperatura ambiente. Las rebanadas se visualizaron con el microscopio vertical Olympus BX51WI y el sistema de LEDs de fluorescencia XCite XLED1 (Excelitas Technologies), este último acoplado al microscopio a través de una fibra óptica lo que permitió excitar el Fluo 4AM (Ex488- Em 518). La siguiente mezcla de antagonistas fue adicionada al aCSF: TTX 1  $\mu\text{M}$  (tetrodotoxina), CNQX 50  $\mu\text{M}$  (hidrato de sal disódica de 6-ciano-7-nitroquinoxalina-2,3-diona, Sigma, C239), MK-801 100 100M

((+) - MK-801 maleato de hidrógeno, Sigma, M107) y estriknina 2  $\mu\text{M}$  (clorhidrato de estriknina, Sigma, S8753). Bajo este diseño experimental se eliminó la contribución indirecta de la actividad neuronal sobre las respuestas evocadas por aplicación de GABA 500  $\mu\text{M}$  (Sigma, A2129), muscimol 50  $\mu\text{M}$  (Sigma, M1523), baclofeno 20  $\mu\text{M}$  (Sigma, G013), ATP 100  $\mu\text{M}$  (Sigma, A3377). Las imágenes se adquirieron con una frecuencia de 1 Hz por 300 s, utilizando un objetivo de inmersión 20x Olympus (0.25 NA). Para detalles sobre el análisis de las señales de calcio, ver apéndice Análisis de Calcio.

### *Onda de calcio*

El proceso de preparación de las rebanadas fue el mismo usado para electrofisiología e inyección de biocitina. El protocolo de despolarización consistió en un tren de 20 pulsos de 200  $\mu\text{A}$  a 10 Hz (estimulador de corriente aislado DS3, Digitimer Ltd) con un electrodo de vidrio lleno de aCSF que tenía un diámetro de  $\sim 20$   $\mu\text{m}$ . La pipeta se colocó suavemente en la parte superior de la rebanada tocando la capa celular superior. Se permitió que la rebanada se recuperara del estrés mecánico durante al menos 5 min. El protocolo de despolarización consistió en 200s, durante los primeros 80s se registró la actividad basal de la rebanada y la onda de calcio se indujo durante los segundos 81-82 para posteriormente registrar la recuperación de los transitorios de calcio evocados a la basal. Los videos de estos experimentos fueron analizados con el FIJI. Para visualizar los cambios espaciales y temporales en el calcio resultantes de la actividad provocada, las secuencias se procesaron para resaltar los cambios en la intensidad de fluorescencia entre tomas. Se seleccionaron las regiones de interés sobre el campo de visión y se midió la intensidad media de píxeles en cada cuadro. Los datos se trazaron primero como intensidad de fluorescencia frente al tiempo y posteriormente se convirtieron a una escala relativa ( $\Delta F/F$  de referencia).

### 2.5 Inmunofluorescencia

La identidad celular de las células registradas en la sustancia blanca cerebelosa se comprobó mediante estudios de inmunofluorescencia (ratón GFAP-EGFP) e inmunofluorescencia para NG2. En ambos casos las rebanadas se fijaron 1h en PFA-PB 0,1 M (pH 7,4), después se enjuagaron tres veces en PBS durante 10 minutos en cada lavado. A continuación, las rebanadas se incubaron en una solución que

contenía 1% de TX-100, 5% de suero de burro y suero fetal bovino (FBS) al 10% en PBS a pH 7,4, durante 2 h a temperatura ambiente. En el caso de las rebanadas GFAP-EGFP éstas se montaron para ser visualizadas al microscopio. En el caso de los registros de células con morfología y perfil de corriente correspondiente a la glía NG2, las rebanadas se incubaron en una solución que contenía el anticuerpo (Proteoglicano de sulfato de condroitina anti-NG2, conejo, 1: 250, AB5320, Merck Millipore) durante 48 h a 4 °C, se lavaron y se trasladaron a una solución con el anticuerpo secundario (Alexa 488 burro anti-conejo, 1: 500, Thermo Fisher) y estreptavidina conjugada con DyLight 594 (1: 200, Vector Labs, SA-5594) durante 36 h a 4 °C; después de lavar el tejido se montaron en portaobjetos que fueron sellados con Vectashield y un cubreobjetos. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio confocal Zeiss LSM 780 DUO con el software Zeiss Zen Black (Zeiss) y un objetivo de inmersión en aceite 25X (LCI Plan-Apochromat, NA 0.8) con DyLight 594 (láser DPSS, longitud de onda de excitación/ emisión 590/617 nm) y eGFP (láser de argón, longitud de onda de excitación/ emisión 488/511 nm).

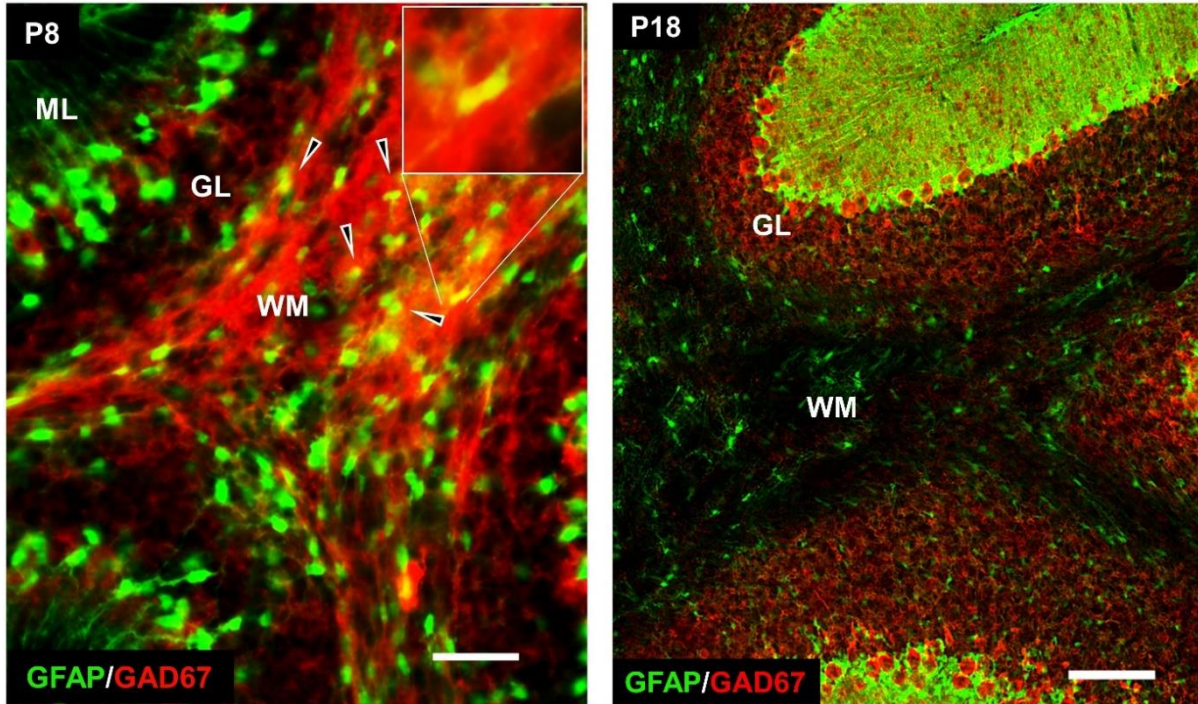
#### *Inmunofluorescencia para el reconocimiento de GAD67*

La inmunofluorescencia contra la enzima GAD67 se realizó con un método estándar para secciones fijas, en resumen, los ratones P7-9 GFAP-eGFP se perfundieron con PB 0.1 M y PFA 4%, los cerebros se extrajeron y se transfirieron a una solución crioprotectora (PB + 30 % de sucralosa) durante 3 días, se cortaron en un criostato (35 µm), luego, las secciones se lavaron, se incubaron en una solución que contenía 1% de TX-100, 5% de suero de burro y 10% de FBS en PBS a pH 7,4 , durante 2 h a temperatura ambiente, se lavó y se colocó en PB con el anticuerpo primario (anti-GAD67, ratón, 1: 500, MAB5406, Merk Millipore) durante la noche a 4 °C, después del lavado, se colocaron durante 2 horas en una solución con el anticuerpo secundario (Alexa 594, anti-ratón, 1: 1000, Thermo Fisher, R37115) a temperatura ambiente, lavado y montado.

### III. Resultados

#### 3.1 La enzima GAD67 está altamente expresada en la sustancia blanca cerebelosa

La señalización GABAérgica requiere la síntesis de GABA y nuestro primer abordaje fue investigar si la expresión de GAD67 se presentaba en la sustancia blanca cerebelosa en dos etapas del desarrollo postnatal temprano: previo (P8) y durante a la mielinización (P18). Los estudios se realizaron en cortes histológicos del ratón transgénico GFAP-EGFP, lo que nos permitió investigar la densidad de las células GFAP<sup>+</sup>. Los estudios histológicos revelaron que la densidad de los astrocitos fue notablemente mayor en P8 ( $1133 \pm 137$  células GFAP<sup>+</sup> / mm<sup>2</sup>) con relación a lo que se observó en P18 ( $616 \pm 132$  células GFAP<sup>+</sup> / mm<sup>2</sup>). Además, se realizaron estudios de inmunofluorescencia contra GAD67 y se encontró que el 54% de las células GFAP<sup>+</sup> fueron GAD67<sup>+</sup> ( $616 \times 137$  células GFAP<sup>+</sup> / GAD67<sup>+</sup> / mm<sup>2</sup>; n = 6; N = 4), lo que indica que una fracción de células gliales de la sustancia blanca cerebelosa, incluidos los astrocitos, pueden sintetizar GABA. De manera sorprendente, esta expresión de GAD67 en la sustancia blanca cerebelosa se muestra ausente en ratones P18, lo que indica que la expresión de GAD67 es relevante en la etapa previa al inicio de la mielinización



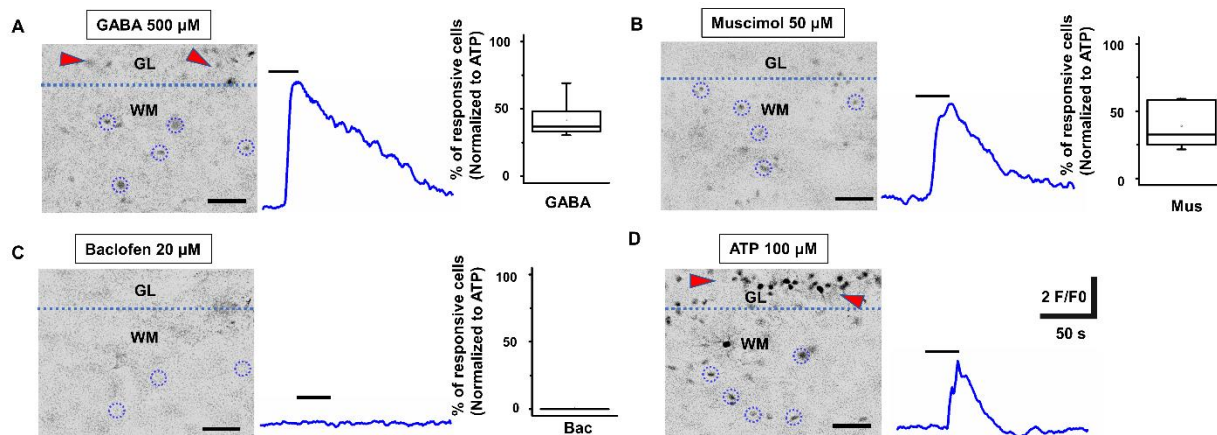
**Figura 1. Expresión de GAD67 en la sustancia blanca cerebelosa.** Inmunofluorescencia para GAD67 en la WM de ratones postnatales 8 y 18 días (P8 y P18) con GFAP-eGFP. La expresión de GAD67 es predominante en la WM. Células GFAP-eGFP<sup>+</sup> co-localizaron con la expresión de GAD67 en P8 (cabezas de flecha y recuadro). Por el contrario, no se detectó ninguna señal para los astrocitos de la WM en P18, sin embargo, las células de Purkinje expresan GAD67. Barra de escala = 100  $\mu$ m , P18 barra de escala = 200  $\mu$ m.

### 3.2 Los receptores GABA<sub>A</sub> se expresan funcionalmente en las células de la sustancia blanca cerebelosa (WMC)

La señalización GABAérgica requiere la activación de receptores. Para visualizar esto fue utilizado el sensor fluorescente de calcio Fluo4, el cual permite observar la actividad de calcio en células que lo incorporan. La aplicación extracelular de GABA (500  $\mu$ M) evocó transitorios de calcio en  $41.7\% \pm 5.1\%$  de las células de la sustancia blanca, lo que indica que la expresión funcional de los receptores a GABA ocurre en una fracción de las células de la sustancia blanca (n=13;N=10). Como nota adicional, también se observaron transitorios de calcio en la capa de células granulares (puntas de flecha rojas, Fig. 2A). El siguiente paso fue evaluar los agonistas específicos muscimol (50  $\mu$ M) y baclofeno (20  $\mu$ M) para GABA<sub>A</sub>R y GABA<sub>B</sub>R respectivamente. La aplicación de muscimol indujo transitorios de calcio en el  $39\% \pm 7\%$  de las células (n = 10; N = 6, Fig. 2B), en contraste, el baclofeno



no evocó respuestas detectables (Fig. 2C). Para confirmar la viabilidad celular de las rebanadas se utilizó ATP (100  $\mu$ M) al final de los experimentos y el número total de células responsivas se consideró como el 100%; lo que sirvió para estimar la fracción celular sensible a GABA. Con base en estos resultados se concluyó que la señalización GABAérgica en la sustancia blanca del cerebelo es a través de receptores ionotrópicos del tipo GABA<sub>A</sub>R. (Fig. 2D).

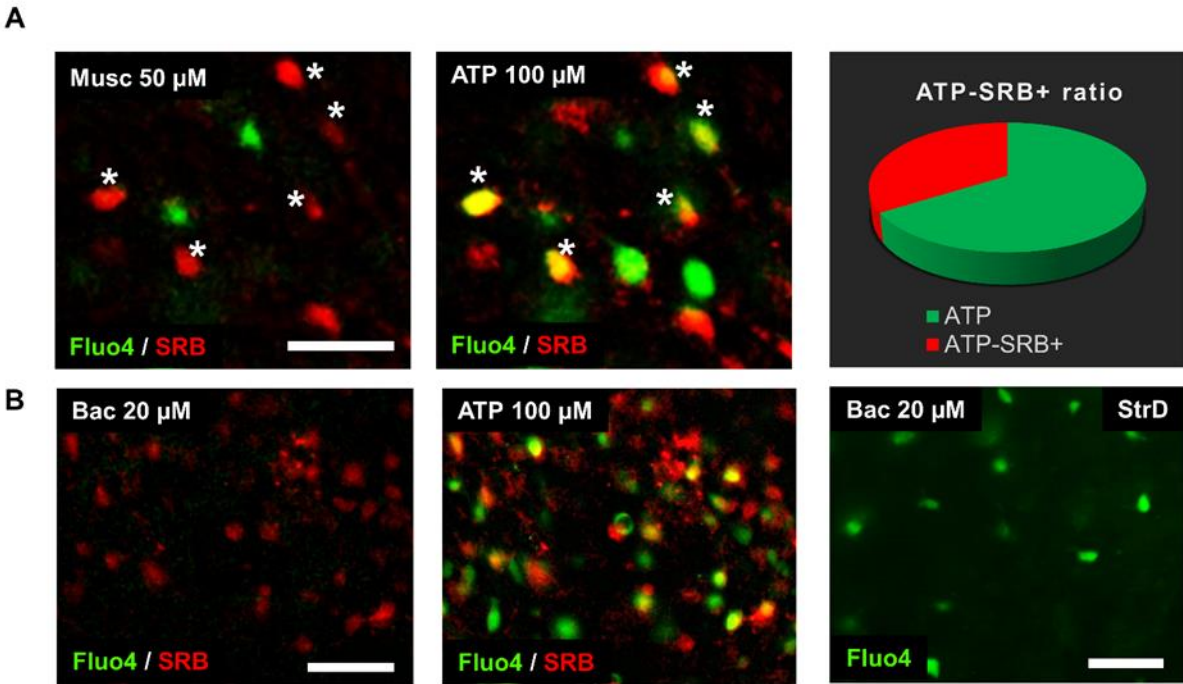


**Figura 2. Las células gliales responden a muscimol pero no a baclofeno.** (A) GABA (500  $\mu$ M) indujo una respuesta de calcio en el  $41,7\% \pm 5,1$  de las células de la sustancia blanca ( $n=13$ ;  $N=10$ ). Las flechas rojas destacan las respuestas mediadas por GABA en la capa granular (GL). (B, C) El muscimol (50  $\mu$ M) evocó una respuesta de calcio en el  $39\% \pm 7\%$  de las células de la WM ( $n=10$ ;  $N=6$ ), mientras que el baclofeno (20  $\mu$ M) no logró inducir una respuesta ( $n=12$ ;  $N=7$ ) (D) ATP (100  $\mu$ M) se aplicó después de los agonistas GABAérgicos y la respuesta evocada se consideró como el 100% de las células de la WM que respondieron. El ATP también ayudó a verificar la viabilidad de los cortes (barra de escala= 50  $\mu$ m).

### 3.3 Las células que responden a Muscimol no son SRB<sup>+</sup>

Una primera aproximación para investigar la identidad celular de la fracción que respondía a GABA fue utilizar la sulforodamina B (SRB), molécula fluorescente que se incorpora preferentemente en los astrocitos. La aplicación extracelular de muscimol (50  $\mu$ M) indujo transitorios de calcio en la población celular que no incorporó SRB, pero no se observaron respuestas en la fracción celular SRB<sup>+</sup>. La interpretación de estos resultados sugería que los astrocitos no expresan GABA<sub>A</sub>Rs (Fig. 3A). Por último, las células SRB<sup>+</sup> que respondieron a la aplicación extracelular del ATP (100  $\mu$ M) fueron el  $33,97\% \pm 3,5\%$  del total ( $n = 6$ ;  $N = 5$ ).





**Figura 3. Las células SRB<sup>+</sup> no responden a muscimol.** (A) Las células que responden al muscimol (50  $\mu$ M) no incorporaron SRB. Sin embargo, las células que responden a ATP (100  $\mu$ M) incluían tanto a las células SRB<sup>+</sup> como a las SRB<sup>-</sup>. Los asteriscos indican las células SRB<sup>+</sup> (rojo) que no respondieron a muscimol, pero sí a ATP (amarillo). Sólo el 34% de las células que respondieron a ATP son SRB<sup>+</sup> (n=7; N=5, barra de escala= 20  $\mu$ m). (B) El baclofeno (20  $\mu$ M) no evocó transitorios de calcio en las células de la sustancia blanca. No obstante, el ATP (100  $\mu$ M) activó a las células SRB<sup>+</sup> (amarillo) y SRB<sup>-</sup> (rojo). Como control positivo, el baclofeno si evocó transitorios de calcio en las células del estriado dorsal (StrD, P8) (n=4; N=4, barra de escala = 50  $\mu$ m).

### 3.4 Las células de la sustancia blanca no expresan GABA<sub>B</sub>Rs

Los experimentos iniciales mostraron que el baclofeno (20  $\mu$ M) no evocó transitorios de calcio en las células de la sustancia blanca cerebelosa, lo que contrasta con la aplicación extracelular de ATP (100  $\mu$ M) que indujo transitorios de calcio tanto en las células SRB<sup>+</sup> y como en las SRB<sup>-</sup> (n = 7; N = 6, Fig. 3B). En una serie experimental adicional se utilizó una concentración mayor de baclofeno (100  $\mu$ M) pero tampoco se observaron transitorios de calcio en las células de la sustancia blanca cerebelosa (n = 4, N = 4, Figura 3B). No obstante, el baclofeno (20  $\mu$ M) evocó transitorios de calcio en las células del cuerpo estriado dorsal; una región del cerebro en la que se ha reportado la expresión funcional de

GABA<sub>B</sub>Rs (n = 7; N = 6). En general, concluimos que los receptores GABA<sub>B</sub> no se expresan funcionalmente en las células de la sustancia blanca cerebelosa.

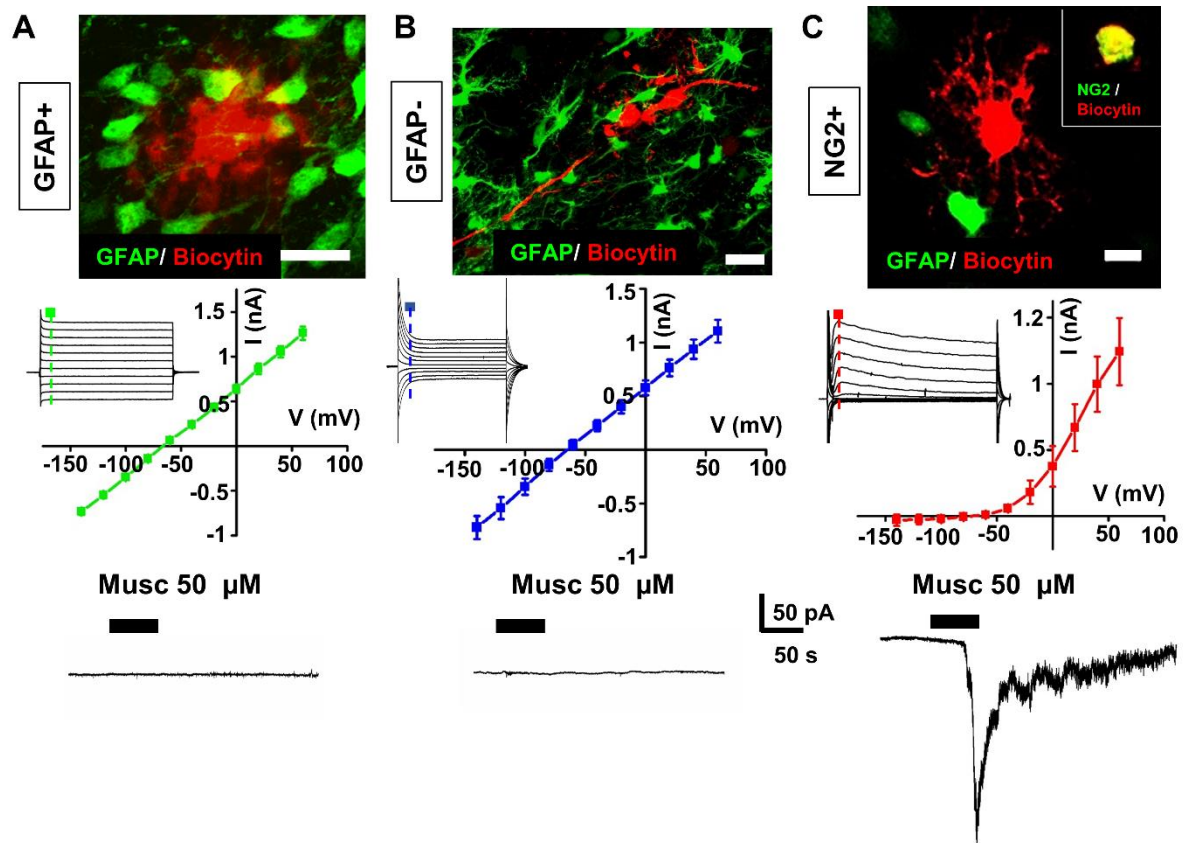
### 3.5 La expresión funcional de receptores GABA<sub>A</sub> ocurre selectivamente en la glía NG2

La identidad de las células que expresan GABA<sub>A</sub>R se investigó a través de registros de célula completa realizados en células de la sustancia blanca cerebelosa. El potencial de mantenimiento se fijó a -70 mV y se obtuvo el perfil de corriente para cada célula registrada, lo cual proporcionó información inicial sobre la identidad celular. Además, se inyectó biocitina para revelar la morfología de la célula registrada y determinar si era parte de un sincicio (Fig. 4). Esta estrategia experimental resultó en la identificación de tres poblaciones celulares: 1) La primera población corresponde a los astrocitos con base en la expresión de GFAP-eGFP. Estas células mostraron una morfología con múltiples procesos ramificados, y la biocitina se difundió a las células vecinas revelando que son parte de un sincicio. Con relación al perfil de corriente se registraron corrientes pasivas y la relación corriente-voltaje reveló un comportamiento lineal que indica que no son dependiente de voltaje, característica ampliamente descrita en la astrogliá. Por último, la aplicación extracelular de muscimol no indujo corrientes entrantes en las células GFAP-eGFP<sup>+</sup> (Fig. 4A).

2) En la segunda población las células GFAP<sup>-</sup> se registraron y la biocitina también difundió hacia células vecinas que también eran GFAP<sup>-</sup>. La biocitina también reveló una morfología con procesos alargados que presumiblemente correrían a lo largo de los tractos axonales, lo que sugiere que la identidad celular de esta población podría corresponder a oligodendrocitos, que por otra parte es la población celular que prevalece en la sustancia blanca. El perfil de corriente de estas células mostró corrientes entrantes y salientes con un decaimiento lento y la relación corriente-voltaje reveló un comportamiento lineal que indica que no son dependientes de voltaje. La aplicación extracelular de muscimol tampoco indujo corrientes entrantes en esta población celular. (Fig. 4B).

3) La tercera población también fue GFAP<sup>-</sup> y la biocitina reveló una morfología estrellada con procesos alargados y delgados. En estas células la biocitina no difundió hacia células vecinas y el perfil de corriente no fue lineal pues las corrientes son dependientes de voltaje, lo cual se confirma

con la relación corriente-voltaje que muestra una corriente con rectificación saliente. En esta población celular la aplicación extracelular de muscimol indujo corrientes entrantes con una amplitud promedio de  $-198 \pm 18$  pA ( $n = 5$ ;  $N = 5$ ), lo que indica la expresión funcional de GABA<sub>A</sub>Rs (fig. 4C). Finalmente se realizaron estudios de inmunofluorescencia para el proteoglicano NG2 que revelaron que la célula GFAP<sup>-</sup> registrada (identificada por el marcaje de biocitina) co-localiza con la expresión de glía NG2 ( $n = 5$ ;  $N = 5$ ). (Fig. 4C, recuadro).



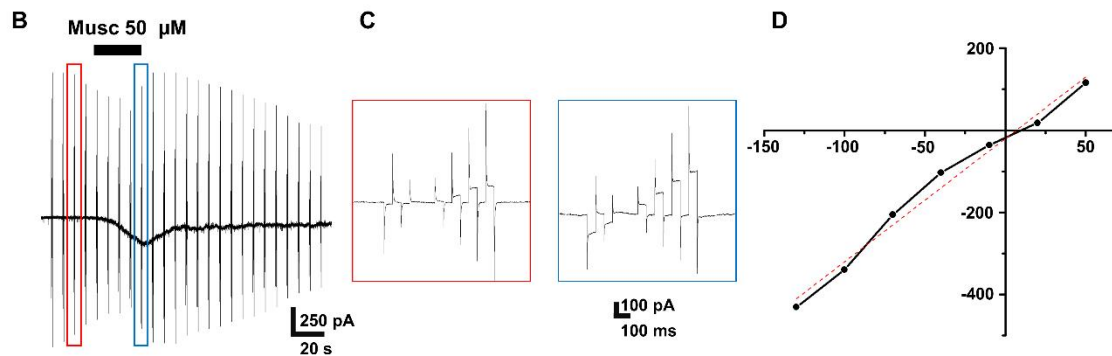
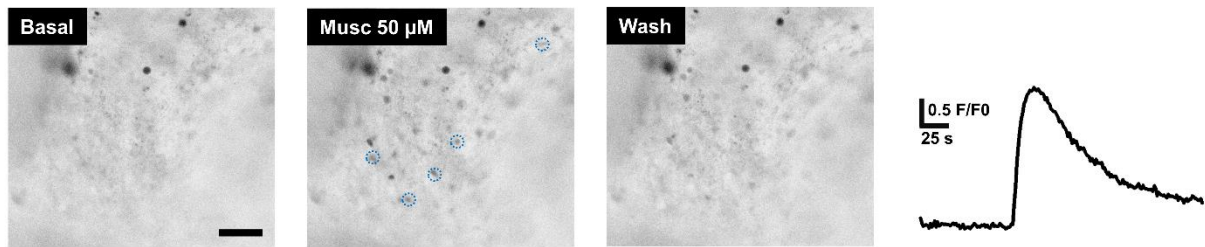
**Figura 4. Los GABA<sub>A</sub>Rs se expresan selectivamente en la glía NG2.** (A) La célula GFAP<sup>+</sup> inyectada con biocitina muestra la difusión de esta molécula hacia células vecinas que también son GFAP<sup>+</sup>. Los registros en configuración de fijación de voltaje (pasos de voltaje de 20 mV, de -140 a +60 mV) mostraron corrientes pasivas que resultaron en una relación corriente-voltaje de tipo lineal típica de los astrocitos. Estas células no mostraron respuesta al muscimol (barra de escala = 10 μm,  $n=9$ ;  $N=8$ ) (B) La célula GFAP<sup>-</sup> inyectada con biocitina muestra que esta molécula se difundió a un grupo de células vecinas, se aprecian procesos alargados que corren horizontalmente, presumiblemente siguiendo la trayectoria de los tractos axonales característicos de la sustancia blanca. Los registros en configuración de fijación de

voltaje mostraron corrientes con un decaimiento lento durante la aplicación del protocolo de pulsos de voltaje previamente descrito, se observaron corrientes de cola simétricas características de los oligodendrocitos. La aplicación extracelular de muscimol no indujo corrientes entrantes en ninguna de las células registradas (barra de escala = 20  $\mu\text{m}$ , n=7; N=7). (C) En el tercer tipo celular también se inyectó biocitina a través de la pipeta de registro, lo que reveló una morfología estrellada con procesos alargados, delgados y ramificados; la biocitina no difundió a células vecinas. (barra de escala = 20  $\mu\text{m}$ ). El perfil de corriente de este tipo celular mostró corrientes dependientes de voltaje que resultaron en una relación corriente-voltaje que muestra con rectificación saliente; además la aplicación extracelular de muscimol evocó una corriente entrante ( $-198 \pm 18 \text{ pA}$ , n = 5; N = 5). El recuadro muestra la inmunofluorescencia de la célula registrada en un ratón CD1, el canal rojo corresponde a la biocitina y el canal verde es para el anticuerpo NG2 (barra de escala = 10  $\mu\text{m}$ ).

### 3.6 El GABA induce transitorios de calcio a través de los GABA<sub>A</sub>R

Los efectos indirectos de GABA o muscimol sobre los transitorios de calcio registrados en las células de la sustancia blanca cerebelosa se descartaron en una serie experimental adicional en la que se adicionaron al aCSF antagonistas selectivos de los receptores ionotrópicos de glutamato y glicina (CNQX 50  $\mu\text{M}$ , MK-801 100  $\mu\text{M}$  y estriquina 2  $\mu\text{M}$ ), además de tetrodotoxina (TTX 1  $\mu\text{M}$ ) para bloquear los canales de sodio asociados a la actividad neuronal. Los resultados mostraron que el muscimol (50  $\mu\text{M}$ ) evocaba los transitorios de calcio previamente descritos, lo que confirmaba la expresión funcional de GABA<sub>A</sub>Rs en una fracción de células de la sustancia blanca cerebelosa (Fig. 5A, n = 6; N = 4). Estos resultados se complementaron con estudios de fijación de voltaje en la configuración de la célula completa realizados en la glía NG2. El objetivo de esta serie experimental fue determinar el potencial de inversión de la corriente entrante inducida por la aplicación extracelular de muscimol (50  $\mu\text{M}$ ) bajo un protocolo de pulsos de voltaje continuos (ver métodos). En este arreglo experimental la amplitud promedio de la corriente inducida por el muscimol fue de  $-157.2 \pm 42.1 \text{ pA}$  (n = 5; N = 5) (Fig. 5B). La relación corriente voltaje de la corriente de muscimol se obtuvo después de restar las amplitudes de los pulsos de voltaje antes de la aplicación del agonista de aquellas obtenidas en el pico de la corriente entrante de muscimol (Fig. 5C). El potencial de inversión estimado después del análisis de regresión lineal de la relación corriente-voltaje de muscimol fue de 6.7 mV, valor cercano al potencial de equilibrio del ion cloruro ( $\sim 0 \text{ mV}$ ) (Fig. 5D).

A



**Figura 5. Expresión funcional de GABA<sub>A</sub>Rs en la sustancia blanca del cerebelo (A)** La acción directa del muscimol sobre las células de la sustancia blanca se probó añadiendo una mezcla de bloqueadores farmacológicos de la neurotransmisión al aCSF (TTX 1  $\mu$ M, CNQX 50  $\mu$ M, estricnina 2  $\mu$ M, MK-801 100  $\mu$ M). En estas condiciones experimentales el muscimol evocó transitorios de calcio en una fracción de células de la sustancia blanca (N = 4; n = 6, barra de escala = 100  $\mu$ m). **(B)** La aplicación extracelular de muscimol (50  $\mu$ M) resultó en una corriente entrante registrada en la glía NG2 a un potencial de mantenimiento de -70 mV. El potencial de inversión de esta corriente se estimó al restar uno de los trenes de pulsos de voltaje (-130 a 50 mV, con incrementos de 30 mV) antes (rojo) menos el tren de pulsos de voltaje en el pico de la corriente entrante (azul) **(C)** (N = 5; n = 5). **(D)** La relación corriente-voltaje muestra gráficamente las amplitudes de las corrientes obtenidas en los distintos pulsos de voltaje resultado de la resta (rojo-azul). El potencial de inversión estimado al realizar la regresión lineal de los datos graficados en la relación corriente voltaje de la respuesta a muscimol fue de 6.7 mV, valor cercano al potencial de equilibrio del cloruro estaba cerca del potencial de equilibrio del ion cloruro ( $\sim$ 0 mV).

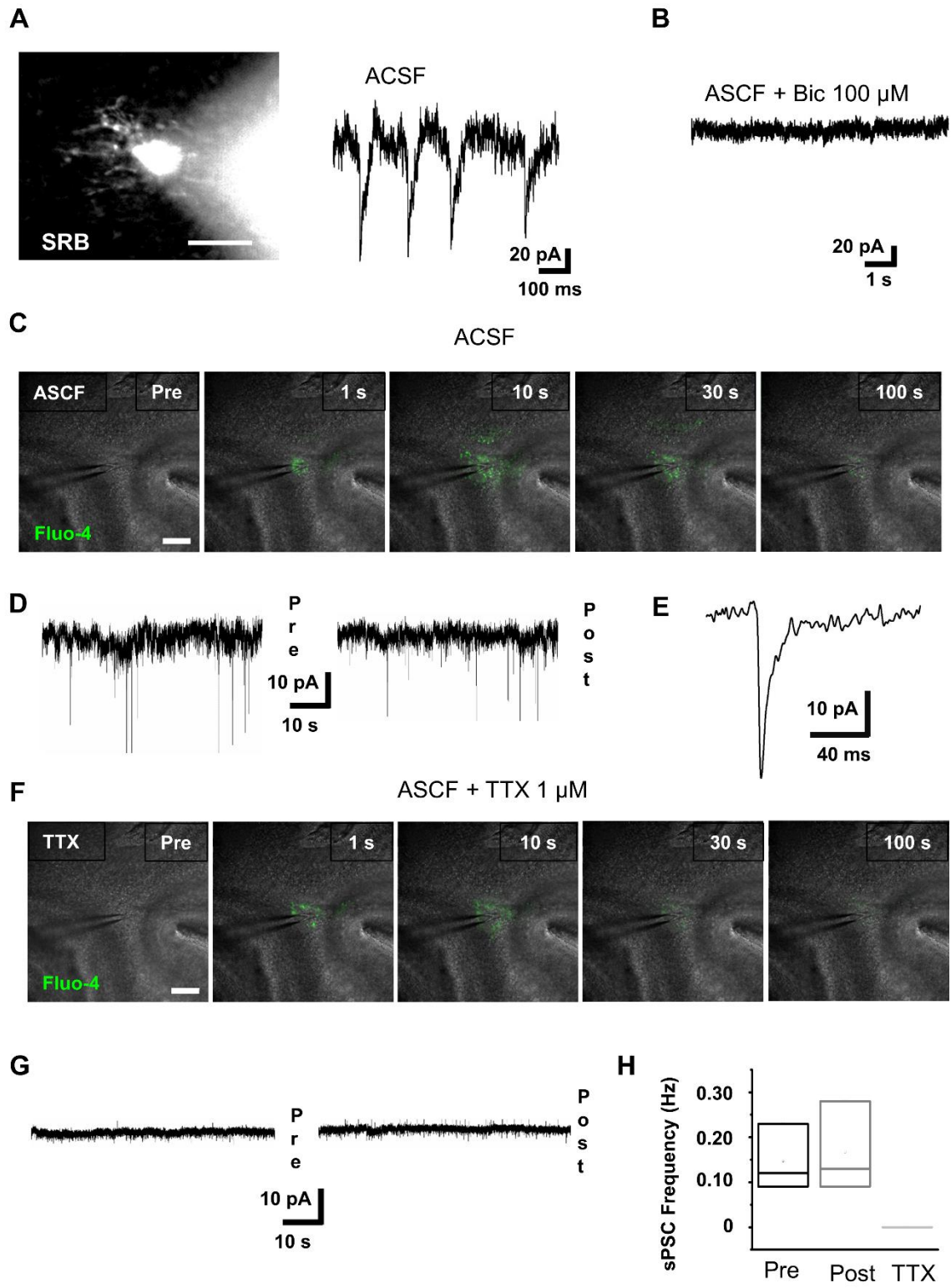
### 3.7 La glía NG2 recibe contactos sinápticos, pero la onda de calcio evocada no tiene efecto sobre la frecuencia de los sPSC

La glía NG2 recibe contactos sinápticos de tipo GABAérgico (Zonouzi et al., 2015). La despolarización de la sustancia blanca cerebelosa evocó inmediatamente una corriente postsináptica registrada en una fracción de células gliales NG2 ( $-50,6 \pm 5,1$  pA,  $n = 3$  de 10;  $N = 10$ ). Además, también se registraron corrientes post-sinápticas espontáneas (sPSC) que fueron completamente bloqueadas por la bicuculina antagonista de GABA<sub>A</sub>R (100  $\mu$ M) ( $n = 3$  de 10 analizadas;  $N = 10$ ). Fig. 6A, B). Nuestros datos indican que la señalización GABAérgica hacia la glía NG2 ocurre por la despolarización los axones de la sustancia blanca cerebelosa. Esto se confirmó al realizar una nueva serie experimental en presencia de TTX, la despolarización en este escenario no se registraron corrientes postsinápticas en la glía NG2.

Por último, se investigó si las ondas de calcio que son evocadas al despolarizar la sustancia blanca modulaban la frecuencia de las corrientes postsinápticas espontáneas registradas en la glía NG2. El protocolo experimental estimó la frecuencia antes de evocar la onda de calcio (pre-estímulo) y después de la onda de calcio (post-estímulo). Nuestros resultados mostraron que la onda de calcio no modificó la frecuencia de las corrientes postsinápticas espontáneas registradas en la glía NG2 ( $0.15 \pm 0.03$  Hz vs  $0.18 \pm 0.5$  Hz;  $n = 3$  de 10 analizados;  $N = 3$ ;  $p = 0.155$  Prueba t de Student) (Fig. 6H).

Nuestro siguiente paso fue eliminar la contribución axonal con TTX y repetir el protocolo de despolarización. Este protocolo experimental nos permitió investigar si la liberación de gliotransmisores asociada a la onda de calcio modulaba la frecuencia de las sPSCs registradas en la glía NG2. No obstante, la adición de TTX al aCSF eliminó por completo las sPSC, que previamente se habían registrado en la glía de NG2. La conclusión de esta serie experimental es que la onda de calcio no modula la frecuencia de las sPSCs registradas en la glía NG2 ( $n = 3$  de 10 analizadas;  $N = 10$ ) (Fig. 6F, G).





**Figura 6. Las ondas de calcio no modulan la frecuencia de las sPSC en la glía NG2.** (A) Registro representativo de una célula glial NG2 que muestra la morfología ramificada revelada por la SRB (barra de escala= 20  $\mu$ m) y las sPSCs que fueron abolidas por la bicuculina (100  $\mu$ M). (B), n = 3 células que responden de 10 probadas). (C) Curso temporal de una onda de calcio evocada por la estimulación eléctrica (barra de escala = 100  $\mu$ m). (D) Registro representativo de células de glía NG2 que muestra las sPSC antes (pre) y después (post) de la onda de calcio. (E) Amplificación de un evento representativo de sPSCs. (F) Curso temporal de una onda de calcio evocada por la estimulación eléctrica en presencia de TTX (barra de escala = 100 mm). (G) Las sPSCs fueron suprimidas cuando se añadió TTX (1 mM) al aCSF. En estas condiciones, no se registró ninguna señalización antes o después de la onda de calcio evocada. (H) Resumen de los experimentos, frecuencia de sPSCs previo al estímulo eléctrico (Pre), después del estímulo (Post) y durante la aplicación de TTX.

#### IV. Discusión

En este trabajo, se investigó la señalización GABAérgica durante el desarrollo postnatal temprano de la sustancia blanca cerebelosa del ratón. Nuestros resultados mostraron que GAD67 se expresa notablemente en células GFAP-, que probablemente corresponden a células de origen oligodendroglial incluyendo OPCs positivos a NG2, ya que su proporción predomina en la sustancia blanca (Reyes-Haro et al., 2013b; Sturrock, 1976). Adicionalmente se observó que más de la mitad de las células GFAP+ son inmunorreactivas a GAD67 en el desarrollo postnatal temprano (P7-9), estos resultados coinciden con observaciones anteriores en ratones GAD67-GFP *knock-in* (Yamanaka et al., 2004); lo que indica que el GABA se sintetiza y posiblemente se libera en la sustancia blanca cerebelosa. La expresión de receptores a GABA es un elemento adicional que se requiere para que la señalización GABAérgica sea funcional. En esta dirección, los estudios de imagen de calcio revelaron que el muscimol pero no el baclofeno producían transitorios de calcio en las células de la sustancia blanca cerebelosa, lo que indica la expresión funcional de GABA<sub>A</sub>Rs pero no de GABA<sub>B</sub>Rs. Este resultado contrasta con estudios anteriores que reportaron la expresión funcional de GABA<sub>B</sub>Rs en células gliales de otras regiones del cerebro. Por ejemplo, los astrocitos corticales expresan estos receptores en rebanadas de ratones P15-20 y P30-60 (Mariotti et al., 2016). Asimismo, el agonista de los receptores GABA<sub>B</sub> baclofeno, evocó transitorios de calcio en astrocitos del hipocampo (Perea et al., 2016) células de linaje oligodendroglial (O4<sup>+</sup>) de la WM periventricular (Luyt et al., 2007). En conjunto, estos resultados indican que la expresión funcional de los GABA<sub>B</sub>Rs está ausente en el WM cerebeloso, al menos en el desarrollo postnatal temprano (P7-P9).



#### 4.1 El GABA<sub>A</sub> se expresa funcionalmente en la glía NG2

En este estudio se evaluó la expresión funcional de los GABA<sub>A</sub>Rs en astrocitos, oligodendrocitos y glía NG2. La microglía se descartó en este estudio porque no hay evidencia de expresión funcional de GABA<sub>A</sub>R en estas células (Cheung et al., 2009; Kettenmann et al., 2011). Estudios han reportado la expresión funcional de GABA<sub>A</sub> en los astrocitos (Bolteus, 2004; Fraser et al., 1994; Muller et al., 1994; Reyes-Haro et al., 2013a), los oligodendrocitos (Arellano et al., 2016; Berger et al., 1992; Habermacher et al., 2019) o la glía NG2 (Balía et al., 2015; Habermacher et al., 2019; Luyt et al., 2007; Zonouzi et al., 2015). Sin embargo, se sabe poco sobre la expresión funcional de los GABA<sub>A</sub>Rs en la WMC (Zonouzi et al., 2015), lo cual resulta de interés ya que como se mencionó previamente en antecedentes, esta región se encuentra en una etapa dinámica de neurogénesis, mielinización, etc.

Las células gliales se encuentran en mayor proporción y determinan la composición celular de la WMC con el 99% de los somas celulares (Reyes-Haro et al., 2013b; Sturrock, 1976). En este trabajo, las imágenes de calcio mostraron que el muscimol provocó transitorios en la WMC, lo que indica la expresión funcional de los GABA<sub>A</sub>Rs en las células gliales. Sin embargo, estos resultados no aportaban información sobre la identidad de las células que respondían a la aplicación extracelular de GABA o muscimol.

Nuestro siguiente paso fue teñir los astrocitos *in-situ* con SRB. Esta metodología (Appaix et al., 2012) ha demostrado ser fiable, pero con algunas limitaciones, ya que también puede teñir los oligodendrocitos (Hill and Grutzendler, 2014; Hülsmann et al., 2017). Sorprendentemente, las células SRB<sup>+</sup> no respondieron a la aplicación extracelular de muscimol, esta evidencia experimental sugería que los astrocitos carecen de la expresión funcional de los GABA<sub>A</sub>Rs.

En contraste se observó que las células SRB<sup>-</sup> respondían a muscimol, pero la identidad celular era una incógnita. Por ello, se realizaron registros de fijación de voltaje en la configuración de célula completa en tres tipos celulares identificados con base en su perfil de corriente, relación corriente-voltaje, morfología y difusión de biocitina. Estos criterios permitieron identificar células GFAP<sup>+</sup> que correspondían a los astrocitos y dos poblaciones GFAP<sup>-</sup> de glía; la primera correspondía a células de

linaje oligodendroglial y la segunda a células gliales NG2+. Estos criterios son muy consistentes en el sistema nervioso central y permiten una identificación confiable de los distintos tipos de células gliales (Maglione et al., 2010; von Bartheld et al., 2016). Sin embargo, en este estudio no se abordó la identificación inmunológica de la etapa de desarrollo correspondiente para las células del linaje oligodendroglial, ya que esto resulta complejo debido a la diferenciación dinámica de los precursores de oligodendrocitos que transitan por distintos estadios y a cada uno corresponde un marcador diferente. Las células del linaje oligodendroglial poseen varios estadios y pueden ser identificadas por distintos marcadores durante estas etapas. De manera general, estas etapas son: células precursoras de oligodendrocitos (OPCs), las cuales son inmunoreactivas a PDGFR $\alpha$  y NG2, los oligodendrocitos inmaduros son identificados por su inmunomarcaje a O4 y Olig2 y finalmente los oligodendrocitos maduros son inmunoreactivos a la proteína básica de mielina (MBP) y a CNPase (Barateiro and Fernandes, 2014).

Una vez que se identificaron los distintos tipos gliales se investigó cuales respondían a la aplicación extracelular de GABA, muscimol o baclofeno. Los astrocitos no respondieron a ninguno de estos agonistas de los receptores a GABA, lo cual resultó sorprendente teniendo en cuenta que la glía de Bergmann expresa funcionalmente GABA<sub>A</sub>Rs en una etapa del desarrollo postnatal (P5-P7) equivalente a la del presente estudio; no obstante, la amplitud de estas corrientes se redujo drásticamente o fue indetectable en etapas postnatales posteriores al inicio de la mielinización (P20-P30) (Muller et al., 1994). En conjunto estos resultados sugieren una regulación diferencial de la señalización GABAérgica durante el desarrollo postnatal temprano del cerebelo. En apoyo a esta hipótesis, también se reportó que la expresión funcional de los GABA<sub>A</sub>Rs ocurre en las células gliales endodiales del cerebelo situadas en el techo del cuarto ventrículo, tanto en la etapa temprana del desarrollo postnatal como en la etapa posterior al inicio de la mielinización, la cual inicia en P7 pero alcanza su pico en P20-30 (Barateiro and Fernandes, 2014; Muller et al., 1994; Reyes-Haro et al., 2013a). Adicionalmente, estudios previos de inmunofluorescencia han revelado la expresión de la subunidad GABA $\rho$ 1 en los astrocitos de la capa granular del lóbulo X del cerebelo (Pétriz et al., 2014).

Este estudio es el primero que comprueba la expresión funcional de los receptores GABA en tres tipos diferentes de células gliales de la sustancia blanca cerebelosa. La relevancia de estos resultados es que

la señalización GABAérgica sería selectiva para la glía NG2. Sugiriendo que la señalización GABAérgica actúa como una ruta regulatoria específica de control de proliferación, migración y maduración de las células precursoras de oligodendrocitos durante el desarrollo temprano postnatal del cerebelo (Reyes-Haro et al., 2021).

En este estudio aportamos pruebas experimentales que demuestran que la glía NG2 es un blanco específico para la señalización GABAérgica en el desarrollo postnatal temprano de la WMC. Estudios anteriores mostraron que la activación de los GABA<sub>A</sub>Rs en la glía NG2 resultaba en una despolarización y elevación del Ca<sup>2+</sup> intracelular (Kirchhoff and Kettenmann, 1992; Lin et al., 2005; Pastor et al., 1995; Tanaka et al., 2009; Tong et al., 2009; von Bartheld et al., 2016). El mecanismo asociado a los transitorios de calcio en las neuronas inmaduras implica la activación de los canales de calcio activados por voltaje o la tensión osmótica (Chavas et al., 2004) mientras que en la glía NG2 está mediado por el intercambiador sodio/calcio (NCX) el cual puede ser activado por GABA mediante receptores GABA<sub>A</sub> y su activación ha sido reportada como un mecanismo de inducción de la migración de las células NG2, lo cual puede repercutir en la mielinización (Tong et al., 2009).

Sin embargo, se requieren más estudios para elucidar si la señalización mediada por GABA<sub>A</sub> sigue siendo específica para la glía NG2 a través de diferentes etapas del desarrollo postnatal. La expresión funcional de los GABA<sub>A</sub>Rs es difícil de comprobar en ratones jóvenes o adultos con los métodos empleados en este estudio porque la mielinización impide la carga correcta de los indicadores de calcio y la identificación de las células para los estudios de *patch-clamp*. Sin embargo, los indicadores de calcio codificados genéticamente y la microscopía de dos fotones podrían ser útiles para superar estas dificultades técnicas.

Otra observación interesante fue la difusión de biocitina hacia células vecinas que se observó en las células GFAP<sup>+</sup> y GFAP<sup>-</sup>; lo que reveló la existencia de redes gliales en esta etapa del desarrollo postnatal temprano (P7-P9). Consideramos dos posibles explicaciones para este resultado. En primer lugar, sabemos que no todos los astrocitos están marcados por el gen reportero eGFP en el modelo transgénico utilizado en nuestro estudio (Nolte et al., 2001). En segundo lugar, se ha observado el acoplamiento astrocito-oligodendrocito a través de *gap-junctions* en el cuerpo caloso y en la WMC (Maglione et al., 2010; Tress et al., 2012), lo cual requiere de la expresión de conexinas (29, 32, 43 y 47) que son importantes para el establecimiento de dichas conexiones. La expresión de estas conexinas

varía desde estadios embrionarios y día P0 (por ejemplo conexina 47) a estadios de desarrollo temprano (P15) y adultez como la conexina 43, las cuales son relevantes para el desarrollo (Basu and Das Sarma, 2018; Hubbard and Binder, 2016; Parenti et al., 2010). Por lo tanto, nuestros resultados no descartan el acoplamiento astrocito GFAP<sup>+</sup>-astrocito GFAP<sup>-</sup> ni astrocito-oligodendrocito, añadiendo complejidad a estudios entre diferentes células gliales, pero esto queda fuera del objetivo de este trabajo.

#### 4.2 La glía NG2 de la sustancia blanca recibe estímulos sinápticos

La comunicación neurona-glía NG2 en el cerebelo se describió por primera vez en la capa molecular, al despolarizar las fibras trepadoras se registraron corrientes postsinápticas glutamatérgicas en la glía NG2 (Lin et al., 2005). Posteriormente, estudios realizados en la WMC reportaron corrientes sinápticas de tipo GABAérgico en la glía NG2 (Zonouzi et al., 2015). Nuestros estudios confirmaron este resultado, pero además demostraron que la señalización mediada por GABA<sub>A</sub>Rs es selectiva para la glía NG2, al menos en la etapa del desarrollo posnatal previa al inicio de la mielinización. Este fue un resultado sorprendente teniendo en cuenta que la expresión funcional de GABA<sub>A</sub>Rs fue reportada en glioblastos y oligodendrocitos del cuerpo calloso, otro tracto de la WM (Berger et al., 1992). En consecuencia, los co-cultivos de neuronas y oligodendrocitos mostraron expresión funcional de los GABA<sub>A</sub>Rs, aunque el aislamiento de los oligodendrocitos dio lugar a una pérdida de respuestas mediadas por GABA (Arellano et al., 2016), lo que indica que el contacto neuronal es necesario para la expresión funcional de los GABA<sub>A</sub>Rs. Además, la proliferación y mielinización de la oligodendroglía está regulada por los GABA<sub>A</sub>Rs en cultivos corticales (Hamilton et al., 2017; Zonouzi et al., 2015). Sin embargo, se reportaron respuestas diferentes para los estudios *in-vitro* frente a los *in-vivo* cuando se utilizó un antagonista de GABA<sub>A</sub>. Por ejemplo, la aplicación del antagonista gabazina aumentó el número de oligodendrocitos positivos al marcador de oligodendrocitos maduros CC1 y la mielinización en cultivos corticales (Hamilton et al., 2017), mientras que los estudios *in vivo* mostraron que la bicuculina aumentó la densidad de la glía NG2 y disminuyó la de los oligodendrocitos CC1<sup>+</sup> en el cerebelo (Zonouzi et al., 2015)(Zonouzi et al., 2015). Estas diferencias

pueden explicarse por las particularidades regionales o por las diferencias entre los estudios *in-vitro* e *in-vivo*.

#### 4.3 Las ondas de calcio evocadas no regulan la señalización directa de la glía NG2

Las células gliales presentan una forma de señalización a larga distancia en la que se produce la propagación de transitorios de calcio entre las células. Las ondas de calcio se describieron en la WM cortical y se propagan a través de la liberación de gliotransmisores (Haas et al., 2006; Schipke et al., 2002).

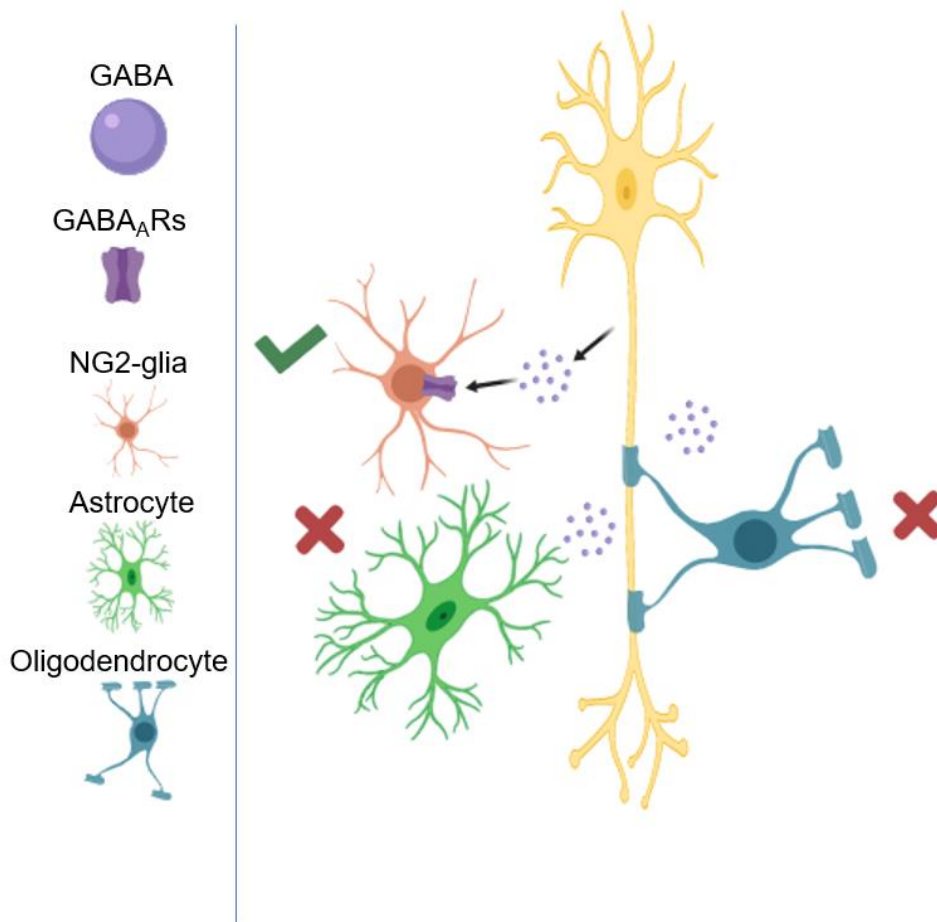
La mitad de los astrocitos de la WM cerebelosa expresan GAD67, lo que indica que la síntesis GABA puede ocurrir potencialmente en las células de la WMC. La señalización de GABA desde las células gliales se lleva a cabo mediante la liberación vesicular, la actividad inversa de los transportadores de GABA o la liberación de GABA a través del canal bestrofina-1 (Lee et al., 2010; Song et al., 2013; Yoon and Lee, 2014). La liberación de GABA a través de la glía se descartó ya que la adición de TTX al aCSF suprimió las corrientes postsinápticas espontáneas; lo que indica que la señalización GABAérgica hacia la glía NG2 es de tipo neuronal, las ondas de calcio no modificaron la frecuencia de las corrientes postsinápticas (sin TTX) ni tampoco evocaron respuestas en la glía NG2. No obstante, no se puede descartar que la señalización glía-glía ocurra pero nuestros registros electrofisiológicos podrían estar sobre el límite de detección.

En este estudio no se exploró la presencia de corrientes tónicas en la glía NG2, esto ha sido estudiado en células NG2 del estriado. Las corrientes registradas en ese estudio mostraron un incremento de 10 pA en la corriente tras la aplicación del antagonista selectivo bicuculina (Passlick et al., 2013). Esto indica que las células NG2 en el cerebelo podrían presentar corrientes similares, lo cual indicaría un

posible mecanismo de regulación controlado por la liberación de GABA proveniente de los astrocitos teniendo en cuenta que la expresión de GAD67 es alta en sustancia blanca en P8 pero ausente en P18. Nuestros resultados concuerdan con un reporte anterior que sugiere que la glía NG2 de la WMC recibe estímulos sinápticos de las interneuronas locales GAD65<sup>+</sup> (Zonouzi et al., 2015). Curiosamente, solo registramos sPSCs en tres de diez células NG2. Esta proporción es ligeramente inferior a la de un estudio anterior en el que 20 de 31 células Ds-Red-NG2<sup>+</sup> mostraron actividad postsináptica (Zonouzi et al., 2015). Esta señalización puede reflejar una vía de regulación para controlar el desarrollo de las células NG2. En otras regiones, la acción de los GABA<sub>A</sub>Rs en la NG2-glía está restringida en el tiempo a edades postnatales tempranas (Orduz et al., 2015; Parolisi and Boda, 2018), lo que indica que un proceso importante en el desarrollo podría estar regulado específicamente por los GABA<sub>A</sub>Rs. Por lo tanto, este trabajo proporciona evidencia experimental que apoya la señalización selectiva mediada por GABA<sub>A</sub>Rs para la glía NG2 durante el desarrollo postnatal temprano del WM cerebeloso.

## Conclusiones

La caracterización funcional de las células gliales de la WMC reveló que la expresión funcional de GABA<sub>A</sub>Rs ocurre selectivamente en la glía NG2, al menos en la etapa del desarrollo postnatal temprano previa al inicio de la mielinización. Abriendo la posibilidad de que la señalización GABAérgica podría regular la proliferación, diferenciación y maduración del fenotipo oligodendroglial previo al inicio de la mielinización.



**Figura 7. Conclusión gráfica.** Los distintos tipos celulares registrados mostraron propiedades electrofisiológicas y morfológicas distintivas de tres grupos celulares, astrocitos, oligodendrocitos y NG2-glia. La evidencia obtenida mediante imagen de calcio y patch-clamp de célula completa, mostro que, de estos tres tipos celulares, Solo la NG2-glia expresa receptores GABA funcionales. Específicamente receptores GABA<sub>A</sub>, en la sustancia blanca cerebelar del ratón en edades postnatales P7-P9.

## Referencias

- Appaix, F., Girod, S., Boisseau, S., Römer, J., Vial, J.-C., Albriex, M., Maurin, M., Depaulis, A., Guillemain, I., van der Sanden, B., 2012. Specific In Vivo Staining of Astrocytes in the Whole Brain after Intravenous Injection of Sulforhodamine Dyes. *PLoS ONE* 7, e35169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035169>
- Arellano, R.O., Sánchez-Gómez, M.V., Alberdi, E., Canedo-Antelo, M., Chara, J.C., Palomino, A., Pérez-Samartín, A., Matute, C., 2016. Axon-to-Glia Interaction Regulates GABA<sub>A</sub> Receptor Expression in Oligodendrocytes. *Mol. Pharmacol.* 89, 63–74. <https://doi.org/10.1124/mol.115.100594>
- Balia, M., Vélez-Fort, M., Passlick, S., Schäfer, C., Audinat, E., Steinhäuser, C., Seifert, G., Angulo, M.C., 2015. Postnatal Down-Regulation of the GABA<sub>A</sub> Receptor  $\gamma 2$  Subunit in Neocortical NG2 Cells Accompanies Synaptic-to-Extrasynaptic Switch in the GABAergic Transmission Mode. *Cereb. Cortex* 25, 1114–1123. <https://doi.org/10.1093/cercor/bht309>
- Barateiro, A., Fernandes, A., 2014. Temporal oligodendrocyte lineage progression: In vitro models of proliferation, differentiation and myelination. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1843, 1917–1929. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.04.018>
- Bastian, A.J., 2011. Moving, sensing and learning with cerebellar damage. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 596–601. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.06.007>
- Basu, R., Das Sarma, J., 2018. Connexin 43/47 channels are important for astrocyte/oligodendrocyte cross-talk in myelination and demyelination. *J. Biosci.* 43, 1055–1068. <https://doi.org/10.1007/s12038-018-9811-0>
- Bazargani, N., Attwell, D., 2016. Astrocyte calcium signaling: the third wave. *Nat. Neurosci.* 19, 182–189. <https://doi.org/10.1038/nn.4201>
- Berger, T., Walz, W., Schnitzer, J., Kettenmann, H., 1992. GABA- and glutamate-activated currents in glial cells of the mouse corpus callosum slice. *J. Neurosci. Res.* 31, 21–27. <https://doi.org/10.1002/jnr.490310104>
- Bolteus, A.J., 2004. GABA Release and Uptake Regulate Neuronal Precursor Migration in the Postnatal Subventricular Zone. *J. Neurosci.* 24, 7623–7631. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1999-04.2004>
- Bradl, M., Lassmann, H., 2010. Oligodendrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 119, 37–53. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0601-5>
- Cellot, G., Cherubini, E., 2013. Functional role of ambient GABA in refining neuronal circuits early in postnatal development. *Front. Neural Circuits* 7. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00136>
- Chavas, J., Forero, M.E., Collin, T., Llano, I., Marty, A., 2004. Osmotic Tension as a Possible Link between GABA<sub>A</sub> Receptor Activation and Intracellular Calcium Elevation. *Neuron* 44, 701–713. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.11.002>
- Cheung, G., Kann, O., Kohsaka, S., Fäerber, K., Kettenmann, H., 2009. GABAergic activities enhance macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  release from microglia (brain macrophages) in postnatal mouse brain: Invading microglia and GABAergic activities. *J. Physiol.* 587, 753–768. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.163923>
- Chittajallu, R., Aguirre, A., Gallo, V., 2004. NG2-positive cells in the mouse white and grey matter display distinct physiological properties: Functional heterogeneity of NG2<sup>+</sup> cells. *J. Physiol.* 561, 109–122. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.074252>



- Colonna, M., Butovsky, O., 2017. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annu. Rev. Immunol.* 35, 441–468. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052358>
- De Biase, L.M., Nishiyama, A., Bergles, D.E., 2010. Excitability and Synaptic Communication within the Oligodendrocyte Lineage. *J. Neurosci.* 30, 3600–3611. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6000-09.2010>
- Esclapez, M., Tillakaratne, N., Kaufman, D., Tobin, A., Houser, C., 1994. Comparative localization of two forms of glutamic acid decarboxylase and their mRNAs in rat brain supports the concept of functional differences between the forms. *J. Neurosci.* 14, 1834–1855. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-03-01834.1994>
- Fattorini, G., Melone, M., Sánchez-Gómez, M.V., Arellano, R.O., Bassi, S., Matute, C., Conti, F., 2017. GAT-1 mediated GABA uptake in rat oligodendrocytes: GAT-1 in Oligodendrocytes. *Glia* 65, 514–522. <https://doi.org/10.1002/glia.23108>
- Foran, D., Peterson, A., 1992. Myelin acquisition in the central nervous system of the mouse revealed by an MBP-Lac Z transgene. *J. Neurosci.* 12, 4890–4897. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-12-04890.1992>
- Fraser, D.D., Mudrick - Donnon, L.A., Macvicar, B.A., 1994. Astrocytic GABA receptors. *Glia* 11, 83–93. <https://doi.org/10.1002/glia.440110203>
- Ge, S., Goh, E.L.K., Sailor, K.A., Kitabatake, Y., Ming, G., Song, H., 2006. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature* 439, 589–593. <https://doi.org/10.1038/nature04404>
- Gutiérrez-Castañeda, N.E., González-Corona, J., Griego, E., Galván, E.J., Paz, L.D.O. la, 2022. Taurine promotes differentiation and maturation of neural stem/progenitor cells from the subventricular zone via activation of GABA<sub>A</sub> receptors (preprint). In Review. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1581686/v1>
- Haas, B., Schipke, C.G., Peters, O., Söhl, G., Willecke, K., Kettenmann, H., 2006. Activity-dependent ATP-waves in the Mouse Neocortex are Independent from Astrocytic Calcium Waves. *Cereb. Cortex* 16, 237–246. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhi101>
- Habermacher, C., Angulo, M.C., Benamer, N., 2019. Glutamate versus GABA in neuron–oligodendroglia communication. *Glia* 67, 2092–2106. <https://doi.org/10.1002/glia.23618>
- Hamilton, N.B., Clarke, L.E., Arancibia-Carcamo, I.L., Kougioumtzidou, E., Matthey, M., Káradóttir, R., Whiteley, L., Bergersen, L.H., Richardson, W.D., Attwell, D., 2017. Endogenous GABA controls oligodendrocyte lineage cell number, myelination, and CNS internode length: Endogenous GABA Release Regulates Myelination. *Glia* 65, 309–321. <https://doi.org/10.1002/glia.23093>
- Hill, R.A., Grutzendler, J., 2014. In vivo imaging of oligodendrocytes with sulforhodamine 101. *Nat. Methods* 11, 1081–1082. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3140>
- Hubbard, J.A., Binder, D.K., 2016. Gap Junctions, in: *Astrocytes and Epilepsy*. Elsevier, pp. 265–289. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802401-0.00011-9>
- Hülsmann, S., Hagos, L., Heuer, H., Schnell, C., 2017. Limitations of Sulforhodamine 101 for Brain Imaging. *Front. Cell. Neurosci.* 11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00044>
- Kaupmann, K., Huggel, K., Heid, J., Flor, P.J., Bischoff, S., Mickel, S.J., McMaster, G., Angst, C., Bittiger, H., Froestl, W., Bettler, B., 1997. Expression cloning of GABA<sub>B</sub> receptors uncovers

- similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature* 386, 239–246. <https://doi.org/10.1038/386239a0>
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., Verkhratsky, A., 2011. Physiology of Microglia. *Physiol. Rev.* 91, 461–553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>
- Kilb, W., Kirischuk, S., Luhmann, H.J., 2013. Role of tonic GABAergic currents during pre- and early postnatal rodent development. *Front. Neural Circuits* 7. <https://doi.org/10.3389/fncir.2013.00139>
- King, M., Hernandez-Castillo, C.R., Poldrack, R.A., Ivry, R.B., Diedrichsen, J., 2019. Functional boundaries in the human cerebellum revealed by a multi-domain task battery. *Nat. Neurosci.* 22, 1371–1378. <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0436-x>
- Kirchhoff, F., Kettenmann, H., 1992. GABA Triggers a  $[Ca^{2+}]_i$  Increase in Murine Precursor Cells of the Oligodendrocyte Lineage. *Eur. J. Neurosci.* 4, 1049–1058. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1992.tb00131.x>
- Kukley, M., Kiladze, M., Tognatta, R., Hans, M., Swandulla, D., Schramm, J., Dietrich, D., 2008. Glial cells are born with synapses. *FASEB J.* 22, 2957–2969. <https://doi.org/10.1096/fj.07-090985>
- Larson, V.A., Zhang, Y., Bergles, D.E., 2016. Electrophysiological properties of NG2 + cells: Matching physiological studies with gene expression profiles. *Brain Res.* 1638, 138–160. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.09.010>
- Lee, S., Yoon, B.-E., Berglund, K., Oh, S.-J., Park, H., Shin, H.-S., Augustine, G.J., Lee, C.J., 2010. Channel-Mediated Tonic GABA Release from Glia. *Science* 330, 790–796. <https://doi.org/10.1126/science.1184334>
- Lin, S., Huck, J.H.J., Roberts, J.D.B., Macklin, W.B., Somogyi, P., Bergles, D.E., 2005. Climbing Fiber Innervation of NG2-Expressing Glia in the Mammalian Cerebellum. *Neuron* 46, 773–785. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.025>
- Liu, X., Wang, Q., Haydar, T.F., Bordey, A., 2005. Nonsynaptic GABA signaling in postnatal subventricular zone controls proliferation of GFAP-expressing progenitors. *Nat. Neurosci.* 8, 1179–1187. <https://doi.org/10.1038/nn1522>
- Logiacco, F., Xia, P., Georgiev, S.V., Franconi, C., Chang, Y.-J., Ugursu, B., Sporbert, A., Kühn, R., Kettenmann, H., Semtner, M., 2021. Microglia sense neuronal activity via GABA in the early postnatal hippocampus. *Cell Rep.* 37, 110128. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110128>
- Luyt, K., Slade, T.P., Dorward, J.J., Durant, C.F., Wu, Y., Shigemoto, R., Mundell, S.J., Váradi, A., Molnár, E., 2007. Developing oligodendrocytes express functional GABA<sub>B</sub> receptors that stimulate cell proliferation and migration. *J. Neurochem.* 100, 822–840. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04255.x>
- MacVicar, B., Tse, F., Crichton, S., Kettenmann, H., 1989. GABA-activated Cl<sup>-</sup> channels in astrocytes of hippocampal slices. *J. Neurosci.* 9, 3577–3583. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.09-10-03577.1989>
- Maglione, M., Tress, O., Haas, B., Karram, K., Trotter, J., Willecke, K., Kettenmann, H., 2010. Oligodendrocytes in mouse corpus callosum are coupled via gap junction channels formed by connexin47 and connexin32. *Glia* 58, 1104–1117. <https://doi.org/10.1002/glia.20991>
- Mariotti, L., Losi, G., Sessolo, M., Marcon, I., Carmignoto, G., 2016. The inhibitory neurotransmitter GABA evokes long - lasting  $Ca^{2+}$  oscillations in cortical astrocytes. *Glia* 64, 363–373. <https://doi.org/10.1002/glia.22933>

- Muller, T., Fritschy, J., Grosche, J., Pratt, G., Mohler, H., Kettenmann, H., 1994. Developmental regulation of voltage-gated K<sup>+</sup> channel and GABAA receptor expression in Bergmann glial cells. *J. Neurosci.* 14, 2503–2514. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-05-02503.1994>
- Nishiyama, A., Boshans, L., Goncalves, C.M., Wegrzyn, J., Patel, K.D., 2016. Lineage, fate, and fate potential of NG2-glia. *Brain Res.* 1638, 116–128. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.08.013>
- Nolte, C., Matyash, M., Pivneva, T., Schipke, C.G., Ohlemeyer, C., Hanisch, U.K., Kirchhoff, F., Kettenmann, H., 2001. GFAP promoter-controlled EGFP-expressing transgenic mice: a tool to visualize astrocytes and astrogliosis in living brain tissue. *Glia* 33, 72–86.
- Oberheim, N.A., Goldman, S.A., Nedergaard, M., 2012. Heterogeneity of Astrocytic Form and Function, in: Milner, R. (Ed.), *Astrocytes, Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 23–45. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-452-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-452-0_3)
- Orduz, D., Maldonado, P.P., Balia, M., Vélez-Fort, M., de Sars, V., Yanagawa, Y., Emiliani, V., Angulo, M.C., 2015. Interneurons and oligodendrocyte progenitors form a structured synaptic network in the developing neocortex. *eLife* 4, e06953. <https://doi.org/10.7554/eLife.06953>
- Parenti, R., Cicirata, F., Zappalà, A., Catania, A., La Delia, F., Cicirata, V., Tress, O., Willecke, K., 2010. Dynamic expression of Cx47 in mouse brain development and in the cuprizone model of myelin plasticity: CX47 in Development and Plasticity Process. *Glia* 58, 1594–1609. <https://doi.org/10.1002/glia.21032>
- Parolisi, R., Boda, E., 2018. NG2 Glia: Novel Roles beyond Re-/Myelination. *Neuroglia* 1, 151–175. <https://doi.org/10.3390/neuroglia1010011>
- Pastor, A., Chvátal, A., Syková, E., Kettenmann, H., 1995. Glycine- and GABA-activated Currents in Identified Glial Cells of the Developing Rat Spinal Cord Slice. *Eur. J. Neurosci.* 7, 1188–1198. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1995.tb01109.x>
- Perea, G., Gómez, R., Mederos, S., Covelo, A., Ballesteros, J.J., Schlosser, L., Hernández-Vivanco, A., Martín-Fernández, M., Quintana, R., Rayan, A., Díez, A., Fuenzalida, M., Agarwal, A., Bergles, D.E., Bettler, B., Manahan-Vaughan, D., Martín, E.D., Kirchhoff, F., Araque, A., 2016. Activity-dependent switch of GABAergic inhibition into glutamatergic excitation in astrocyte-neuron networks. *eLife* 5, e20362. <https://doi.org/10.7554/eLife.20362>
- Pétriz, A., Reyes-Haro, D., González-González, M.A., Miledi, R., Martínez-Torres, A., 2014. GABA<sub>A</sub> subunits confer a bicuculline-insensitive component to GFAP<sup>+</sup> cells of cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 17522–17527. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419632111>
- Psachoulia, K., Jamen, F., Young, K.M., Richardson, W.D., 2009. Cell cycle dynamics of NG2 cells in the postnatal and ageing brain. *Neuron Glia Biol.* 5, 57–67. <https://doi.org/10.1017/S1740925X09990354>
- Purves, D. (Ed.), 2004. *Neuroscience*, 3rd ed. ed. Sinauer Associates, Publishers, Sunderland, Mass.
- Reyes-Haro, D., Cisneros-Mejorado, A., Arellano, R.O., 2021. Therapeutic Potential of GABAergic Signaling in Myelin Plasticity and Repair. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 662191. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.662191>
- Reyes-Haro, D., González-González, M.A., Pétriz, A., Rosas-Arellano, A., Kettenmann, H., Miledi, R., Martínez-Torres, A., 2013a.  $\gamma$ -Aminobutyric acid- $\rho$  expression in ependymal glial cells of the mouse cerebellum. *J. Neurosci. Res.* 91, 527–534. <https://doi.org/10.1002/jnr.23183>

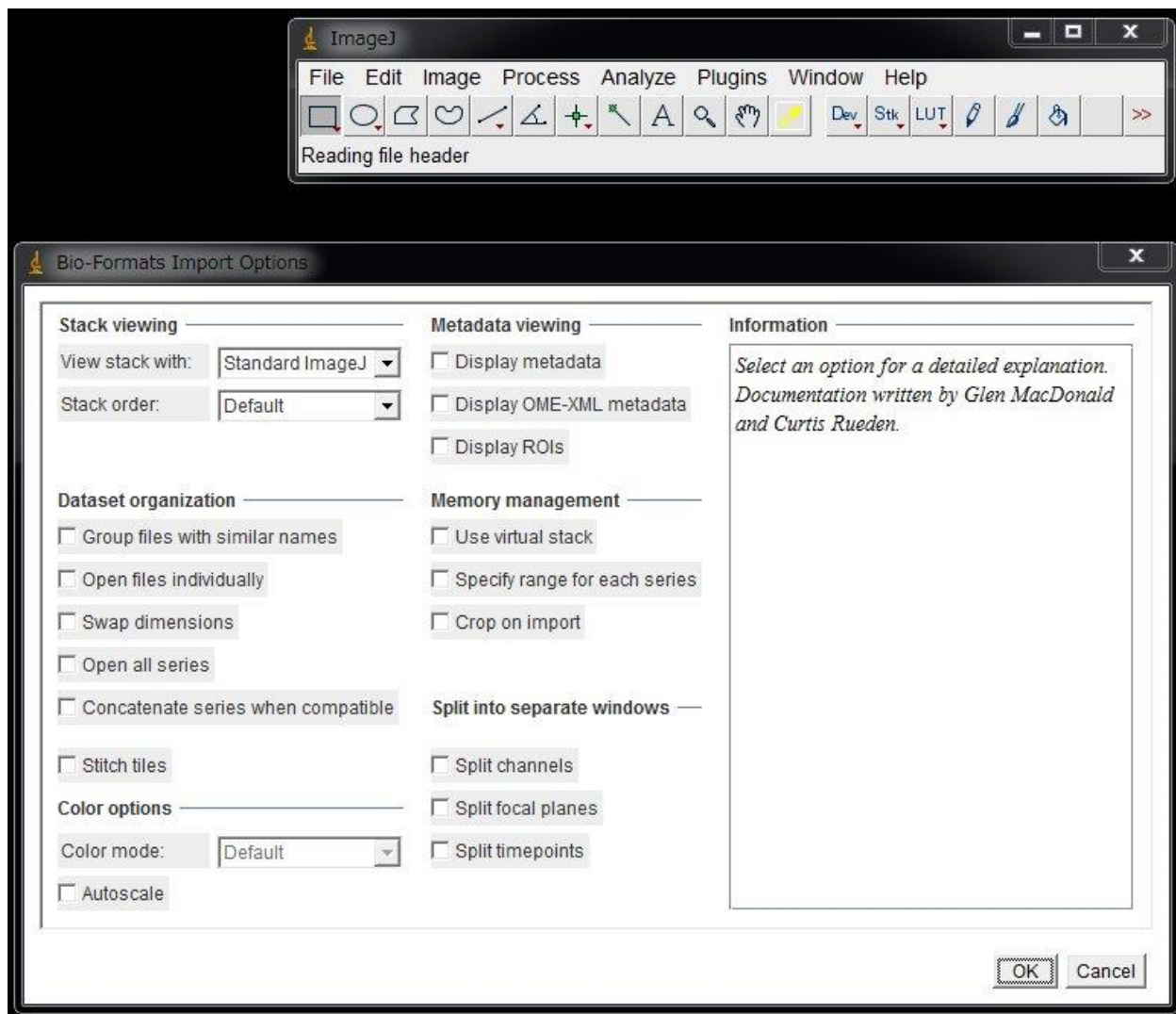
- Reyes-Haro, D., Mora-Loyola, E., Soria-Ortiz, B., García-Colunga, J., 2013b. Regional density of glial cells in the rat corpus callosum. *Biol. Res.* 46, 27–32. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602013000100004>
- Schipke, C.G., Boucsein, C., Ohlemeyer, C., Kirchhoff, F., Kettenmann, H., 2002. Astrocyte Ca<sup>2+</sup> waves trigger responses in microglial cells in brain slices. *FASEB J.* 16, 1–16. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0514fje>
- Seri, B., García-Verdugo, J.M., McEwen, B.S., Alvarez-Buylla, A., 2001. Astrocytes Give Rise to New Neurons in the Adult Mammalian Hippocampus. *J. Neurosci.* 21, 7153–7160. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-18-07153.2001>
- Silbereis, J., Cheng, E., Ganat, Y.M., Ment, L.R., Vaccarino, F.M., 2009. Precursors with Glial Fibrillary Acidic Protein Promoter Activity Transiently Generate GABA Interneurons in the Postnatal Cerebellum. *Stem Cells* 27, 1152–1163. <https://doi.org/10.1002/stem.18>
- Song, I., Volynski, K., Brenner, T., Ushkaryov, Y., Walker, M., Semyanov, A., 2013. Different transporter systems regulate extracellular GABA from vesicular and non-vesicular sources. *Front. Cell. Neurosci.* 7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00023>
- Strick, P.L., Dum, R.P., Fiez, J.A., 2009. Cerebellum and Nonmotor Function. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 413–434. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.060407.125606>
- Sturrock, R.R., 1976. Changes in Neuroglia and Myelination in the White Matter of Aging Mice. *J. Gerontol.* 31, 513–522. <https://doi.org/10.1093/geronj/31.5.513>
- Takayama, C., Inoue, Y., 2004. Extrasynaptic localization of GABA in the developing mouse cerebellum. *Neurosci. Res.* 50, 447–458. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2004.08.012>
- Tanaka, Y., Tozuka, Y., Takata, T., Shimazu, N., Matsumura, N., Ohta, A., Hisatsune, T., 2009. Excitatory GABAergic Activation of Cortical Dividing Glial Cells. *Cereb. Cortex* 19, 2181–2195. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhn238>
- Tavazzani, E., Tritto, S., Spaiardi, P., Botta, L., Manca, M., Prigioni, I., Masetto, S., Russo, G., 2014. Glutamic acid decarboxylase 67 expression by a distinct population of mouse vestibular supporting cells. *Front. Cell. Neurosci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00428>
- Tong, X., Li, X., Zhou, B., Shen, W., Zhang, Z., Xu, T., Duan, S., 2009. Ca<sup>2+</sup> signaling evoked by activation of Na<sup>+</sup> channels and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers is required for GABA-induced NG2 cell migration. *J. Cell Biol.* 186, 113–128. <https://doi.org/10.1083/jcb.200811071>
- Tress, O., Maglione, M., May, D., Pivneva, T., Richter, N., Seyfarth, J., Binder, S., Zlomuzica, A., Seifert, G., Theis, M., Dere, E., Kettenmann, H., Willecke, K., 2012. Panglial Gap Junctional Communication is Essential for Maintenance of Myelin in the CNS. *J. Neurosci.* 32, 7499–7518. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0392-12.2012>
- Verkhatskiĭ, A.N., Butt, A., 2007. *Glial neurobiology: a textbook*. John Wiley & Sons, Chichester, England a; Hoboken, NJ.
- von Bartheld, C.S., Bahney, J., Herculano-Houzel, S., 2016. The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting: Quantifying neurons and glia in human brain. *J. Comp. Neurol.* 524, 3865–3895. <https://doi.org/10.1002/cne.24040>
- Weissman, T.A., Riquelme, P.A., Ivic, L., Flint, A.C., Kriegstein, A.R., 2004. Calcium Waves Propagate through Radial Glial Cells and Modulate Proliferation in the Developing Neocortex. *Neuron* 43, 647–661. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.015>

- Yamanaka, H., Yanagawa, Y., Obata, K., 2004. Development of stellate and basket cells and their apoptosis in mouse cerebellar cortex. *Neurosci. Res.* 50, 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2004.06.008>
- Yan, X.-X., Ribak, C.E., 1998. Developmental expression of  $\gamma$ -aminobutyric acid transporters (GAT-1 and GAT-3) in the rat cerebellum: evidence for a transient presence of GAT-1 in Purkinje cells. *Dev. Brain Res.* 111, 253–269. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(98\)00144-8](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(98)00144-8)
- Yoon, B., Woo, J., Chun, Y., Chun, H., Jo, S., Bae, J.Y., An, H., Min, J.O., Oh, S., Han, K., Kim, H.Y., Kim, T., Kim, Y.S., Bae, Y.C., Lee, C.J., 2014. Glial GABA, synthesized by monoamine oxidase B, mediates tonic inhibition. *J. Physiol.* 592, 4951–4968. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2014.278754>
- Yoon, B.-E., Lee, C.J., 2014. GABA as a rising gliotransmitter. *Front. Neural Circuits* 8. <https://doi.org/10.3389/fncir.2014.00141>
- Zonouzi, M., Scafidi, J., Li, P., McEllin, B., Edwards, J., Dupree, J.L., Harvey, L., Sun, D., Hübner, C.A., Cull-Candy, S.G., Farrant, M., Gallo, V., 2015. GABAergic regulation of cerebellar NG2 cell development is altered in perinatal white matter injury. *Nat. Neurosci.* 18, 674–682. <https://doi.org/10.1038/nn.3990>

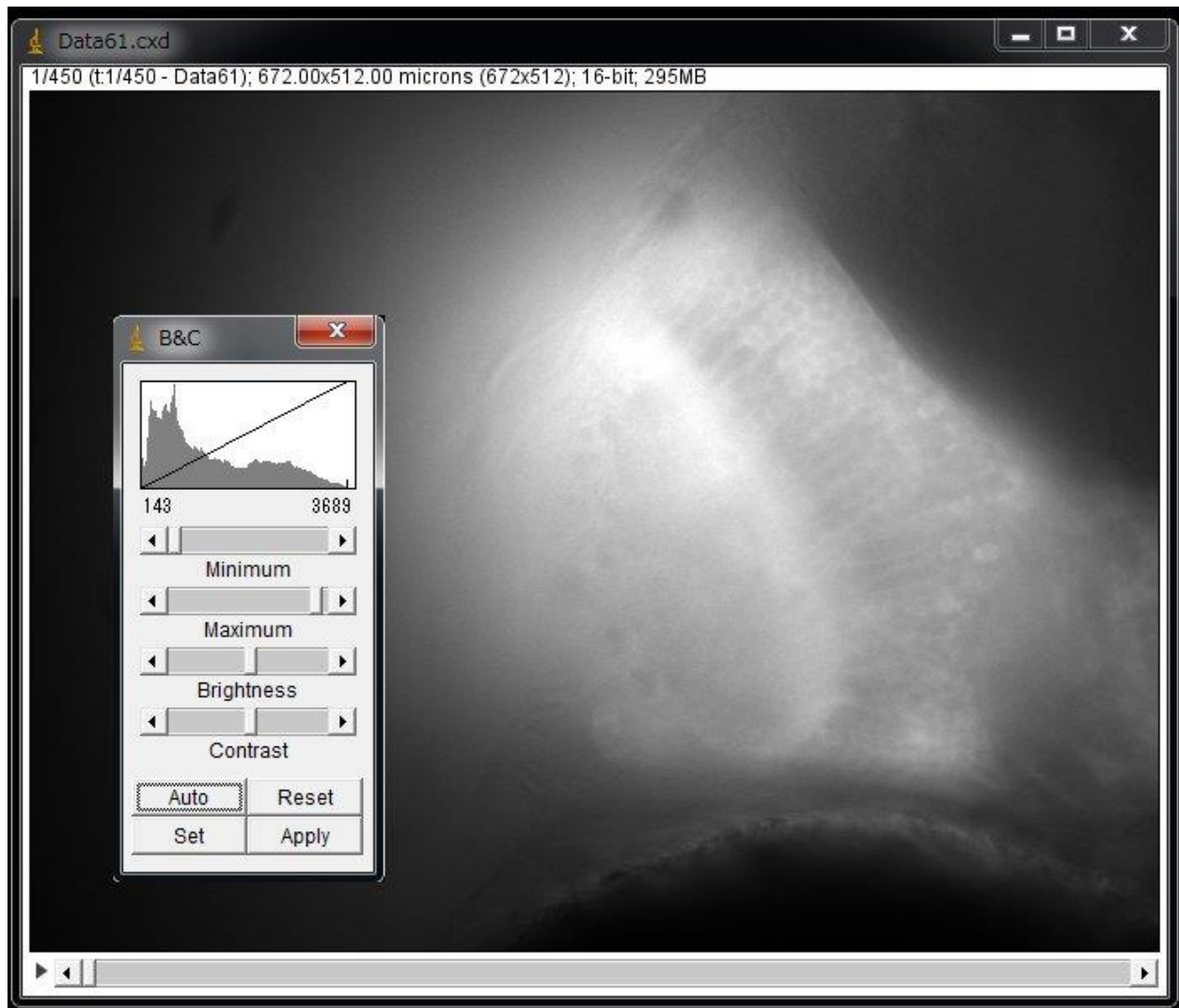
### **Apéndice 1: Análisis de imagen de calcio con fiji**

El análisis de todos los videos se realizó utilizando los softwares Fiji (ImajeJ) and OriginPro8 (OriginLabs).

**Abri el archivo del video deseado en Fiji.**



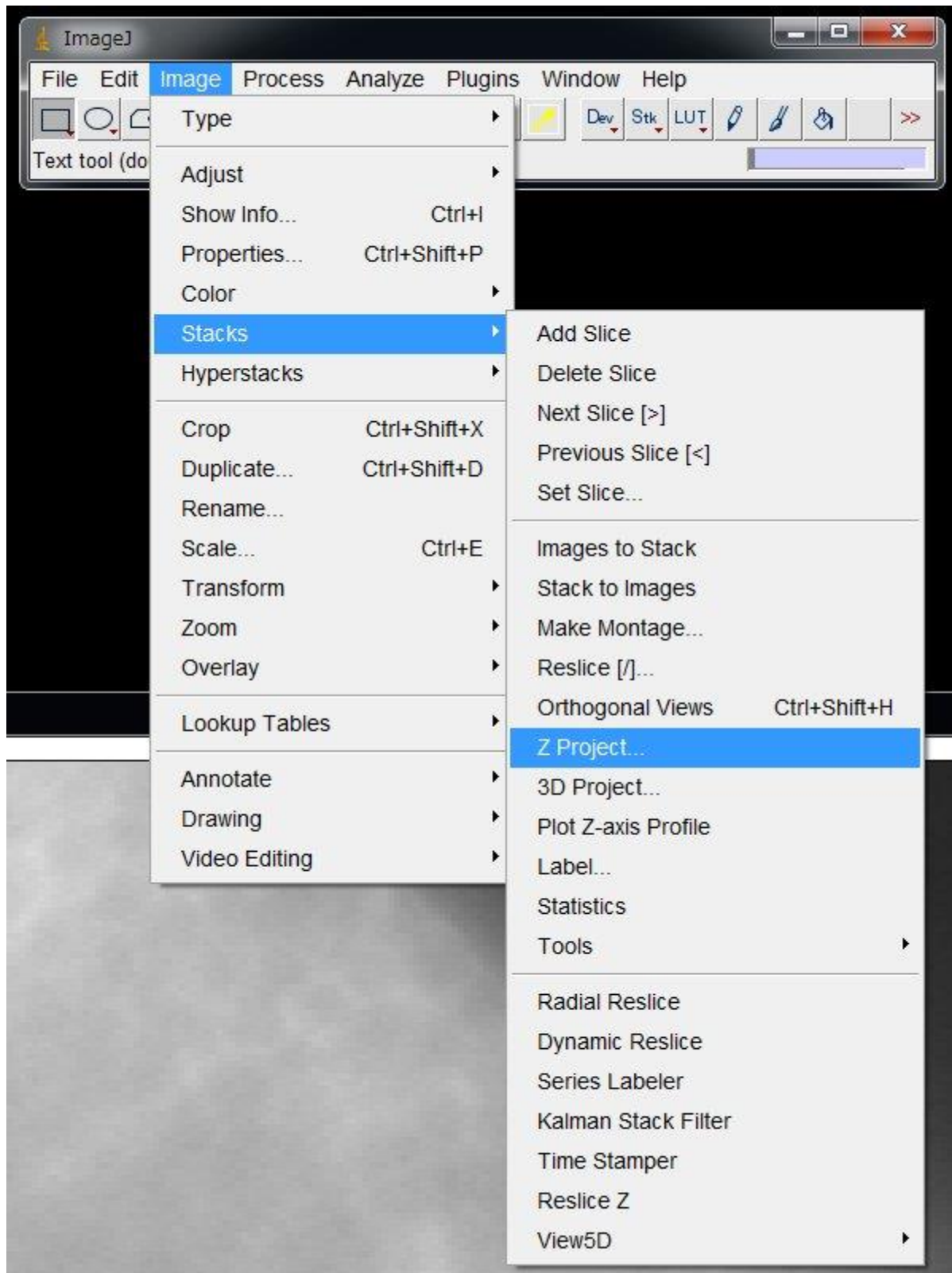
Ajustar el brillo/ contraste de la imagen de manera que permita una correcta visualización de las respuestas, utilizar el botón Auto es un buen punto de partida.



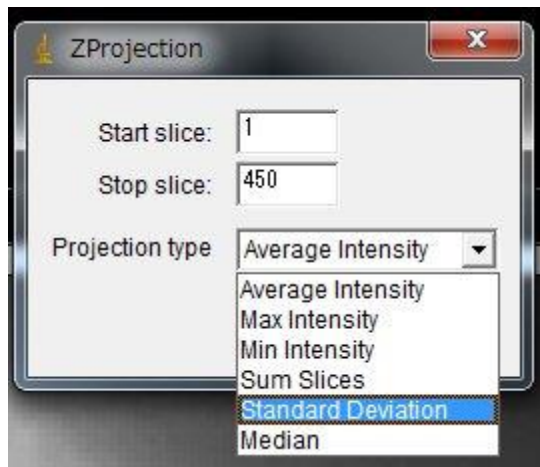
### Identificación y selección

Para la identificación de las células que muestran respuestas calcio y diferenciarlas de las células muertas con alto brillo se utiliza la desviación estándar de la proyección en Z.

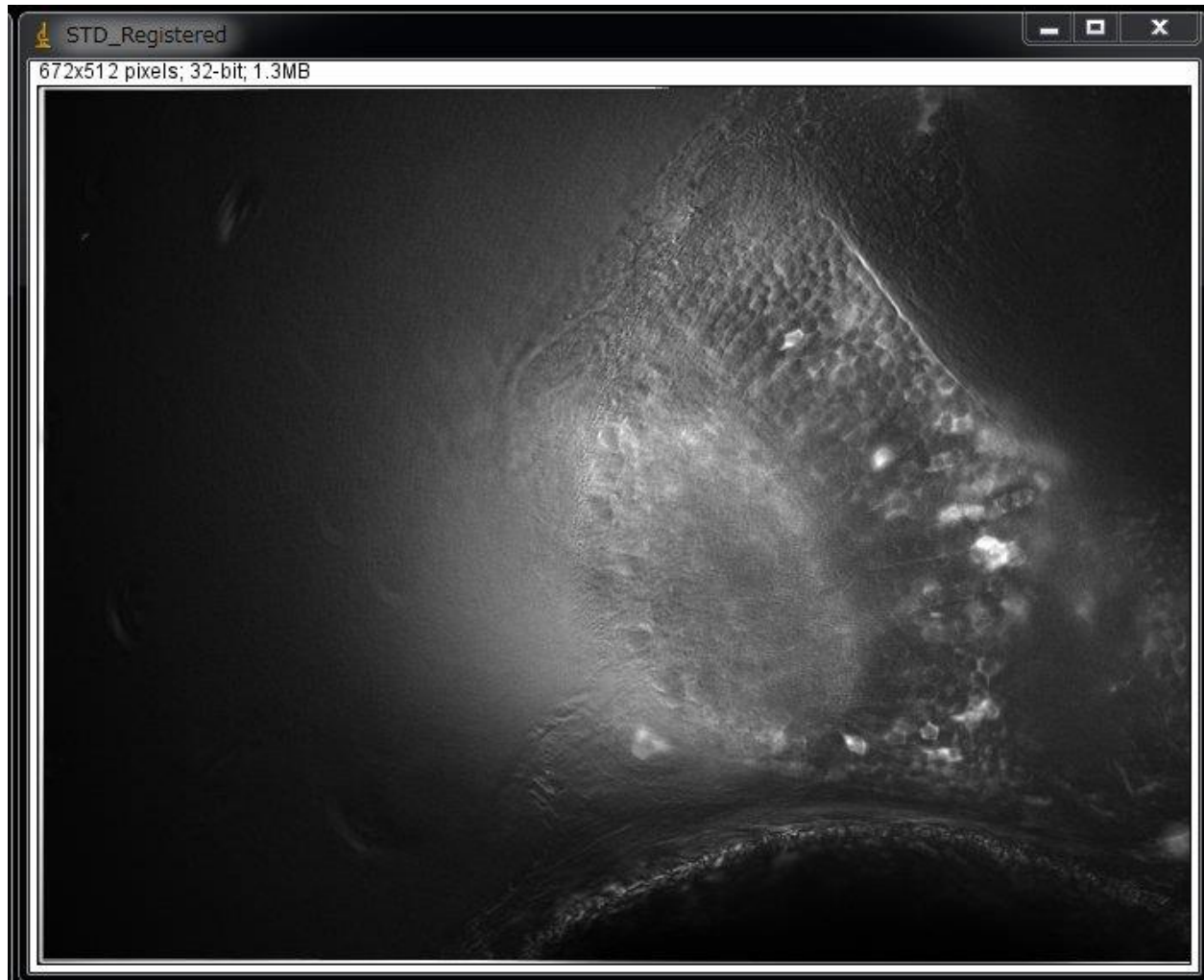
Para hacer esto, dar click en **Image > Stacks > Z Project**. Seleccionar las fotos iniciales y finales a considerar y seleccionar en **Projection type > Standard Deviation**.



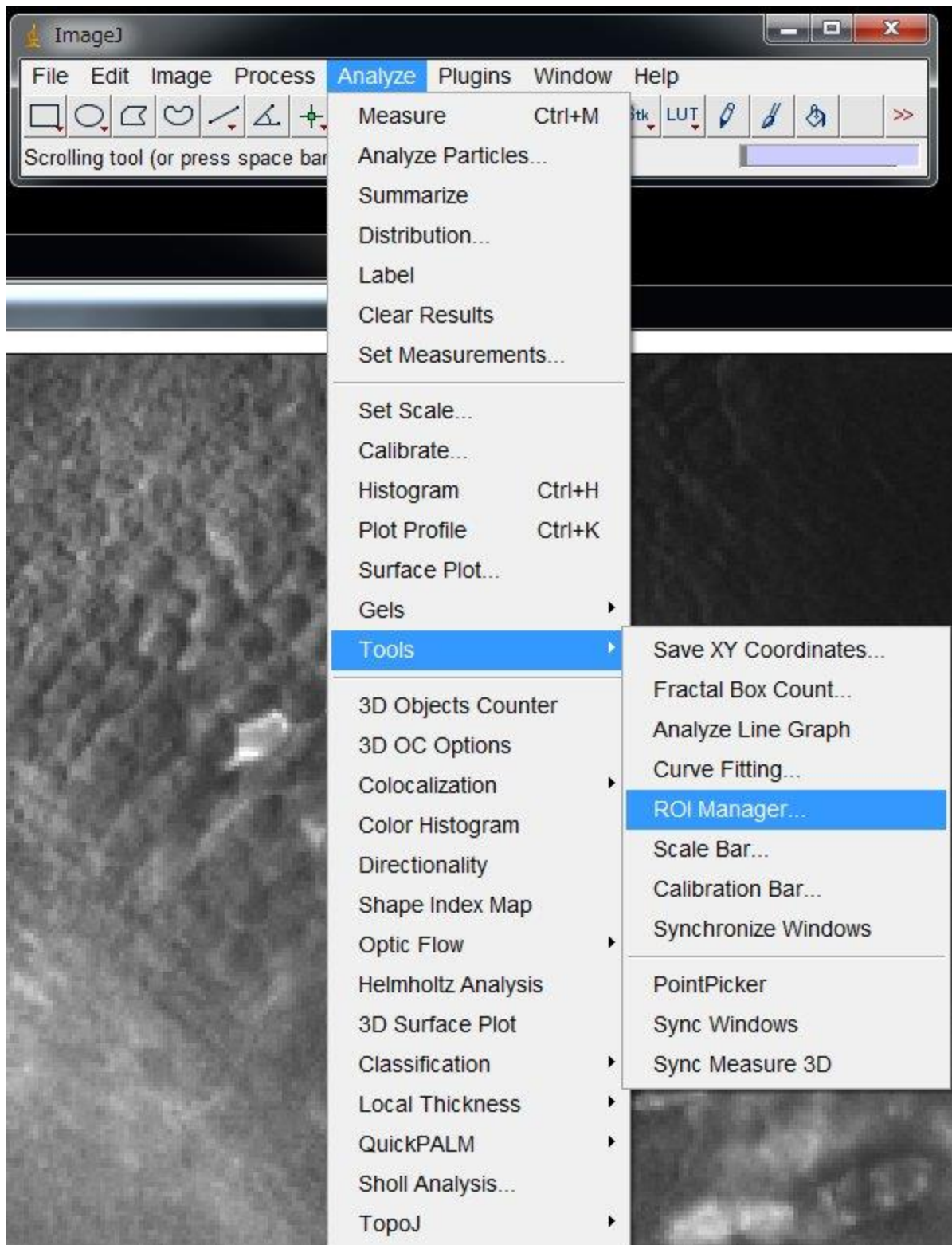




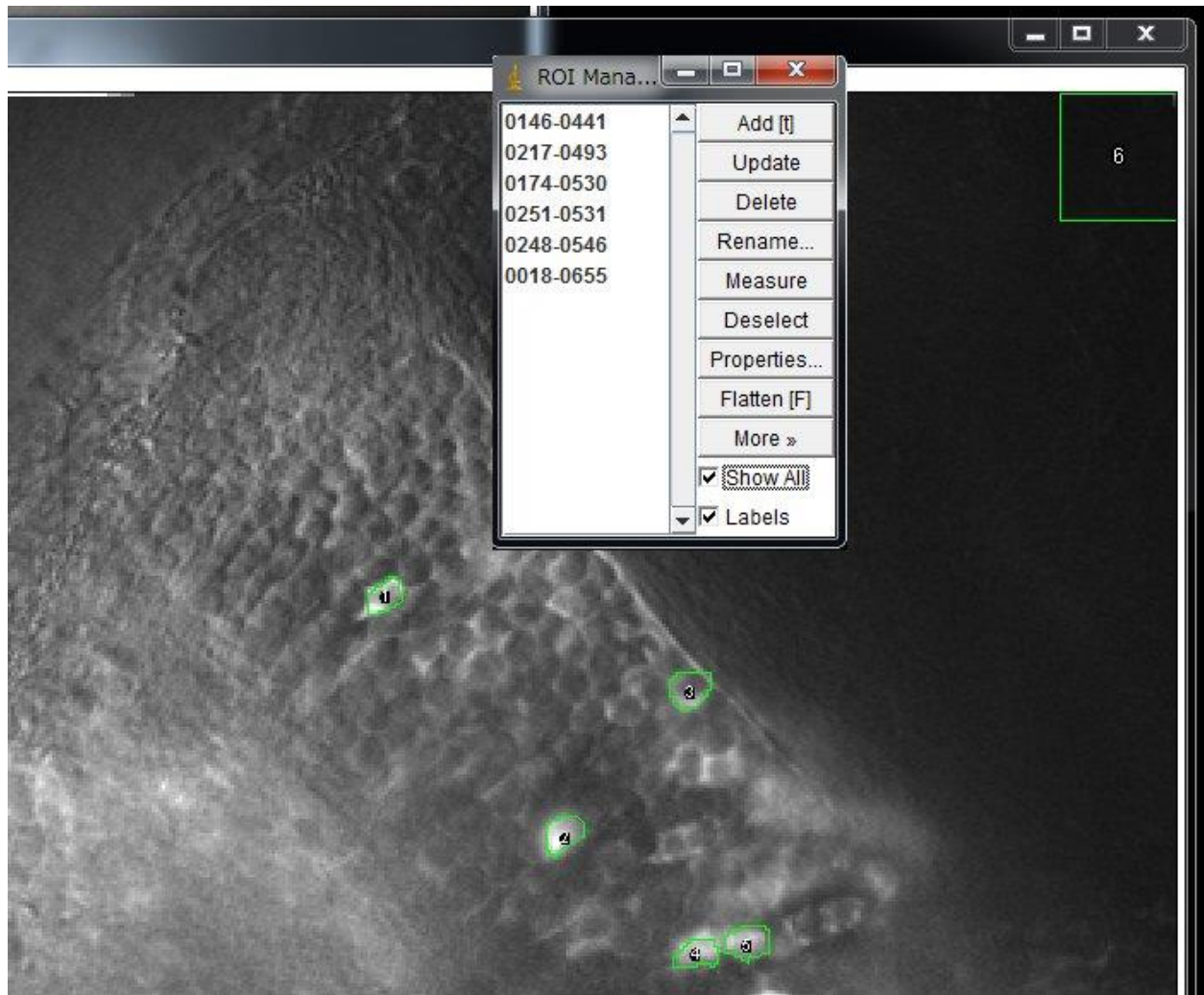
La imagen resultante remarcará las células que presentaron cambios a lo largo del video.



Una vez obtenida esta imagen se puede utilizar como referencia para designar las regiones de interés (ROI). Para esto utilizamos **Analyze > Tool s > ROI Manager ...**

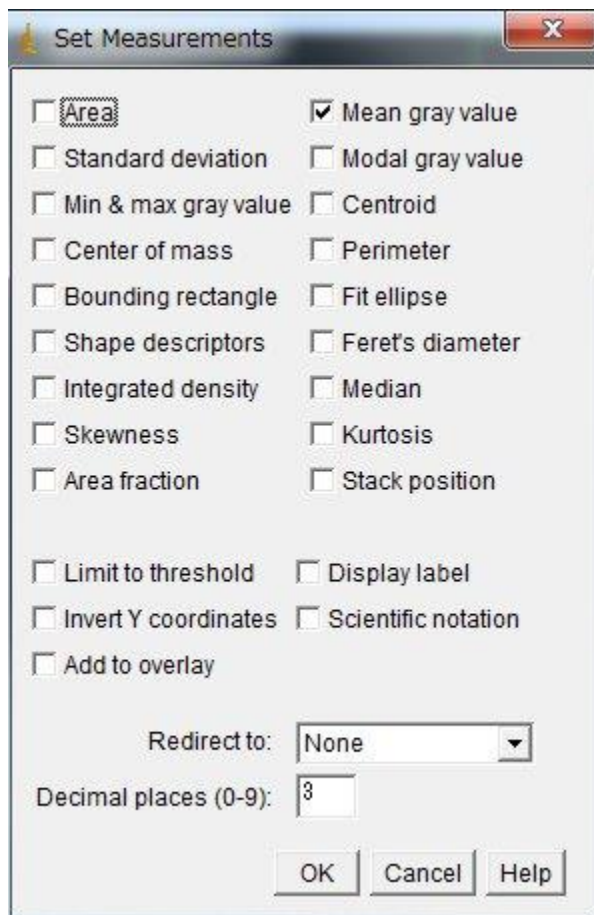
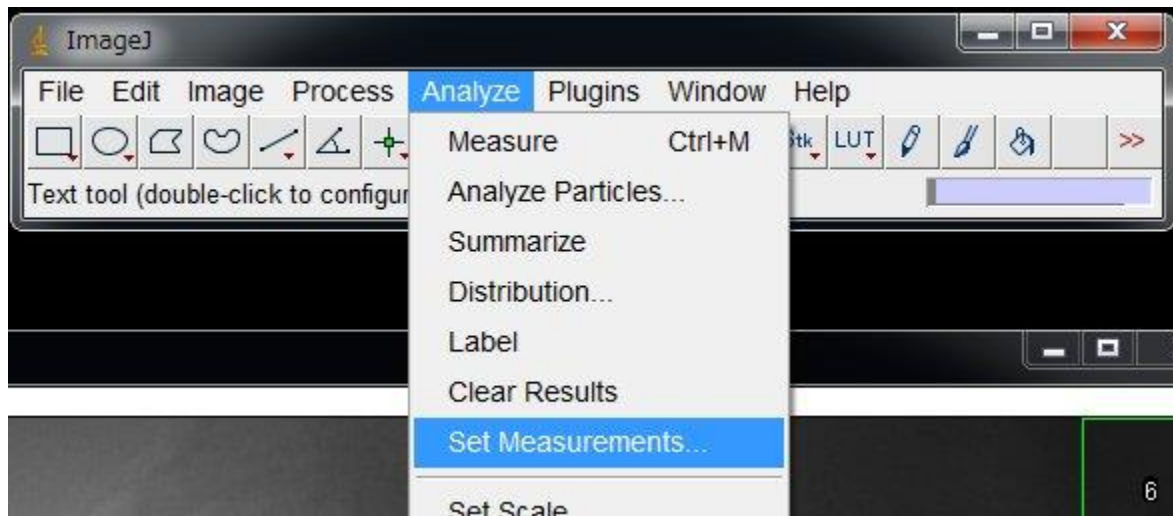


Una vez hecho esto se pueden seleccionar las distintas formas ofrecidas por imageJ, como cuadro, circulo o mano alzada. Posteriormente utilizar esta forma para delimitar una ROI, una vez hecho esto, dar click en **Add** en el **ROI Manager**. Repetir este proceso hasta delimitar todas las ROI en el video. Si se tiene dudas sobre la repetición de una ROI, marcar la casilla **Show All** en el **ROI Manager**.



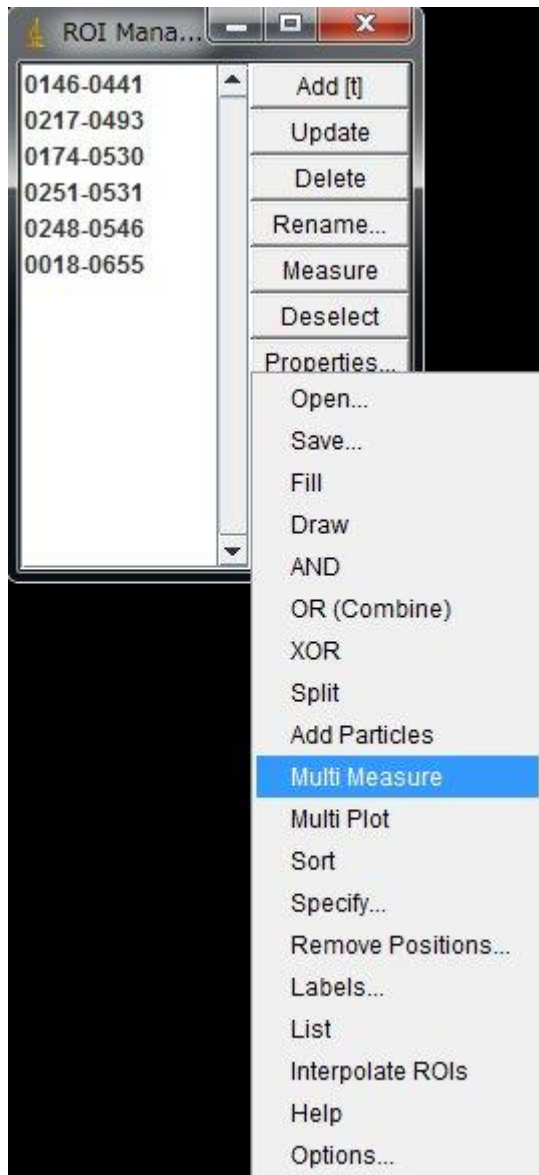
## Medición

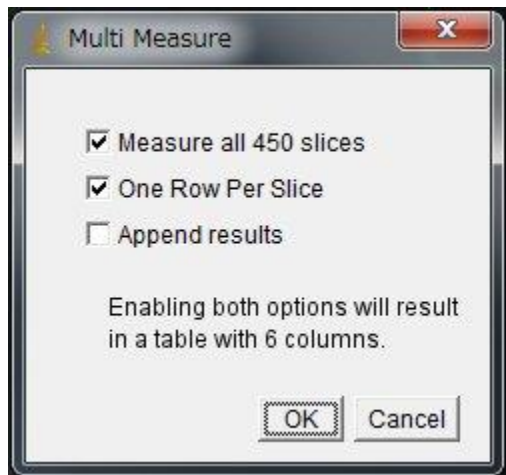
Ir al menú **Analyze > Set Measurements ...**. En el menú **Set Measurements** seleccionar la opción **Mean gray value**



Para medir los valores de cada célula regresamos al ROI Manager, marcamos **Show All**. Después de esto dar4 click en **More > Multi Measure > Click “OK”**







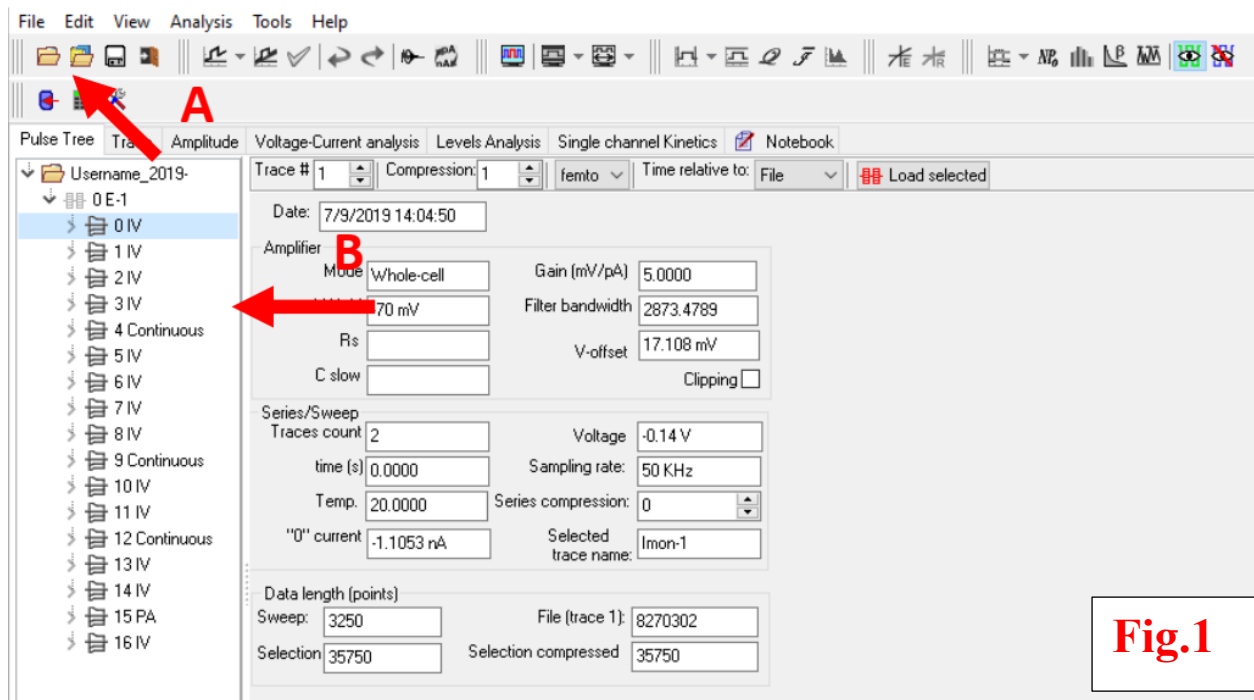
Esto abrirá la ventana de resultados, desde la cual pueden ser copiados y pegados en Excel u OriginPro para hacer el procesamiento y mediciones deseadas.

## **Apéndice 2: Uso de Nest-o-patch para electrofisiología**

Instalar el software Nest-O-Patch y abrirlo (<https://sourceforge.net/projects/nestopatch/>)

Para abrir un archivo no es necesario hacer ninguna conversión, solo dar click en File Open (**1A**) y proceder a seleccionar el archivo deseado.

Esto abrirá los diferentes registros guardados en el archivo (**1B**).

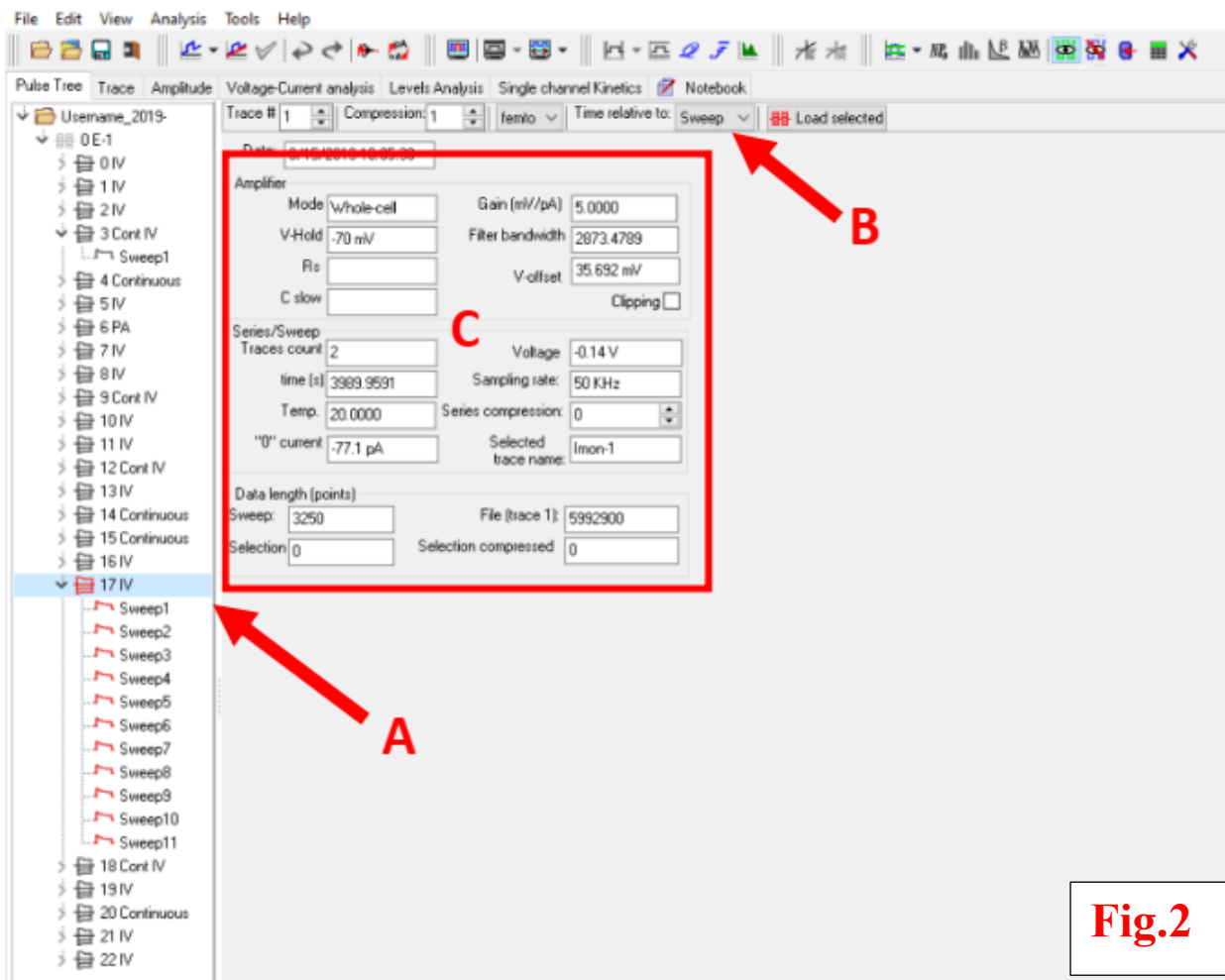


**Fig.1**

Al dar clic en un trazo mostrara la lista de Sweeps (**2A**), si tiene más de uno es necesario poner Time relative to sweeps (**2B**) para una visualización apropiada.

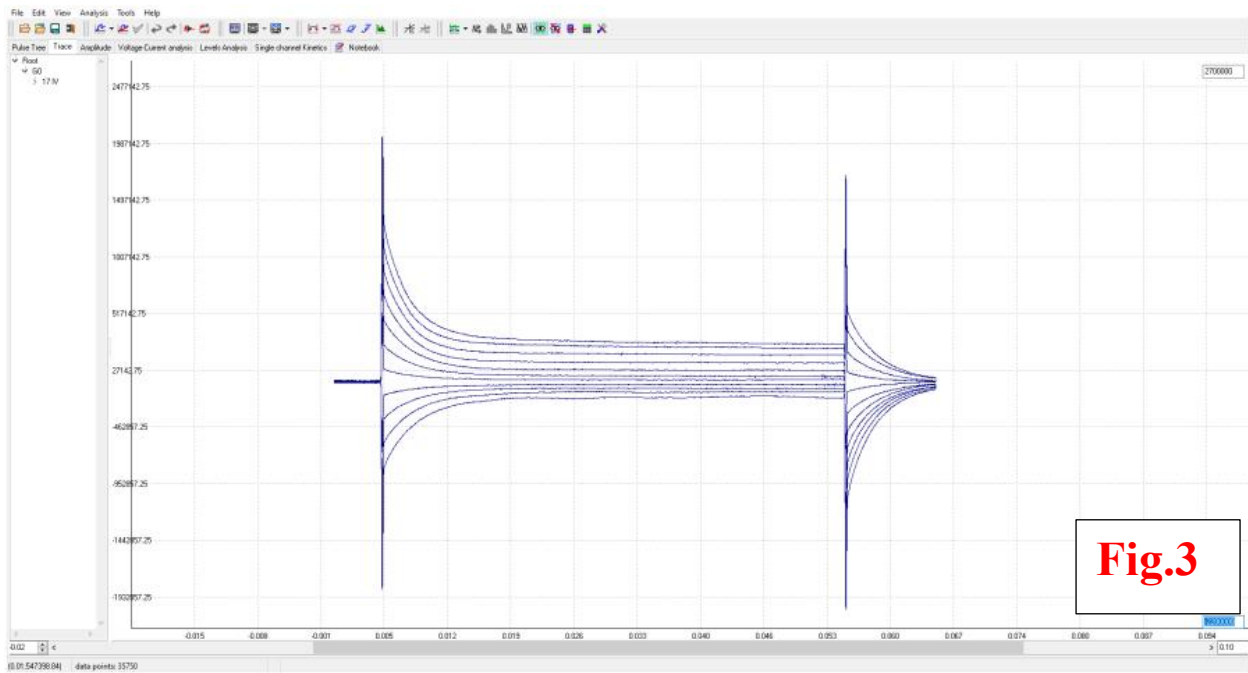
El cuadro de dialogo también mostrara algunos de los ajustes guardados en el archivo para ese pulsa en particular (**2C**).





**Fig.2**

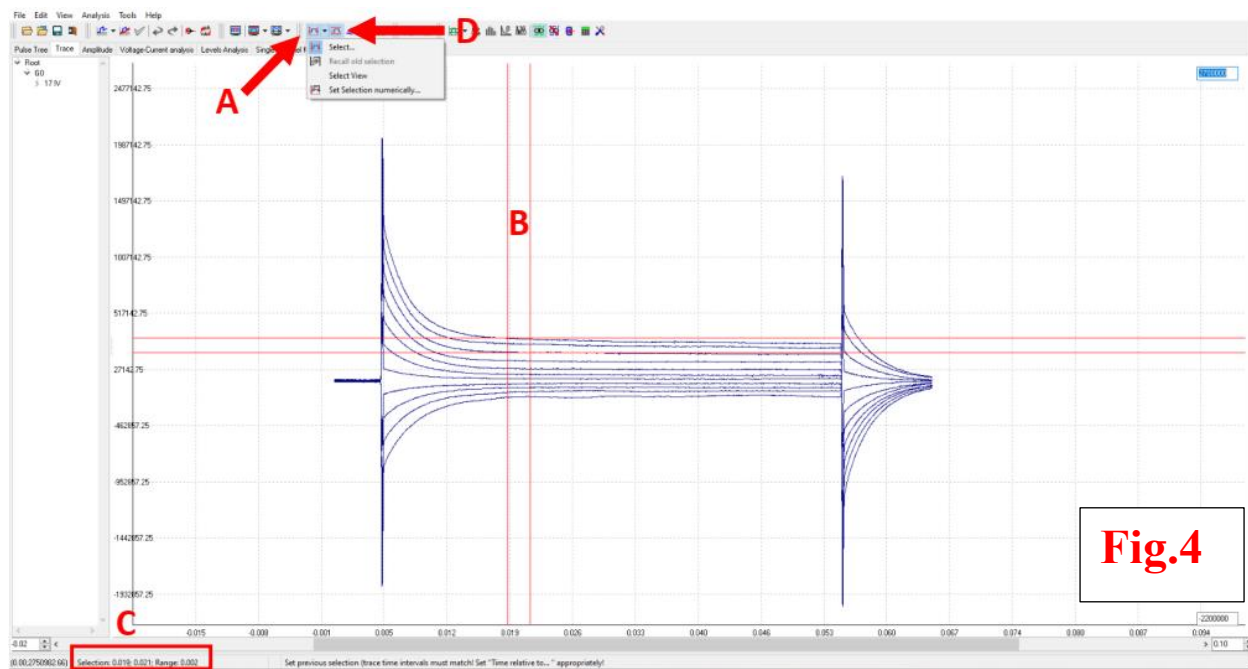
Al dar doble click en el pulso deseado mostrara el trazo registro (3).



Con el botón Select Interval (**4A**) se pueden seleccionar dos puntos y medir el tiempo entre las barras verticales (**4B**)

Dara el resultado de la medición y los puntos inicial y final en esta sección (**4C**)

Para mediciones de amplitud usar el botón Define borders (**4D**), de manera similar a select Interval mostrara la amplitud y los puntos inicial y final en esta sección (**4C**).



Para analizar la curva IV de un experimento se requiere usar el botón IV exp. Series. **(5A)** Este botón solo esta habilitado una vez que se utilizar select Interval para definir la región en la cual se desea realizar la medición.

Este botón dará como resultado una gráfica de la curva **(5B)** así como los valores de voltaje y corriente en forma de una tabla **(5C)**, la cual puede ser copiada y exportada a Excel u Origin.

