



FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA. LEIOA

---

# TRABAJO DE FIN DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

---

## RELEVANCIA DEL RECEPTOR GABA<sub>B</sub> EN EL PROCESO DE MIELINIZACIÓN DURANTE EL DESARROLLO EN RATA

**Alumna:** *Luengas Escuza, Irene*

**Fecha:** 19 de junio de 2020

**Directoras:**

*Dra. María Victoria Sánchez Gómez*

*Dra. Sonia Bañuelos Rodríguez*

**Co-directora:**

*Laura Bayón Cordero*

**Curso Académico**

2019/2020



## ABREVIATURAS

**ANOVA:** Prueba de análisis de varianza, por sus siglas en inglés, *analysis of variance*.

**APC:** Adenomatous polyposis coli.

**CPG35348:** Ácido (3-aminopropil)(dietoximetil)fosfínico.

**EM:** Esclerosis múltiple.

**GABA:** Ácido  $\gamma$ -aminobutírico, por sus siglas en inglés,  *$\gamma$ -aminobutyric acid*.

**GABA<sub>A</sub>R:** Receptor de GABA tipo A, por sus siglas en inglés, *GABA<sub>A</sub> receptor*.

**GABA<sub>B</sub>R:** Receptor de GABA tipo B, por sus siglas en inglés, *GABA<sub>B</sub> receptor*.

**MAG:** Glicoproteína asociada a mielina, por sus siglas en inglés, *myelin-associated glycoprotein*.

**MBP:** Proteínas básica de la mielina, por sus siglas en inglés, *myelin basic protein*.

**MOG:** Glicoproteína de oligodendrocitos de la mielina, por sus siglas en inglés, *myelin oligodendrocyte glycoprotein*.

**NG2:** Antígeno neuroglial 2, por sus siglas en inglés, *neuron-glia antigen 2*.

**NGS:** Suero normal de cabra, por sus siglas en inglés, *normal goat serum*.

**OL:** Oligodendrocito.

**Olig2:** Factor de transcripción de los oligodendrocitos 2.

**OPC:** Célula precursora de oligodendrocito, por sus siglas en inglés, *oligodendrocyte progenitor cell*.

**P6/12/21/34/42:** Día postnatal 6/12/21/34/42.

**PB:** Tampón fosfato, por sus siglas en inglés, *phosphate buffer*.

**PBS:** Tampón fosfato salino, por sus siglas en inglés, *phosphate-buffered saline*.

**PDGF-R $\alpha$ :** Receptor  $\alpha$  del factor de crecimiento derivado de las plaquetas, por sus siglas en inglés, *platelet derived growth factor receptor  $\alpha$* .

**PFA:** Paraformaldehído.

**PLP:** Proteína proteolípida, por sus siglas en inglés, *proteolipid protein*.

**Pre-OL:** Preoligodendrocito.

**SEM:** Error estándar de la media, por sus siglas en inglés, *standard error of the mean*.

**SNC:** Sistema nervioso central.

**U.A.:** Unidades arbitrarias.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1. Mielina	1
1.2. Oligodendrocitos y diferenciación oligodendroglial	1
1.3. Esclerosis múltiple	2
1.4. Sistema GABAérgico en la diferenciación oligodendroglial y mielinización	3
1.5. Hipótesis y objetivos	5
1.6. Limitaciones causadas por la COVID-19	6
2. MATERIALES Y MÉTODOS	6
2.1. Materiales	6
2.2. Animales	7
2.3. Tratamiento farmacológico	7
2.4. Perfusión y procesamiento de tejidos	7
2.5. Análisis inmunohistoquímico	8
2.6. Adquisición y análisis de imágenes	10
2.7. Análisis estadístico	11
3. RESULTADOS	11
3.1. La activación farmacológica de GABA <sub>B</sub> R con baclofeno estimula la mielinización <i>in vivo</i> durante el desarrollo	11
3.1.1. El tratamiento con baclofeno incrementa la mielinización en el giro dentado hipocampal durante el desarrollo	12
3.1.2. La administración de baclofeno estimula la mielinización en el estriado durante el desarrollo	13
3.1.3. El baclofeno promueve el grado de mielinización del nervio óptico durante el desarrollo	14

3.2. La modulación farmacológica de GABA <sub>B</sub> R no estimula la diferenciación de los OLs <i>in vivo</i> en etapas avanzadas del desarrollo	15
3.2.1. El tratamiento con baclofeno no incrementa la diferenciación de OLs en el giro dentado hipocampal en etapas avanzadas del desarrollo	16
3.2.2. El baclofeno no modifica la diferenciación de OLs en nervio óptico en etapas avanzadas del desarrollo	17
3.3. La modulación farmacológica de GABA <sub>B</sub> R no estimula la diferenciación de los OLs <i>in vivo</i> en etapas tempranas del desarrollo	18
4. DISCUSIÓN	20
5. CONCLUSIONES	23
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

### 1.1. MIELINA

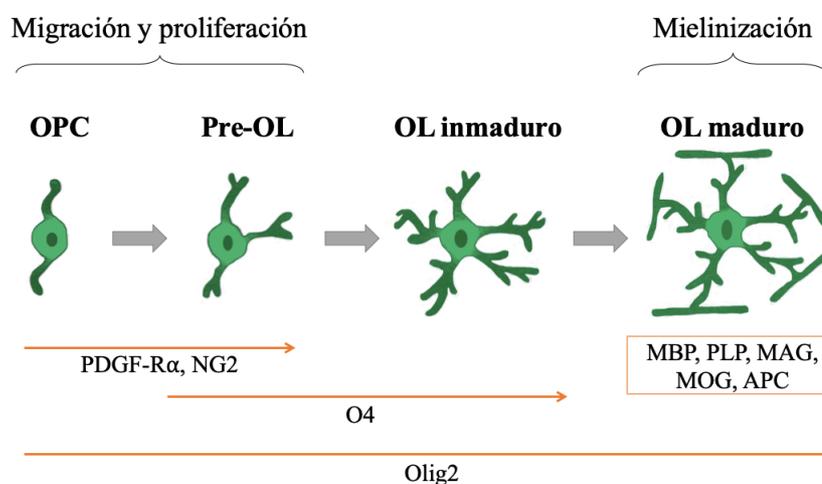
Para que las funciones motoras, sensoriales y cognitivas del sistema nervioso se desempeñen correctamente, es necesario que se dé una rápida propagación de los impulsos nerviosos. En el caso de los vertebrados, esta función es llevada a cabo por la mielina, la cual envuelve y rodea los axones de las neuronas (Tomassy *et al.*, 2016). Esta sustancia tiene una composición 70 % lipídica en el sistema nervioso central (SNC), y los lípidos que la forman son principalmente colesterol, galactosilceramida y fosfolípidos. Por otro lado, también contiene proteínas estructurales, entre las cuales destacan la proteína básica de la mielina (MBP, por sus siglas en inglés, *myelin basic protein*) y la proteína proteolipídica (PLP, *proteolipid protein*) (Simons y Nave, 2015).

### 1.2. OLIGODENDROCITOS Y DIFERENCIACIÓN OLIGODENDROGLIAL

Los oligodendrocitos (OLs) son las células encargadas de la mielinización en el SNC, y para poder llevar a cabo este proceso, deben diferenciarse a partir de las células progenitoras de oligodendrocitos (OPC, *oligodendrocyte progenitor cells*) (Simons y Nave, 2015). Este es un proceso altamente controlado a nivel celular y molecular, principalmente mediante la interacción de los OPCs con diversas moléculas de señalización y factores axonales. La diferenciación de los oligodendrocitos se puede dividir en distintas etapas de maduración, a lo largo de las cuales las células del linaje oligodendroglial presentan diferentes capacidades migratorias y proliferativas, junto a una creciente complejidad morfológica. Además, estas células expresan marcadores específicos que facilitan su identificación y permiten determinar su estado de maduración (**Figura 1**) (Tauheed *et al.*, 2016).

Por un lado, los OPCs son células proliferativas, con gran capacidad migratoria. Expresan diferentes marcadores, como el receptor  $\alpha$  del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF-R $\alpha$ , *platelet derived growth factor receptor  $\alpha$* ) o el antígeno neuroglial 2 (NG2, *neuron-glia antigen 2*). También destaca el factor de transcripción 2 de los OLs (Olig2), el cual se expresa en toda la línea oligodendroglial. A medida que avanzan en el proceso de diferenciación, los OLs pierden los marcadores propios

de OPCs y se convierten en células postmitóticas con procesos largos y ramificados, perdiendo también la capacidad de proliferar y de migrar. En la última fase de la diferenciación, los OLs maduros extienden sus procesos y rodean los axones para formar las vainas de mielina. En cuanto a sus marcadores específicos, los OLs maduros se caracterizan por la expresión de las proteínas integrantes de la mielina MBP y PLP y por la expresión de APC (adenomatous polyposis coli), también conocida como marcador CC1 (**Figura 1**) (Barateiro y Fernandes, 2014; Tauheed *et al.*, 2016).



**Figura 1. Proceso de diferenciación de los OLs y características de cada etapa.** Hay cuatro etapas principales en la maduración de los OLs: OPCs, preoligodendrocitos (Pre-OLs), OLs inmaduros y OLs maduros. En cada etapa del proceso de diferenciación, las células presentan diferentes capacidades, al igual que distintos marcadores específicos. Adaptado de Barateiro y Fernandes (2014).

### 1.3. ESCLEROSIS MÚLTIPLE

En enfermedades desmielinizantes la mielina se separa del axón, lo que impide la correcta transmisión de los potenciales de acción y la pérdida de funciones nerviosas. La esclerosis múltiple (EM) es la enfermedad desmielinizante más común del SNC en humanos, y se trata de una enfermedad crónica y neurodegenerativa que afecta a alrededor de 2,5 millones de individuos a nivel global (Dendrou *et al.*, 2015). La desmielinización producida en esta enfermedad es causada por un proceso inflamatorio autoinmune en el que linfocitos, macrófagos y otras células implicadas en la respuesta inmunológica se infiltran en el cerebro y atacan a los OLs mielinizantes, causando daño en la mielina, pérdida de OLs y daño axonal. En respuesta a este

proceso, en la fase aguda de la enfermedad (caracterizada por brotes intermitentes), la mielina dañada es reparada por OLs mielinizantes procedentes de la diferenciación de los OPCs que migran hacia las lesiones desmielinizantes. Sin embargo, en la fase crónica, los OPCs no son capaces de diferenciarse a OLs mielinizantes y, por tanto, la remielinización de los axones no se lleva a cabo de manera eficiente, produciéndose daños neurodegenerativos irreparables (Tauheed *et al.*, 2016).

Los tratamientos actuales de la EM se basan en terapias modificadoras de la enfermedad y consisten en la aplicación de fármacos inmunosupresores o inmunomoduladores para prevenir la aparición de nuevos brotes, por lo que son efectivos únicamente durante las fases agudas de la enfermedad (Dobson y Giovannoni, 2019). Por lo tanto, el desarrollo de terapias basadas en la potenciación de la remielinización podría ser de gran interés, ya que permitirían recuperar funciones motoras y cognitivas alteradas e incluso revertir fases crónicas de la enfermedad. En esta línea, conocer los mecanismos moleculares subyacentes a la regulación de la diferenciación de los OLs y la mielinización ayudaría a identificar nuevas dianas para el diseño de estrategias efectivas frente a enfermedades desmielinizantes, y en concreto frente a la EM.

#### **1.4. SISTEMA GABAÉRGICO EN LA DIFERENCIACIÓN OLIGODENDROGLIAL Y MIELINIZACIÓN**

Los procesos de diferenciación de los OLs y mielinización están regulados por múltiples moléculas que permiten una comunicación OL-neurona, entre las que se encuentran diversos neurotransmisores y factores de crecimiento. Estas moléculas pueden, en último término, modular la migración, proliferación y/o diferenciación de los OPCs, así como la mielinización de los OLs maduros (Tomassy *et al.*, 2016). En concreto, en los últimos años ha aumentado notablemente el número de evidencias que apoyan la importancia del neurotransmisor ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA,  *$\gamma$ -aminobutyric acid*) y el sistema GABAérgico en la modulación de dichos procesos (Arellano *et al.*, 2016, Hamilton *et al.*, 2017; Serrano-Regal *et al.*, 2019).

GABA es el principal neurotransmisor inhibitorio del SNC de vertebrados. Dentro del sistema GABAérgico, existen dos subtipos principales de receptores: el receptor ionotrópico GABA<sub>A</sub>R (GABA<sub>A</sub>R, *GABA<sub>A</sub> receptor*), que permite el paso de iones

cloruro (Cl<sup>-</sup>), y el receptor metabotrópico GABA<sub>B</sub> (GABA<sub>B</sub>R, *GABA<sub>B</sub> receptor*), acoplado a proteínas G y constituido por un heterodímero formado por las subunidades GABA<sub>B1</sub> y GABA<sub>B2</sub> (Angulo *et al.*, 2008; Frangai y Fran *et al.*, 2019). Está descrito que ambos tipos de receptores se expresan en células del linaje oligodendroglial, manteniéndose la expresión de GABA<sub>B</sub>R a lo largo del proceso de maduración, lo que apoyaría la participación de estos receptores en la regulación de procesos funcionales en los OLs (Serrano-Regal *et al.*, 2019).

En esta línea, existen diversos trabajos que apoyan la implicación de los receptores de GABA en el control de la diferenciación de los OLs y la mielinización. Estudios como el de Hamilton *et al.* (2017) y Arellano *et al.* (2016) indican que GABA, al actuar a través de GABA<sub>A</sub>R *in vitro*, reduce el número de células oligodendrogliales y, por lo tanto, modula negativamente la mielinización. Este efecto parece verse alterado en escenarios patológicos, ya que, en condiciones hipóxicas, la señalización de GABA<sub>A</sub>R se ve disminuida, ocasionando un aumento en la proliferación de OPCs, reduciendo la cantidad de OLs maduros y disminuyendo, por tanto, la mielinización (Zonouzi *et al.*, 2015). De la misma forma, el papel de GABA<sub>A</sub>R en la diferenciación de los OLs y en la mielinización puede cambiar en algunas condiciones fisiológicas, como en el embarazo, puesto que se ha observado que la señalización de GABA<sub>A</sub>R es esencial para mejorar la remielinización en ratas en fases de embarazo avanzadas (Kalakh y Mouihate, 2019).

La mayor parte de los estudios realizados sobre el papel de GABA en la regulación de la diferenciación de los OLs y la mielinización se centran en GABA<sub>A</sub>R. Sin embargo, un reciente trabajo de nuestro grupo pone de manifiesto que los GABA<sub>B</sub>R desempeñan un papel importante en estos procesos *in vitro* (Serrano-Regal *et al.*, 2019). El estudio indica que el tratamiento de cultivos puros de OLs de rata con GABA o ácido 4-amino-3-(4-clorofenil) butanóico (baclofeno), agonista específico de GABA<sub>B</sub>R, acelera la diferenciación de OPCs, estimulando la formación y ramificación de sus procesos e incrementando la expresión de las proteínas de la mielina, como MBP. Por el contrario, el tratamiento con un fármaco antagonista de GABA<sub>B</sub>R invierte este efecto. Estos resultados sugieren que la activación de GABA<sub>B</sub>R tiene un papel inductor de la diferenciación de los OLs y la expresión de las proteínas de la mielina.

De esta forma, GABA se presenta como un modulador de elevada relevancia para la diferenciación oligodendroglial y la mielinización. Por ello, el estudio en profundidad de la implicación del sistema GABAérgico en la funcionalidad oligodendroglial, en especial de GABA<sub>B</sub>R, permitirá establecer las bases para el desarrollo de estrategias terapéuticas que promuevan la remielinización y mejoren el curso de enfermedades desmielinizantes como la EM.

## 1.5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Considerando la potencial relevancia de GABA<sub>B</sub>R en la diferenciación de los OLs y la mielinización observada *in vitro*, se estableció la hipótesis de que la administración *in vivo* de moduladores farmacológicos de GABA<sub>B</sub>R durante el desarrollo postnatal de ratas tendría un impacto sobre el proceso de mielinización y la diferenciación oligodendroglial en distintas áreas cerebrales. En concreto, la hipótesis planteada fue que la administración *in vivo* de baclofeno, agonista específico de GABA<sub>B</sub>R, estimularía dichos procesos, mientras que la administración del ácido (3-aminopropil)(dietoximetil)fosfínico (CGP35348), antagonista específico de estos receptores, no conllevaría un efecto estimulador.

Con el fin de comprobar esta hipótesis, en este Trabajo de Fin de Grado se ha planteado el siguiente objetivo general:

- Estudiar el efecto de la aplicación *in vivo* de baclofeno y CGP35348 en los procesos de mielinización y en la diferenciación oligodendroglial en distintas áreas cerebrales durante el desarrollo postnatal de ratas.

Este objetivo general se desglosa en los siguientes objetivos concretos:

- Evaluar el impacto de la administración *in vivo* de baclofeno y CGP35348 en el grado de mielinización del giro dentado hipocampal y áreas de sustancia blanca cerebral (estriado y nervio óptico) en etapas avanzadas de la mielinización en rata.
- Determinar el efecto de baclofeno y CGP35348 en el proceso de diferenciación oligodendroglial en el giro dentado hipocampal y nervio óptico en etapas avanzadas de la mielinización en rata.

- Analizar el efecto de baclofeno y CGP35348 en el grado de diferenciación oligodendroglial en el giro dentado hipocampal en etapas más tempranas del desarrollo de ratas.

## 1.6. LIMITACIONES CAUSADAS POR LA COVID-19

Debido a la situación excepcional provocada por la COVID-19, ha habido parte del trabajo que no se ha podido realizar o completar. Principalmente, no se ha podido realizar el análisis de los tejidos de nervio óptico de los animales perfundidos a edades tempranas, durante el tratamiento, pese a haber sido el tejido debidamente procesado. Tampoco se ha podido completar el estudio del nervio óptico de todos los animales perfundidos y procesados en los días postnales entre 34 y 42 (P34-P42). Asimismo, no se ha podido completar el análisis inmunohistoquímico en nervio óptico analizando posibles cambios en la población oligodendroglial total, con un marcaje frente a Olig2.

Debido a los prometedores resultados obtenidos y el valioso tejido disponible que queda por analizar, nuestra intención en un futuro próximo es continuar con el estudio propuesto y completar el análisis en profundidad. En cualquier caso, es necesario indicar que durante todas las semanas de confinamiento se ha mantenido un contacto continuo y exhaustivo y se ha trabajado con mayor énfasis en el análisis de imágenes, obtención de datos, lectura bibliográfica y discusión de los resultados.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. MATERIALES

Los fármacos y reactivos utilizados en este trabajo se indican a continuación, junto a las casas comerciales que los suministraron: baclofeno (Tocris, Bristol, Reino Unido); CGP35348 (HelloBio, Bristol, Reino Unido); cloruro sódico (NaCl), hidrato de clorato,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y sacarosa (Panreac, Darmstadt, Alemania); paraformaldehído (PFA), etilenglicol, azida sódica, Triton X-100 y DAPI (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, EE.UU.); glicerol (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania); Tissue-Tek<sup>®</sup>OCT (Sakura Finetek, Barcelona, España); etanol (Sharlab, Barcelona, España); suero normal de cabra (NGS, *normal goat serum*) (Bidco Palex, Madrid, España); Glycergel (Dako Agilent, Carpinteria, California, EE.UU.) y ProLong<sup>™</sup>

*Gold Antifade Mountant* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.).

## **2.2. ANIMALES**

Todos los experimentos fueron realizados cumpliendo los requisitos y con la aprobación del Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) y la directiva del Consejo de las Comunidades Europeas. Para estos estudios se emplearon ratas Sprague Dawley recién nacidas, obtenidas del Animalario del Campus de Vizcaya de la UPV/EHU (Leioa, España), y su manipulación fue realizada en todo momento por personal debidamente acreditado. Durante el transcurso de los experimentos, los animales fueron mantenidos en instalaciones acondicionadas con acceso ilimitado a comida y agua. Dado que no se observaron diferencias entre animales machos y hembras atribuibles al sexo, se agruparon ratas de ambos sexos para el tratamiento de los resultados.

## **2.3. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO**

Para estudiar el efecto de la administración de moduladores farmacológicos de GABA<sub>B</sub>R en el proceso de mielinización y diferenciación oligodendroglial durante el desarrollo, las crías de rata Sprague Dawley procedentes de una misma camada se dividieron en tres grupos que fueron tratados mediante inyecciones intraperitoneales diarias, con solución salina (0,9% NaCl, control), con el fármaco agonista específico de GABA<sub>B</sub>R baclofeno (4 mg/kg/día) o con el fármaco antagonista específico CGP35348 (10 mg/kg/día), desde P6 hasta P12. Tanto el baclofeno como el CGP35348 se diluyeron en solución salina al 0,9% para su administración, y el volumen de inyección en todos los casos fue de 4 mL/kg. Los animales fueron procesados para el análisis inmunohistoquímico de sus tejidos nerviosos a P12, durante el tratamiento y coincidiendo con el inicio de la mielinización, y a P34-P42, después del tratamiento, en una fase de mielinización más avanzada.

## **2.4. PERFUSIÓN Y PROCESAMIENTO DE TEJIDOS**

En los tiempos indicados, las ratas Sprague Dawley fueron sometidas a un proceso de perfusión para la obtención del tejido nervioso y su posterior estudio

inmunohistoquímico. Con este objetivo, los animales se anestesiaron con hidrato de clorato (1,2 mg/kg) diluido en tampón salino (PBS, *phosphate-buffered saline*) (142 mM NaCl, 2,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,3) y se perfundieron por vía transcardíaca durante 15-20 minutos con una solución de PFA al 4% diluida en tampón fosfato (PB, *phosphate buffer*) 0,1 M (25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 75 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,3). Tras la perfusión, los cerebros y nervios ópticos fueron extraídos y post-fijados en la misma solución de PFA durante 3 h a temperatura ambiente en agitación suave, tras lo cual fueron almacenados en PBS con azida sódica al 0,02 % (v/v) a 4 °C.

Para el procesamiento del tejido cerebral, se obtuvieron secciones coronales de cerebro con un grosor de 40 µm mediante un microtomo de cuchilla vibratoria Microm HM650V (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.). Las secciones de cerebro fueron almacenadas en solución crioprotectora (30 % etilenglicol (v/v), 30 % glicerol (v/v) y 10 % PB 0,4 M (v/v) en agua destilada) a -20 °C.

Por otro lado, para el procesamiento del tejido de nervio óptico, inicialmente este se sumergió en PBS con 15% de sacarosa (p/v) durante 24 h para su crioprotección. Después, fue congelado mediante su inclusión en Tissue-Tek<sup>®</sup>OCT a -35 °C y cortado en secciones longitudinales de 12 µm de grosor por medio de un criostato CM3050-S (Leica Biosystems, Wetzlar, Alemania). Los cortes obtenidos fueron colocados sobre portaobjetos cargados positivamente (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) y conservados a -20 °C.

## 2.5. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO

El estudio del efecto de la administración de los moduladores farmacológicos de GABA<sub>B</sub>R durante el desarrollo de ratas en la diferenciación de OLs y mielinización se realizó con análisis inmunohistoquímicos, usando anticuerpos específicos dirigidos a marcadores de la mielina y de diferentes etapas de maduración de los OLs (**Tabla 1**).

En el caso de los cortes de cerebro, las secciones se colocaron en flotación en una placa de 24 pocillos para su procesamiento. En primer lugar, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS a temperatura ambiente en agitación suave para eliminar la solución crioprotectora en la que se encontraban almacenados. Debido a la composición rica en lípidos de la mielina y para que el anticuerpo accediera de manera correcta al antígeno,

en el caso de los experimentos en los que se emplearon anticuerpos frente a MBP, fue necesario permeabilizar los cortes de cerebro con etanol absoluto durante 10 minutos a -20 °C, y realizar 3 lavados adicionales con PBS para eliminar adecuadamente el etanol. Después, los cortes se incubaron en una solución bloqueadora y permeabilizante de PBS con 5 % de NGS (v/v) y 0,1 % de Triton X-100 (v/v) durante una 1 h en agitación suave. Tras el bloqueo, el tejido fue incubado con anticuerpos primarios (**Tabla 1**) diluidos a las proporciones indicadas en una solución de PBS con 1 % de NGS (v/v) y 0,1 % de Triton X-100 (v/v) durante toda la noche a 4 °C en agitación suave.

**Tabla 1. Anticuerpos primarios empleados en el análisis inmunohistoquímico.** Se detallan los anticuerpos primarios empleados, así como las especies huésped donde fueron producidos, la dilución a la que se utilizaron, la compañía comercial de la que se obtuvieron y el antígeno al que se unen.

Anticuerpo	Especie huésped	Dilución de uso	Referencia/Compañía	Antígeno
Anti-MBP	Conejo	1:200	AB980/Millipore	MBP: proteína estructural de la mielina
Anti-MBP	Ratón	1:1000	808401/Biolegend	
Anti-Olig2	Conejo	1:1000	AB15328/Millipore	Olig2: marcador específico de toda la línea oligodendrial
Anti-APC (CC1)	Ratón	1:200	OP80/Calbiochem	APC: marcador específico de OLs maduros

Al día siguiente, los cortes de cerebro se sometieron de nuevo a tres lavados con PBS para eliminar los anticuerpos primarios no unidos a los antígenos de interés. Después, las secciones se incubaron con anticuerpos secundarios unidos a moléculas fluorescentes (**Tabla 2**) y DAPI (4 µg/mL) en una solución de PBS con 1 % de NGS (v/v) y 0,1 % de Triton X-100 (v/v) durante 1 h a temperatura ambiente en agitación suave. La tinción DAPI se empleó para el marcaje de los núcleos celulares presentes en las preparaciones. Por último, los tejidos fueron sometidos a tres lavados con PBS para eliminar los anticuerpos secundarios libres, se montaron en portaobjetos de vidrio gelatinizados al 2 % (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EE.UU.) utilizando el medio de montaje Glycergel y se cubrieron con cubreobjetos. Las preparaciones se dejaron secar durante 24 h a 4 °C.

**Tabla 2. Anticuerpos secundarios empleados en el análisis inmunohistoquímico.** Se detallan los anticuerpos secundarios empleados, así como las especies huésped donde fueron producidos, la dilución a la que se utilizaron y la compañía comercial de la que se obtuvieron.

Anticuerpo	Especie huésped	Dilución de uso	Referencia/Compañía
Anti-Mouse IgG Alexa 488	Cabra	1:400	A11001/Invitrogen
Anti-Mouse IgG Alexa 594	Cabra	1:500	A11005/Invitrogen
Anti-Rabbit IgG Alexa 488	Cabra	1:500	A11008/Invitrogen
Anti-Rabbit IgG Alexa 594	Cabra	1:400	A11012/Invitrogen

En el caso de los nervios ópticos, el procedimiento se realizó en el propio portaobjetos en el que se encontraban los cortes inmovilizados. Primero, las secciones se dejaron atemperar durante media hora y se rehidrataron con PBS durante otra media hora. Una vez rehidratado el tejido, se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito anteriormente para los cortes de cerebro. En este caso y, para favorecer la preservación de la señal fluorescente al tratarse de cortes de menor grosor, se empleó el medio de montaje antidecoloración ProLong<sup>TM</sup>. Debido a las especificaciones del medio de montaje, las preparaciones se dejaron secar durante 24 h a temperatura ambiente.

## 2.6. ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE IMÁGENES

Respecto a las secciones cerebrales, las imágenes se obtuvieron por medio de un escáner digital automatizado Slide Scanner MIDI II panorámico (3DHistech, Budapest, Hungría) utilizando un objetivo 20x con una apertura numérica de 0,8. En todos los casos se emplearon secciones de tejido obtenidas de áreas con coordenadas anatómicas semejantes. Una vez obtenidas las imágenes de cada portaobjetos, se realizaron anotaciones de diferentes áreas de cada sección (estriado y giro dentado) mediante los programas informáticos CaseViewer y CaseConverter (3DHistech, Budapest, Hungría). Por otra parte, respecto al nervio óptico, las imágenes se obtuvieron mediante un microscopio confocal Zeiss LSM800 (Zeiss, Oberkochen, Alemania) utilizando un objetivo 20x con una apertura numérica 0,8. En todos los casos se mantuvieron los mismos parámetros de captura de imagen en todas las condiciones dentro de los diferentes experimentos.

Para ambos tejidos, el análisis de las imágenes fue realizado con el programa informático *ImageJ/Fiji* (*National Institute of Health*, Bethesda, Maryland, EE.UU.). En concreto, el número de células APC+ y Olig2+ fue cuantificado con la herramienta *Cell Counter*, y normalizado respecto al área evaluada en cada caso. En cuanto al análisis de la expresión de MBP, se cuantificó la intensidad de la señal fluorescente y el área ocupada por el marcaje ajustando el *Threshold* para cada experimento.

## **2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los resultados se presentan como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM, *standard error of the mean*) y en cada análisis se indica el número de animales y de secciones empleado en cada experimento. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático GraphPad Prism versión 6 (San Diego, California, EE.UU.). Para llevar a cabo comparaciones entre el control y los dos tratamientos, se hizo uso de la prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA, *analysis of variance*), asumiendo una distribución Gaussiana. Para los casos en los que se debían evaluar los cambios entre el control y uno de los tratamientos, se utilizó la prueba *t* de Student, asumiendo una distribución Gaussiana y una varianza igual. Los cambios fueron considerados significativos cuando  $p < 0,05$ .

## **3. RESULTADOS**

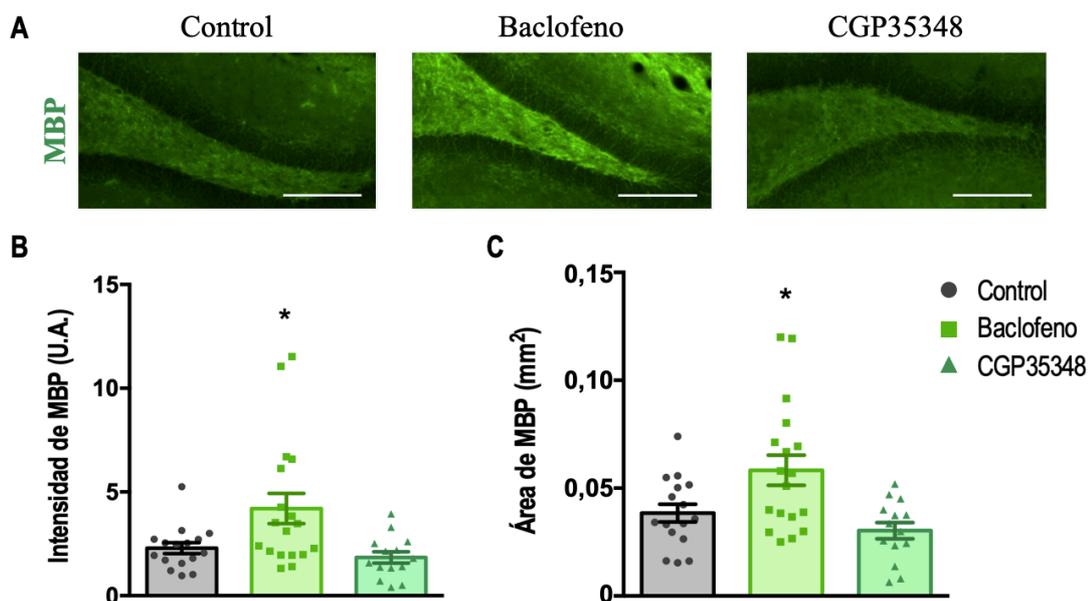
### **3.1. LA ACTIVACIÓN FARMACOLÓGICA DE GABA<sub>B</sub>R CON BACLOFENO ESTIMULA LA MIELINIZACIÓN *IN VIVO* DURANTE EL DESARROLLO**

Con el objetivo de determinar el papel de GABA<sub>B</sub>R en el proceso de mielinización durante el desarrollo de ratas, se evaluó el impacto de la activación/inhibición del receptor *in vivo* sobre el grado de mielinización en áreas de gran relevancia en el sistema nervioso central: giro dentado hipocampal, estriado y nervio óptico. Para ello, los animales fueron tratados diariamente con baclofeno o CGP35348, desde P6 hasta P21. El análisis histológico se centró en etapas avanzadas de la mielinización (P34-P42), debido a que estudios previos en etapas más tempranas (P12), coincidentes con el inicio de la mielinización, mostraron niveles de MBP tan escasos que no permitieron su correcto análisis cuantitativo.

Para monitorizar los cambios en la mielinización, se realizaron análisis inmunofluorescentes donde se emplearon anticuerpos primarios anti-MBP, una proteína estructural de la mielina. De esta forma, un aumento en la cantidad de mielina se traduce en un aumento en la expresión de MBP y en la señal fluorescente obtenida.

### 3.1.1. El tratamiento con baclofeno incrementa la mielinización en el giro dentado hipocampal durante el desarrollo

En primer lugar, se estudió el impacto de la modulación farmacológica de GABA<sub>B</sub>R sobre la formación de mielina en el hipocampo, concretamente, en el giro dentado, una zona relacionada con el aprendizaje y la memoria en la que la formación de mielina por parte de OLs maduros es de elevada importancia (Abrahám *et al.*, 2010). Para ello, se seleccionaron secciones posteriores del cerebro en las que fuese visible el giro dentado y se llevó a cabo la tinción inmunofluorescente anti-MBP (Figura 2A).



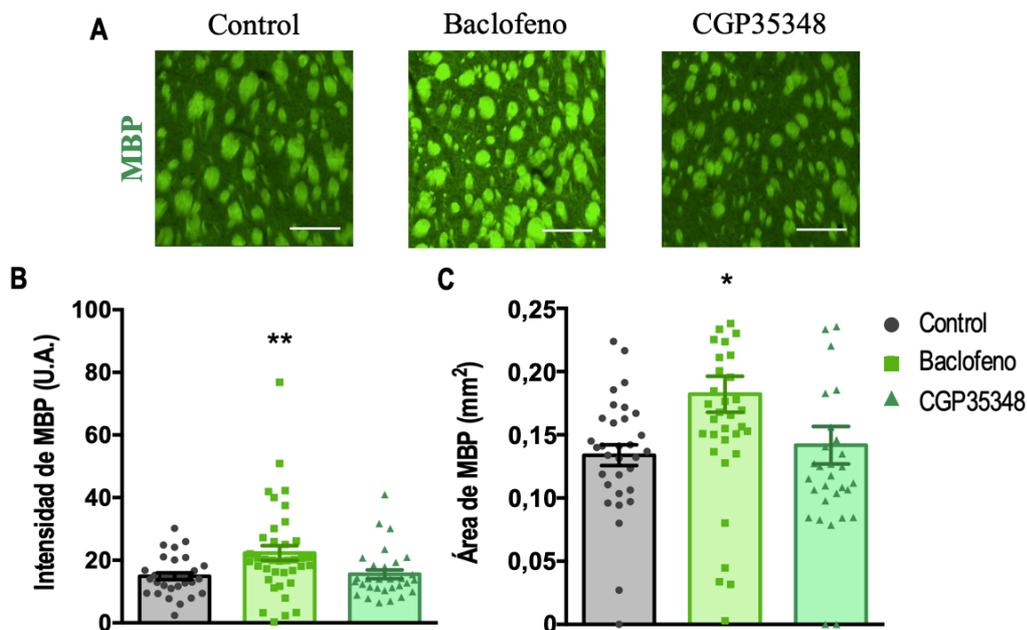
**Figura 2. Aumento de la mielinización en el giro dentado hipocampal de ratas P32-P42 tras la activación de GABA<sub>B</sub>R con baclofeno durante el desarrollo.** (A) Secciones coronales representativas del giro dentado de ratas tratadas con vehículo (control), baclofeno o CGP35348 desde P6 a P21, y analizadas a P34-P42. Las secciones muestran marcaje con anticuerpo de ratón anti-MBP (verde). Barra de escala: 200  $\mu$ m. (B) Cuantificación de la intensidad de la señal de MBP obtenida en los tejidos de los animales sometidos a los distintos tratamientos, indicada en unidades arbitrarias (U.A.). (C) Cuantificación del área abarcada por MBP (en mm<sup>2</sup>) en los distintos tratamientos. Los datos muestran la media  $\pm$  SEM de los valores obtenidos de, al menos, cuatro animales por situación experimental y dos secciones por animal. \* $p < 0,05$  con respecto al control.

En la **Figura 2B** se puede observar un incremento significativo en los niveles de intensidad de la señal de MBP en el giro dentado de las ratas tratadas con el agonista de GABA<sub>B</sub>R baclofeno ( $4,201 \pm 0,726$  U.A.) en relación a los controles ( $2,290 \pm 0,261$  U.A.), mientras que en las tratadas con el antagonista CGP35348 no se producen cambios significativos ( $1,845 \pm 0,274$  U.A.). De la misma forma, en la **Figura 2C** se aprecia que en el giro dentado de las ratas tratadas con baclofeno se da un incremento significativo en el área ocupada por MBP ( $0,058 \pm 0,007$  mm<sup>2</sup>) con respecto al control ( $0,038 \pm 0,004$  mm<sup>2</sup>). Como en el caso anterior, el tratamiento con CGP35348 no provoca diferencias significativas ( $0,030 \pm 0,004$  mm<sup>2</sup>). Estos resultados indican que la estimulación de GABA<sub>B</sub>R *in vivo* con baclofeno, y no su bloqueo con CGP35348, estimula la expresión de MBP y, por ende, la mielinización, en el giro dentado hipocámpal en etapas avanzadas del desarrollo de ratas.

### **3.1.2. La administración de baclofeno estimula la mielinización en el estriado durante el desarrollo**

A continuación, se analizó el efecto de los fármacos baclofeno y CGP35348 en el estriado, una de las principales áreas de sustancia blanca en el cerebro, caracterizada por presentar una elevada concentración de axones y, por ende, de mielina (Kim y Chuang, 2014). Con este objetivo, se seleccionaron secciones cerebrales de zonas más anteriores del cerebro, donde el estriado fuese visible. Las secciones correspondientes a los diferentes animales fueron tratadas para la tinción inmunofluorescente frente a la proteína MBP (**Figura 3A**).

La cuantificación de la intensidad de la señal de MBP representada en la **Figura 3B** muestra un incremento significativo en los animales tratados con baclofeno ( $22,300 \pm 2,354$  U.A.) en comparación a los animales control ( $14,890 \pm 1,104$  U.A.). El tratamiento con CGP35348 no provoca cambios en dicha intensidad ( $15,520 \pm 1,416$  U.A.). En la misma línea, como se recoge en la **Figura 3C**, la administración de baclofeno causa un incremento en el área abarcada por MBP ( $0,182 \pm 0,014$  mm<sup>2</sup>) respecto al control ( $0,134 \pm 0,008$  mm<sup>2</sup>), mientras que GCP35348 no produce un cambio significativo en este parámetro ( $0,142 \pm 0,015$  mm<sup>2</sup>). Estos resultados señalan que la activación farmacológica de GABA<sub>B</sub>R con baclofeno *in vivo* estimula la mielinización de los axones del estriado en etapas avanzadas del desarrollo de ratas.



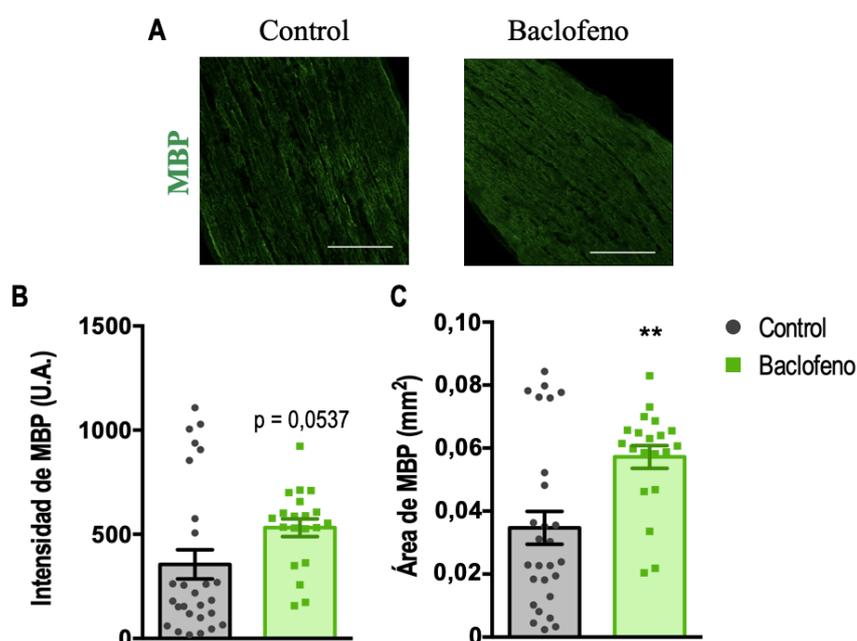
**Figura 3. Incremento en la mielinización en el estriado de ratas P34-P42 tras la activación de GABA<sub>B</sub>R con baclofeno durante el desarrollo. (A)** Secciones coronales representativas del estriado de ratas tratadas con vehículo (control), baclofeno o CGP35348 desde P6 a P21, y analizadas a P34-P42. Las secciones muestran marcaje con anticuerpo de ratón anti-MBP (verde). Barra de escala: 200  $\mu$ m. **(B)** Cuantificación de la intensidad de la señal de MBP obtenida en los tejidos de los animales sometidos a los distintos tratamientos, indicada en unidades arbitrarias (U.A.). **(C)** Cuantificación del área abarcada por MBP ( $\text{mm}^2$ ) en los distintos tratamientos. Los datos muestran la media  $\pm$  SEM de los valores obtenidos de, al menos, cuatro animales por situación experimental y cuatro secciones por animal. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  con respecto al control.

### 3.1.3. El baclofeno promueve el grado de mielinización del nervio óptico durante el desarrollo

Por último, dado que solo se encontraron cambios en el caso de los tratamientos con baclofeno, se decidió procesar también el nervio óptico de las ratas control y las tratadas con este agonista, debido a que el nervio óptico es una de las principales zonas de sustancia blanca en el SNC y es de una de las áreas más afectadas en patologías desmielinizantes. Las secciones de nervio óptico fueron analizadas para la detección de MBP y las imágenes resultantes se muestran en la **Figura 4A**.

El tratamiento con baclofeno produce un incremento no significativo en la intensidad de la señal de MBP ( $531,80 \pm 42,50$  U.A.), en relación a la situación control ( $355,50 \pm 69,71$  U.A.) en el nervio óptico de ratas (**Figura 4B**). En este caso, el  $p$ -valor obtenido en la comparación estadística es de  $p = 0,0537$ , lo que indica que, pese a no ser significativo, el resultado muestra una clara tendencia hacia un aumento en la

intensidad de la señal MBP en el nervio óptico por acción del baclofeno. Respecto al área ocupada por MBP, los datos muestran un incremento significativo en los nervios ópticos de ratas tratadas con baclofeno ( $0,057 \pm 0,004 \text{ mm}^2$ ) respecto a la situación control ( $0,035 \pm 0,005 \text{ mm}^2$ ) (**Figura 4C**). Estos resultados indican que el tratamiento *in vivo* con baclofeno durante el desarrollo estimula la mielinización en el nervio óptico de las ratas.



**Figura 4. Aumento en la expresión de MBP en el nervio óptico de ratas P34-P42 tras la activación farmacológica de GABA<sub>B</sub>R con baclofeno durante el desarrollo. (A)** Secciones longitudinales representativas del nervio óptico de ratas tratadas con vehículo (control) o baclofeno desde P6 a P21, y analizadas a P34-P42. Las secciones muestran marcaje con anticuerpo de conejo anti-MBP (verde). Barra de escala: 100  $\mu\text{m}$ . **(B)** Cuantificación de la intensidad de la señal de MBP obtenida en los tejidos de los animales sometidos a los distintos tratamientos, indicada en unidades arbitrarias (U.A.). **(C)** Cuantificación del área abarcada por MBP ( $\text{mm}^2$ ) en los distintos tratamientos. Los datos muestran la media  $\pm$  SEM de los valores obtenidos de, al menos, tres animales por situación experimental y nueve imágenes por animal. \*\* $p < 0,01$  con respecto al control.

### 3.2. LA MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE GABA<sub>B</sub>R NO ESTIMULA LA DIFERENCIACIÓN DE LOS OLs *IN VIVO* EN ETAPAS AVANZADAS DEL DESARROLLO

Una vez comprobado que la activación de GABA<sub>B</sub>R estimula la mielinización *in vivo*, se quiso verificar si esta mielinización viene dada por un aumento en el número de OLs diferenciados presentes en las diferentes regiones. Debido a que la estructura

particular del estriado hace que el número de OLs no sea lo suficientemente elevado para su análisis cuantitativo, estos estudios de diferenciación oligodendroglial se centraron en las regiones del giro dentado hipocampal y nervio óptico.

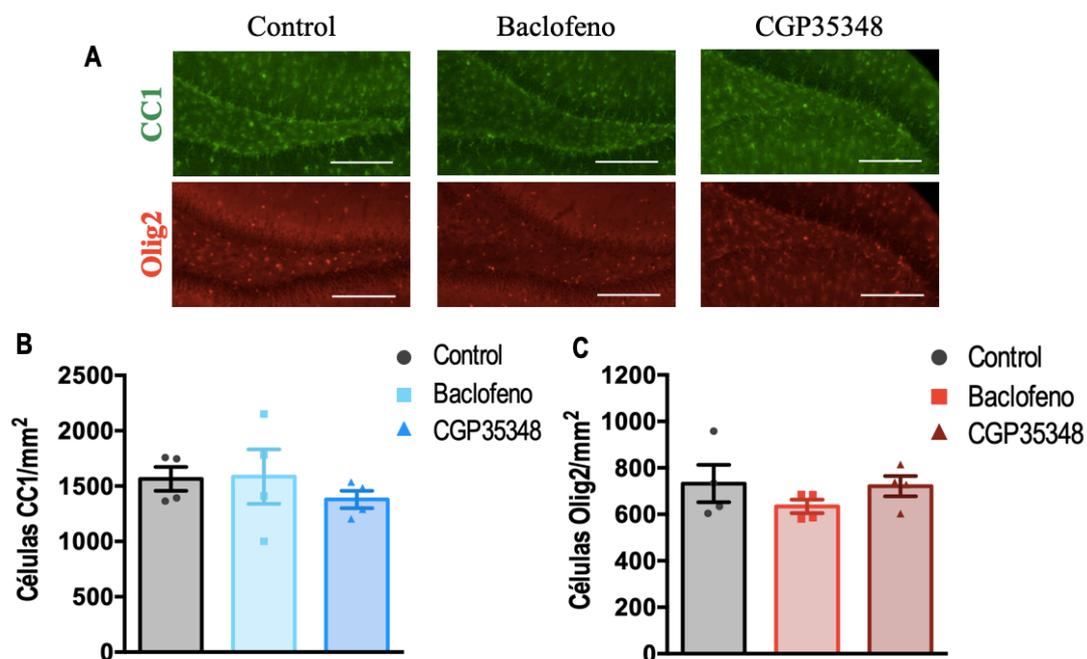
En este caso, el análisis inmunohistoquímico se llevó a cabo con anticuerpos primarios anti-Olig2, un marcador de todos los estadios de la línea oligodendroglial, y anticuerpos primarios anti-APC (denominados CC1) para conocer la cantidad de OLs maduros diferenciados, que se pusieron de manifiesto con anticuerpos secundarios fluorescentes. Los datos se normalizaron respecto al área evaluada en cada caso. Los resultados mostrados a continuación se corresponden con los obtenidos de animales procesados a P34-P42, edad en la que se detectaron efectos inductores del baclofeno en la mielinización.

### **3.2.1. El tratamiento con baclofeno no incrementa la diferenciación de OLs en el giro dentado hipocampal en etapas avanzadas del desarrollo**

Para comenzar, se analizó el efecto de la modulación farmacológica de GABA<sub>B</sub>R en el giro dentado hipocampal. De la misma manera que en el análisis de la expresión de MBP, en este estudio se seleccionaron secciones posteriores del cerebro, donde fuese visible de manera clara la estructura completa del giro dentado y se llevaron a cabo las tinciones inmunofluorescentes ya explicadas anteriormente, frente a Olig2 y CC1 (**Figura 5A**).

En la **Figura 5B** se muestra cómo el giro dentado de las ratas tratadas con baclofeno no presenta un incremento significativo en el número de OLs maduros CC1+ ( $1.586,00 \pm 246,50$  células CC1/mm<sup>2</sup>), en comparación con el control ( $1.565,00 \pm 107,90$  células CC1/mm<sup>2</sup>). Del mismo modo, tampoco se observa un cambio significativo en el número de OLs maduros tras la administración de CGP35348 respecto al control ( $1.379,00 \pm 79,01$  células CC1/mm<sup>2</sup>). Por otra parte, no se ven indicios de ningún cambio significativo en el número de células de la población oligodendroglial Olig2+ en el giro dentado de las ratas tratadas con baclofeno ( $633,80 \pm 29,08$  células Olig2/mm<sup>2</sup>) ni en las tratadas con CGP35348 ( $721,10 \pm 43,71$  células Olig2/mm<sup>2</sup>) respecto a las tratadas con solución salina ( $732,50 \pm 80,11$  células Olig2/mm<sup>2</sup>) (**Figura 5C**). Estos resultados sugieren que la modulación farmacológica *in vivo* de GABA<sub>B</sub>R

no tiene impacto sobre la diferenciación oligodendroglial en el giro dentado hipocampal a la edad analizada, P34-P42.



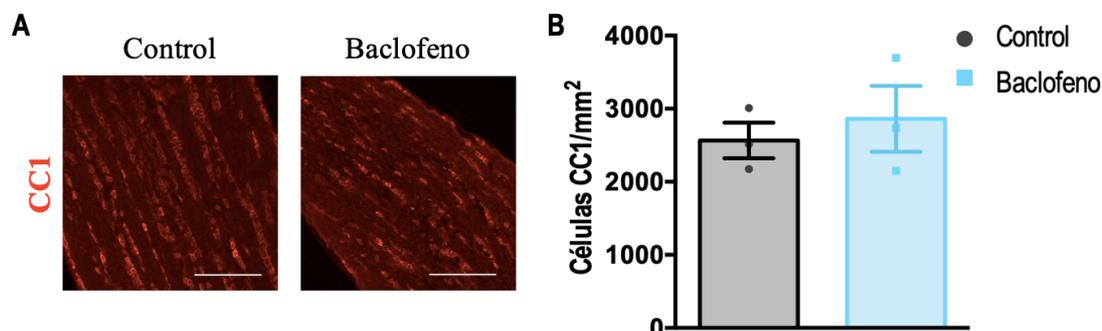
**Figura 5.** La modulación farmacológica de GABA<sub>B</sub>R durante el desarrollo no ocasiona cambios en la diferenciación de OLs en el giro dentado hipocampal de ratas P34-P42. **(A)** Secciones coronales representativas del giro dentado de ratas tratadas con vehículo (control), baclofeno o CGP35348 desde P6 a P21, y analizadas a P34-P42. Las secciones muestran marcaje con anticuerpo de ratón anti-CC1 (verde) y con anticuerpo de conejo anti-Olig2 (rojo). Barra de escala: 200  $\mu$ m. **(B)** Cuantificación de la densidad de células CC1+ (células CC1/ mm<sup>2</sup>) obtenida en los tejidos de los animales sometidos a los distintos tratamientos. **(C)** Cuantificación de la densidad de células Olig2+ (células Olig2/mm<sup>2</sup>) obtenida en los distintos tratamientos. Los datos muestran la media  $\pm$  SEM de los valores obtenidos de cuatro animales por situación experimental y al menos dos secciones por animal.

### 3.2.2. El baclofeno no modifica la diferenciación de OLs en nervio óptico en etapas avanzadas del desarrollo

En el caso del análisis del nervio óptico, solo se pudo evaluar la expresión del marcador de OLs maduros CC1 (**Figura 6A**), puesto que la situación excepcional provocada por la COVID-19, impidió hacer un análisis frente a Olig2.

De manera similar a lo observado en el giro dentado, la activación de GABA<sub>B</sub>R con baclofeno no produjo modificaciones significativas en el número de OLs CC1+ presentes en el nervio óptico ( $2.861,00 \pm 450,50$  células CC1/mm<sup>2</sup>), en relación a los

animales control ( $2.565,00 \pm 243,00$  células CC1/mm<sup>2</sup>) (**Figura 6B**). Así, estos resultados señalan que la activación farmacológica *in vivo* del GABA<sub>B</sub>R no estimula la diferenciación oligodendroglial en el nervio óptico a P34-P42.

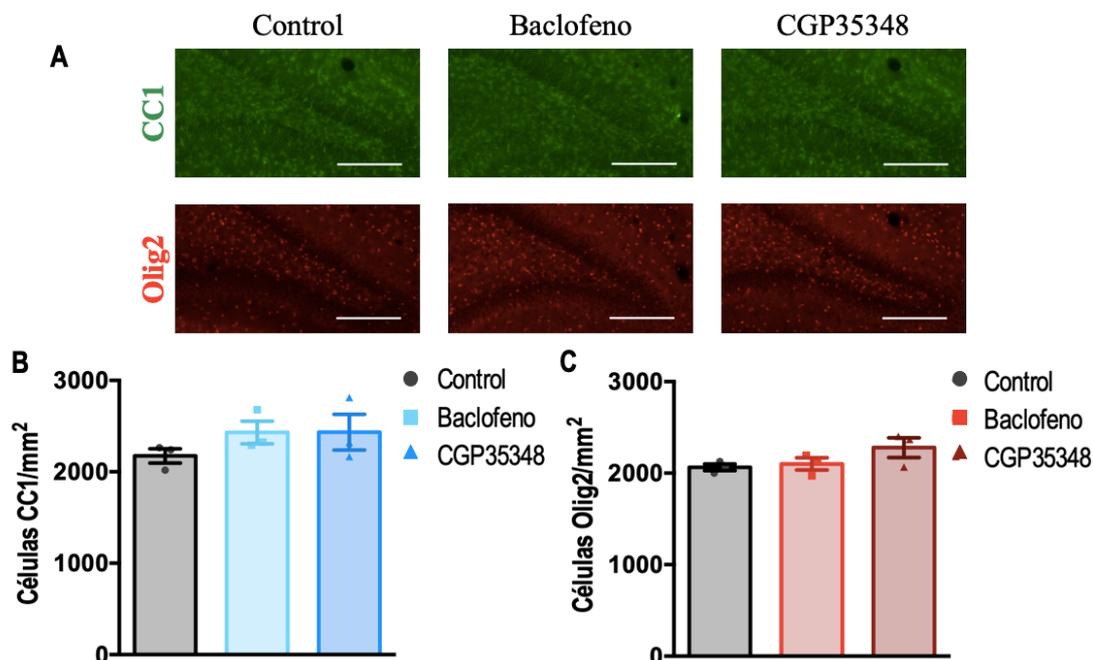


**Figura 6. La activación farmacológica de GABA<sub>B</sub>R durante el desarrollo no provoca modificaciones en la diferenciación de OLs en el nervio óptico de ratas P34-P42.** (A) Secciones longitudinales representativas del nervio óptico de ratas tratadas con vehículo (control) o desde P6 a P21, y analizadas a P34-P42. Las secciones muestran marcaje con anticuerpo de ratón anti-CC1 (rojo). Barra de escala: 100  $\mu$ m. (B) Cuantificación de la densidad de células CC1+ (células CC1/ mm<sup>2</sup>) obtenida en los tejidos de los animales sometidos a los distintos tratamientos. Los datos muestran la media  $\pm$  SEM de los valores obtenidos de, al menos, tres animales por tratamiento y nueve imágenes por animal.

### 3.3. LA MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE GABA<sub>B</sub>R NO ESTIMULA LA DIFERENCIACIÓN DE LOS OLs *IN VIVO* EN ETAPAS TEMPRANAS DEL DESARROLLO

Los resultados descritos hasta el momento indican que la activación y bloqueo de GABA<sub>B</sub>R no inducen cambios en el número de OLs diferenciados, analizado en el periodo P32-P42, edad en la que la mielinización en roedores ya se encuentra en un estadio avanzado. Teniendo en cuenta que el proceso de diferenciación oligodendroglial es previo a la formación de la mielina, planteamos analizar el grado de diferenciación de los OLs en edades más tempranas, P12, que corresponden con el pico de maduración de estas células en ratas. Por este motivo, analizamos la densidad de OLs maduros CC1+ en ratas tratadas con los fármacos desde P6 hasta su procesamiento a P12, para evaluar el efecto del baclofeno y del CGP35348 en esta ventana temporal del desarrollo. Para ello, se seleccionaron secciones cerebrales donde se pudiera identificar el giro dentado hipocampal y se desarrollaron tinciones

inmunofluorescentes para la detección de CC1 (marcado en verde) y Olig2 (marcado en rojo) (Figura 7A).



**Figura 7.** No se producen cambios significativos en la diferenciación de OLS en etapas tempranas del desarrollo (P12) del giro dentado hipocampal de ratas tras la modulación farmacológica de GABA<sub>B</sub>R durante el desarrollo. (A) Secciones coronales representativas del giro dentado de ratas tratadas con vehículo (control), baclofeno o CGP35348 desde P6 y analizadas a P12. Las secciones muestran marcaje con anticuerpo de ratón anti-CC1 (verde) y con anticuerpo de conejo anti-Olig2 (rojo). Barra de escala: 200  $\mu$ m. (B) Cuantificación de la densidad de células CC1+ (células CC1/ mm<sup>2</sup>) obtenida en los tejidos de los animales sometidos a los distintos tratamientos. (C) Cuantificación de la densidad de células Olig2+ (células Olig2/ mm<sup>2</sup>) obtenida en los distintos tratamientos. Los datos muestran la media  $\pm$  SEM de los valores obtenidos de, al menos, tres animales por situación experimental y tres secciones por animal.

En las Figuras 7B y 7C se puede observar que ni el baclofeno ( $2.431,00 \pm 124,00$  células CC1/ mm<sup>2</sup>;  $2.101,00 \pm 67,13$  células Olig2/ mm<sup>2</sup>) ni el CGP35348 ( $2.433,00 \pm 195,30$  células CC1/ mm<sup>2</sup>;  $2.279,00 \pm 107,20$  células Olig2/ mm<sup>2</sup>) administrados *in vivo* durante el desarrollo de las ratas provocan cambios significativos en la concentración de células CC1+ o Olig2+ con respecto a la situación control ( $2.174,00 \pm 77,76$  células CC1/ mm<sup>2</sup>;  $2.064,00 \pm 36,52$  células Olig2/ mm<sup>2</sup>). Estos resultados sugieren que la modulación farmacológica *in vivo* de GABA<sub>B</sub>R no estimula la diferenciación oligodendroglial en el giro dentado hipocampal en etapas tempranas de desarrollo, previas a los picos activos de mielinización.

## 4. DISCUSIÓN

El objetivo general de este Trabajo de Fin de Grado ha sido determinar el nivel de contribución del receptor GABA<sub>B</sub>R en los procesos de diferenciación oligodendroglial y mielinización en condiciones fisiológicas del desarrollo de ratas.

En primer lugar, se analizó el impacto de la administración *in vivo* de baclofeno y CGP35348 sobre el grado de mielinización de giro dentado hipocampal, estriado y nervio óptico durante etapas avanzadas de este proceso, a una edad de P34-P42. Los resultados obtenidos revelan que la activación de GABA<sub>B</sub>R con baclofeno estimula notablemente la mielinización en estas áreas. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Serrano-Regal *et al.* (2019), los cuales indican que el tratamiento de cultivos de OPCs de rata purificados con baclofeno estimula la expresión de MBP, sugiriendo un aumento en la mielinización. Por el contrario, los estudios de Hamilton *et al.* (2016) y Arellano *et al.* (2016) señalan que la activación de GABA<sub>A</sub>R *in vitro* modula negativamente la mielinización. Esto parece indicar que ambos tipos de receptores juegan un papel relevante durante la mielinización, pero su activación parece tener efectos opuestos sobre el proceso de formación de mielina en OLs. En cuanto a los datos obtenidos con CGP35348, el bloqueo de GABA<sub>B</sub>R no parece llevar a cambios en la expresión de MBP en el desarrollo, al contrario de lo observado *in vitro* por Serrano-Regal *et al.* (2019), siendo estas diferencias posiblemente debidas a que en el contexto *in vitro* no están presentes todos los tipos celulares que interactúan con los OLs y que, por tanto, influyen en su funcionalidad.

Por otro lado, la mielinización es un mecanismo de gran relevancia en regiones del hipocampo como el giro dentado, ya que la formación de conexiones neuronales es crucial para los procesos de aprendizaje y memoria (Abrahám *et al.*, 2010). Además, esta área se ve atrofiada en pacientes con EM (Rocca *et al.*, 2016). Por todo ello, el incremento en la mielinización mediado por baclofeno sugiere un papel prometedor de este fármaco en posibles tratamientos remielinizantes frente a la EM. La mielinización es también crítica en las regiones de sustancia blanca, áreas que se ven principalmente afectadas en procesos de desmielinización (Dendrou, 2015). Por tanto, el aumento de la expresión de MBP en estriado y nervio óptico también señala una vía interesante de remielinización. De hecho, el baclofeno es un fármaco utilizado

actualmente en clínica dentro del tratamiento de la EM, aunque su uso está enfocado como antiespasmódico al explotar su capacidad de activar la neurotransmisión inhibitoria a través de GABA<sub>B</sub>R en el SNC (Chisari *et al.*, 2020). No obstante, su papel en la mielinización o remielinización no se ha evaluado hasta la fecha, y los resultados de este trabajo señalan que podría tener un efecto notable en estos procesos.

Tras comprobar que la activación de GABA<sub>B</sub>R estimula la mielinización durante el desarrollo, se quiso determinar si dicho aumento en la mielinización era debido a un efecto inductor del baclofeno sobre el número de OLs diferenciados. Primero, se analizó el efecto en los tejidos obtenidos de animales procesados a P34-P42, para poder relacionar los resultados con los obtenidos en el análisis de la mielinización. Cabe destacar que en las **Figuras 5 y 7**, el número de OLs maduros CC1+ parece ser mayor que el número de células oligodendrogiales totales Olig2+, lo cual parece, en un principio, contradictorio. Esta diferencia, se debe a que la tinción con cada anticuerpo presenta distintas sensibilidades y especificidades, por lo que es posible que no se estén marcando todas las células que expresan el factor Olig2. En cualquier caso, estas diferencias entre marcajes no impiden realizar una comparativa coherente entre cada tratamiento. Los resultados obtenidos en este estudio de la diferenciación de OLs sugieren que la modulación farmacológica *in vivo* del GABA<sub>B</sub>R no parece alterar el número de OLs maduros en las regiones de giro dentado y nervio óptico analizado en una etapa avanzada del desarrollo.

Dado que el pico de diferenciación de los OLs es previo a la mielinización y se produce durante las primeras semanas de desarrollo, se quisieron contrastar los resultados obtenidos a P34-P42 con posibles cambios en la maduración de OLs a edades más tempranas, P12. Al igual que el estudio a etapas más avanzadas, en este caso, los resultados indican que no se producen cambios significativos en la diferenciación de los OLs al activar/bloquear GABA<sub>B</sub>R. En conjunto, el estudio del estado de maduración de los OLs sugiere que el baclofeno no tiene un impacto notable sobre el proceso de diferenciación oligodendrogial en etapas tempranas o avanzadas de desarrollo. Estos datos contrastan con los datos obtenidos por Serrano-Regal *et al.* (2019) *in vitro*, ya que en estos se observa que la activación de GABA<sub>B</sub>R con baclofeno incide positivamente en el número de OLs maduros. Estas diferencias, además de las atribuibles a las diferencias entre un contexto *in vitro* e *in vivo*, pueden deberse a un

efecto del baclofeno dependiente de región, dado que existen poblaciones de OPCs heterogéneas en función de su localización dentro del SNC y cada zona podría representar un entorno con diferente permisividad para la diferenciación (Marisca *et al.*, 2020). De esta forma, dependiendo de la región del SNC en la que se encuentren, el efecto de la modulación de GABA<sub>B</sub>R podría ser distinta, pudiendo también afectar de forma distinta al proceso de mielinización.

Como se ha indicado, los resultados obtenidos muestran que la estimulación de la mielinización producida por la activación de GABA<sub>B</sub>R mediante baclofeno no está relacionada con un aumento en el número de OLs maduros. De hecho, pese a la estrecha relación entre los procesos de mielinización y diferenciación oligodendroglial, cambios en uno de los procesos no implican necesariamente cambios en el otro. Por ejemplo, existen OLs satélite que pueden estar totalmente diferenciados y no ser mielinizantes (Simons y Nave, 2015).

Un requerimiento clave para que se produzca la mielinización es que se dé una unión estable entre los procesos de los OLs y los axones de las neuronas. Por una parte, es posible que en las regiones analizadas el baclofeno estimule la expresión de moléculas guía de mielina necesarias para la unión estable entre OLs y axones. También podría producir un silenciamiento de la expresión de proteínas inhibitoras de moléculas guía de mielina. De la misma forma, para que los OLs puedan envolver la mielina alrededor de los axones se requiere una acción dinámica por parte de la mielina, la cual está regulada por los factores de despolimeración y separación de la actina (como cofilina1). Así, el baclofeno podría incidir sobre la expresión de estos factores, ejerciendo un efecto estimulador sobre la acción de la mielina y aumentando la tasa de mielinización (Snaidero y Simons, 2017).

Como futuras perspectivas, es necesario ampliar los estudios para poder comprender los mecanismos subyacentes a la estimulación de la mielinización inducida por la activación de GABA<sub>B</sub>R mediante baclofeno. Primero, en el estudio centrado en la diferenciación de OLs en nervio óptico, solo se pudo determinar la expresión del marcador de OLs maduros CC1 debido a la situación excepcional causada por la COVID-19, por lo que, pese a que es posible encontrar cambios en el número de OLs diferenciados únicamente evaluando la expresión de CC1, sería interesante evaluar la

población de células Olig2+ para normalizar los resultados. También sería interesante analizar el efecto de la activación del GABA<sub>B</sub>R con baclofeno sobre el grado de diferenciación de OLs en nervio óptico a P12, al igual que se hizo en el giro dentado hipocampal. En segundo lugar, para corroborar los resultados obtenidos en este trabajo, sería adecuado ampliar el análisis a diferentes zonas del SNC de elevada relevancia, como la corteza cerebral el cuerpo caloso. Como tercera línea, para determinar más en detalle si la activación de GABA<sub>B</sub>R con baclofeno incide sobre la expresión de moléculas guía de mielina o factores de despolimeración y separación de la actina, se podrían realizar análisis moleculares mediante *Western blot* donde se evaluase la expresión diferencial de estas proteínas. Finalmente, y dado el prometedor efecto del baclofeno sobre la mielinización durante el desarrollo, también podría ser de gran relevancia el estudio de la administración de baclofeno tras la inducción de lesiones desmielinizantes, para evaluar su impacto sobre la remielinización en un contexto patológico.

## 5. CONCLUSIONES

Tras estudiar detalladamente el efecto de los fármacos moduladores de GABA<sub>B</sub>R, baclofeno y CGP35348, en la diferenciación oligodendroglial y la mielinización en giro dentado hipocampal, estriado y nervio óptico, se han obtenido siguientes conclusiones:

- La activación *in vivo* de GABA<sub>B</sub>R con su agonista baclofeno estimula la mielinización en giro dentado hipocampal, estriado y nervio óptico en ratas, mientras que su bloqueo con CGP35348 no muestra efectos significativos.
- La modulación farmacológica de GABA<sub>B</sub>R no tiene un efecto significativo sobre la diferenciación oligodendroglial en nervio óptico y giro dentado hipocampal en etapas avanzadas del desarrollo en ratas, P34-P42.
- La modulación farmacológica de GABA<sub>B</sub>R no tiene un efecto significativo sobre la diferenciación oligodendroglial en giro dentado hipocampal analizado a P12, en estadios tempranos del desarrollo en ratas.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrahám, H., Vincze, A., Jewgenow, I., Veszprémi, B., Kravják, A., Gömöri, E., Seress, L. 2010. Myelination in the human hippocampal formation from midgestation to adulthood. *Int. J. Dev. Neurosci.* 28(5): 401-410.

Angulo, M.C., Le Meur, K., Kozlov, A.S., Charpak, S., Audinat, E. 2008. GABA, a forgotten gliotransmitter. *Prog. Neurobiol.* 86(3): 297-303.

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(1): 63-74.

Barateiro, A., Fernandes, A. 2014. Temporal oligodendrocyte lineage progression: *In vitro* models of proliferation, differentiation and myelination. *Biochim. Biophys. Acta.* 1843(9): 1917-1929.

Chisari, C.G., Sgarlata, E., Arena, S., D'Amico, E., Toscano, S., Patti, F. 2020. An update in the pharmacological management of pain in patients with multiple sclerosis. *Expert. Opin. Pharmacother.* DOI: 10.1080/14656566.2020.1757649.

Dendrou, C.A., Fugger, L., Friese, M.A. 2015. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* 15(9): 545-558.

Dobson, R., Giovannoni, G. 2019. Multiple sclerosis-A review. *Eur. J. Neurol.* 26(1): 27-40.

Frangai, A., Fan, Q.R. 2018. Structural biology of GABA<sub>B</sub> receptor. *Neuropharmacology.* 136(Pt A):68-79.

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

Kalakh, S., Mouihate, A. 2019. Enhanced remyelination during late pregnancy: involvement of the GABAergic system. *Sci. Rep.* 9(1): 7728.

- Kim, H.J., Chuang, D.-M. 2014. HDAC inhibitors mitigate ischemia-induced oligodendrocyte damage: potential roles of oligodendrogenesis, VEGF, and anti-inflammation. *Am. J. Transl. Res.* 6(3): 206-223.
- Marisca, R., Hoche, T., Agirre, E., Hoodless, L.J., Barkey, W., Auer, F., Castelo-Branco, G., Czopka, T. 2020. Functionally distinct subgroups of oligodendrocyte precursor cells integrate neural activity and execute myelin formation. *Nat. Neurosci.* 23(3):363-374.
- Rocca, M.A., Morelli, M.E., Amato, M.P., Moiola, L., Ghezzi, A., Veggiotti, P., Capra, R., Pagani, E., Portaccio, E., Fiorino, A., Pippolo, L., Pera, M.C, Comi, G., Falini, A., Filippi, M. 2016. Regional hippocampal involvement and cognitive impairment in pediatric multiple sclerosis. *Mult. Scler. J.* 22(5): 628-640.
- Serrano-Regal, M.P., Luengas-Escuza, I., Bayón-Cordero, L., Ibarra-Aizpurua, N., Alberdi, E., Pérez-Samartín, A., Matute, C., Sánchez-Gómez, M.V. 2019. Oligodendrocyte differentiation and myelination is potentiated via GABA<sub>B</sub> receptor activation. *Neuroscience*. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2019.07.014
- Simons, M., Nave, K.-A. 2015. Oligodendrocytes: Myelination and axonal support. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 8(1).
- Snaidero, N., Simons, M. 2017. The logistics of myelin biogenesis in the central nervous system. *Glia.* 65(7): 1021-1031.
- Tauheed, A.M., Ayo, J.O., Kawu, M.U. 2016. Regulation of oligodendrocyte differentiation: Insights and approaches for the management of neurodegenerative disease. *Pathophysiology.* 23(3): 203-210.
- Tomassy, G.S., Dershowitz, L.B., Arlotta, P. 2016. Diversity matters: A revised guide to myelination. *Trends Cell Biol.* 26(2): 135-147.
- 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(5): 674-682.