



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Desarrollo de un modelo de daño de la sustancia blanca inducido por exposición a hipoxia en el SNC en la etapa postnatal.

Tesis

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Lic. Fidel Zhamyr Vélez Uriza

TUTORES

Dr. Rogelio Arellano Ostoa
Dr. Abraham J. Cisneros Mejorado
Instituto de Neurobiología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Penélope Aguilera Hernández
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
Dr. Ataúlfo Martínez Torres
Instituto de Neurobiología, UNAM

Juriquilla, Querétaro, Noviembre de 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN

Dra. Maricela Luna Muñoz	Presidente
Dr. Abraham J. Cisneros Mejorado	Secretario
Dra. Laura Cristina Berumen Segura	Vocal
Dra. Penélope Aguilera Hernández	Suplente
Dr. Srael Alcauter Solórzano	Suplente

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurofisiología Celular y Endocrinología Molecular, pertenecientes al Departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Rogelio Arellano Ostoia y el Dr. Abraham J. Cisneros Mejorado. Becario CONACyT No. 479665. Además, contó con los financiamientos PAPIIT-DGAPA-UNAM IN203519 y CONACYT 252121 a RA.

RESUMEN

La mielina es una estructura lipoprotéica producida por células gliales llamadas oligodendrocitos (OLs). Fallas en el proceso de mielinización son causantes de diferentes patologías neurológicas. Un ejemplo de esto y con alta incidencia en México, es el desorden llamado lesión difusa de sustancia blanca (LDSB), que se presenta en neonatos que sufren lesiones en la sustancia blanca e hipomielinización debido a un episodio hipóxico. En este trabajo, buscamos desarrollar un modelo de daño en la sustancia blanca inducido por hipoxia en etapa postnatal. Usando ratones cd1, aplicamos dos métodos para cuantificar la presencia de mielina. Histológicamente fue usada la tinción Black Gold II (BGII), mientras que para analizar los cambios microestructurales aplicamos la imagenología por resonancia magnética (IRM). Se evaluaron parámetros derivados de la IRM, la fracción de anisotropía (FA) y las difusividades axial y radial. Además, se aplicó un análisis de la motricidad para conocer si ésta se ve alterada por la hipoxia. El tratamiento hipóxico se realizó en una cámara de gases donde los animales fueron expuestos a una atmósfera hipóxica (5% oxígeno), durante 6 horas cada 24 horas por 5 días, del día postnatal 3 al 7 (p3 a p7). La hipoxia indujo desmielinización a p7 (terminado el tratamiento hipóxico), reflejada en una disminución en la densidad óptica (DO) de las tinciones BGII. La desmielinización se mantuvo a p24, manifestada en el análisis de FA que disminuyó de manera global, principalmente en algunas estructuras como el cerebelo y la corteza cerebral. El análisis de las difusividades indicó que la disminución de FA a p24 se debió a la menor presencia de mielina en corteza cerebral y cerebelo, mientras que para el miembro olfativo se debió a daños axonales. A p33 se observó una recuperación en la mielinización, evidenciada con la DO y los parámetros derivados de IRM. El análisis de motricidad implementado en distintas edades (p14, p24 y p33), revelaron que existe una disminución en la velocidad en los animales hipóxicos, que se mantiene en edad p33. Es posible que a pesar de existir una remielinización o mielinización normal, al verse retrasado el proceso podría estar afectado el establecimiento de la circuitería involucrada en los mismos. El modelo de hipoxia propuesto tiene un efecto desmielinizante, que permitirá

evaluar la participación de la señalización GABAérgica del linaje oligodendroglial en el proceso de mielinización.

SUMMARY

Myelin is a lipoprotein structure produced by glial cells called oligodendrocytes (OLs). Failures in the myelination process are causes of different neurological pathologies. An example of this and with a high incidence in Mexico, is the disorder called diffuse white matter lesion (LDSB), which occurs in infants suffering from white matter lesions and hypomyelination due to a hypoxic episode. In this work, we seek to develop a model of white matter damage induced by hypoxia in the postnatal stage. Using cd1 mice, we applied two methods to quantify the presence of myelin. Histologically, Black Gold II (BGII) staining was used, while to analyze the microstructural changes we applied magnetic resonance imaging (MRI). Parameters derived from MRI, fractional anisotropy (FA) and axial and radial diffusivities were evaluated. In addition, an analysis of motor skills was applied to determine if it is altered by hypoxia. The hypoxic treatment was performed in a gas chamber where the animals were exposed to a hypoxic atmosphere (5% oxygen), for 6 hours every 24 hours for 5 days, from post natal day 3 to 7 (p3 to p7). The hypoxia induced demyelination at p7 (after the hypoxic treatment), reflected in a decrease in the optical density (OD) of the BGII stains. Demyelination remained at p24, manifested in the AF analysis that decreased overall, mainly in some structures such as the cerebellum and cerebral cortex. The diffusivities analysis indicated that the decrease in AF to p24 was due to the lower presence of myelin in the cerebral and cerebellar cortex, while for the olfactory limb it was due to axonal damage. A p33 showed a recovery in myelination, evidenced by the OD and the parameters derived from MRI. The motor analysis implemented at different ages (p14, p24 and p33), revealed that there is a decrease in speed in hypoxic animals, which remains at age p33. It is possible that despite the existence of normal remyelination or myelination, the process could be affected by the establishment of the circuitry involved in them. The proposed hypoxia model has a demyelinating effect, which will allow evaluating the participation of the GABAergic signaling of the oligodendroglial lineage in the myelination process.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la UNAM, máxima casa de estudios en México, por darme la oportunidad de continuar mi formación y crecimiento académico en una institución de excelencia.

Mi más sincero agradecimiento a mis asesores el Dr. Rogelio Arellano y el Dr. Abraham Cisneros por brindarme siempre su apoyo para llevar a cabo este trabajo sobre todo en los momentos más complicados del mismo. Este agradecimiento lo extiendo a la Dra. Edith Garay que si bien no fungió estrictamente como mi asesora, también estuvo siempre pendiente de mi formación y de mi persona.

A los miembros de mi comité tutor, el Dr. Ataúlfo Martínez por sus siempre pertinentes consejos y observaciones que me permitieron realizar un mejor trabajo. A la Dra. Penélope Aguilera a quien le agradezco por diversas razones pero principalmente por todas las atenciones que ha tenido conmigo, siempre en pro de mi progreso y bienestar.

También, a los miembros de mi jurado de examen. La Dra. Maricela Luna, el Dr. Sarael Alcauter y a la Dra. Laura Berumen por aceptar el ayudarme a pulir este escrito y tener la mejor disposición para resolver con presteza mis dudas y solicitudes.

Además, a la Dra. Alejandra Castilla, al Dr. Juan Ortíz, a Nydia Hernández y a Felipe Ortiz por su apoyo técnico en distintas áreas que me permitieron realizar este proyecto.

A la M. en C. Leonor Casanova y a la Dra. Nuri Aranda por su valiosa asistencia en la unidad de enseñanza de nuestro instituto.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Marco, Cindy, Antonia, Juanpa y Pablito con quienes he tenido la dicha de compartir este camino y que me han apoyado y aconsejado tanto en lo académico como en lo personal.

A mi familia por apoyarme y estar conmigo siempre.

Por último pero más importante para mí, le doy gracias a Dios por poner a estas personas en vida, por darme la fuerza para salir adelante. Gracias a Él todo esto ha sido posible.

DEDICATORIAS

Este trabajo es para los pilares de mi vida, primero mis papás Dora y Carlos, sin ellos nada de esto sería posible, me han guiado a lo largo de mi vida. Corrigiéndome cuando ha sido necesario y brindándome su amor y su protección cada que lo he necesitado, algo que hasta el día de hoy siguen haciendo, especialmente mi mamá. A mis hermanos Dorita, Carlos y Dani por acompañarme a lo largo de mi vida, en las travesuras, en momentos tristes y momentos felices. A mis sobrinos Alex, Camila y Mateo, ellos han traído mucha luz y alegría a mi vida.

Para mis amigos Víctor, Jaime, Kokis, Gabi, Ruth, Julio, Antonia, Cindy, Elías, Edder, Ricardo, Héctor y mucho más que harían una lista extensa lo cual gratamente digo, todos ellos estando en unos u otros momentos pero que me han cuidado y apoyado desde que tengo la fortuna de ser su amigo. Y en especial a Marco, quien estuvo conmigo incluso en el momento más difícil de mi vida, que me ha apoyado, escuchado y aconsejado. Me extendió su mano para levantarme, me ha ayudado a crecer como persona, definitivamente este trayecto ha sido mejor con su presencia.

A Vero quien durante prácticamente toda la maestría me ha escuchado y guiado para lograr entender y así superar y salir delante de tantos obstáculos que han aparecido.

A Abraham quien además de ser mi asesor, felizmente puedo decir que es mi amigo, ha extendido su apoyo más allá de lo cotidiano, escuchándome, dándome consejos y anteponiendo ante todo, mi bienestar. Han sido muchas las cosas que he aprendido de él tanto en lo académico como en lo personal. Sin lugar a dudas, esta etapa la he logrado superar gracias a su apoyo.

Por último a todos ustedes que sin importar que un nombre no figure aquí, de una u otra manera me han ayudado a cumplir este ciclo.

Esto es para ti, que iniciaste este camino a mi lado, me sostuviste a cada paso, que me alentaste a seguir y lograr mis metas, mis sueños. Hoy desde otro lugar, a la distancia, sé que sigues alentándome y que una parte de ti siempre será mía y estará a mi lado.



ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

SNC: Sistema nervioso central.

OLs: Oligodendrocitos.

OPCs: Células precursoras de oligodendrocitos (siglas en inglés oligodendrocyte precursor cells).

nm: Nanómetros.

µm: Micrómetros.

mL: Mililitros.

cm: Centímetros.

ATP: Adenosina trifosfato.

GABA: Ácido γ-aminobutírico.

GABAR: Receptores a GABA.

GAD: Ácido-glutámico descarboxilasa.

GABA_AR: Receptores ionotrópicos a GABA.

GABA_BR: Receptores metabotrópicos a GABA.

β-CCB: Butil-β-carbolina-3-carboxilato.

LDSB: Lesión difusa de sustancia blanca.

LPV: Leucomalacia periventricular.

BGII: Black gold II.

PBS: Solución buffer fosfato salino.

RM: Resonancia magnética.

EPI: Echo-planar image.

DTI: Difussion tensor imaging.

ROI: Region of interest.

DO: Densidad óptica.

IO: Intensidad óptica.

cc: Cuerpo calloso.

cp: Caudoputamen.

MO: Miembro olfativo.

FA: Factor de anisotropía.

D_{Axial}: Difusión axial.

D_{Radial}: Difusión radial.

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

1. Procesos de mielinización durante el ciclo de vida humana.	2
2. Linaje oligodendroglial.	3
3. Estructura de una neurona con axón mielinizado.	4
4. Estructura del receptor ionotrópico a GABA.	6
5. Componentes de la leucomalacia periventricular.	9
6. Estrategia experimental.	12
7. Estrategia experimental para la inducción de la hipoxia.	13
8. Exploración de IRM.	15
9. Mapas de regiones de interés (ROI).	16
10. Estrategia experimental para análisis de motricidad.	16
11. Mielinización en hipoxia en ratones p7.	18
12. Mielinización en hipoxia en ratones p33.	20
13. DO normoxia vs hipoxia en edad p33.	21
14. DO de cuerpo calloso en edad p33.	22
15. DO de la corteza en edad p33.	22
16. Mapa de anisotropía de animales en etapa p24.	23
17. Índice de la fracción de anisotropía (FA) en p33.	24
18. Índice de la fracción de anisotropía (FA) en etapa p33.	25

19. Difusividades radial y axial en p24.	27
20. Difusividades radial y axial en p33.	28
21. Análisis de la motricidad con 1 sesión (6h/1d).	29
22. Análisis de la motricidad con 5 sesiones (6h/5d).	30

ECUACIONES

Página

1. Densidad óptica normalizada.	17
--	----

ÍNDICE

RESUMEN	I
SUMMARY	II
AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIAS	IV
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ECUACIONES	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. SISTEMA NERVIOSO	2
1.2. OLIGODENDROCITOS Y MIELINIZACIÓN	3
1.3. LESIÓN DIFUSA DE SUSTANCIA BLANCA (LDSB)	7
2. ANTECEDENTES	10
3. JUSTIFICACIÓN	10
4. HIPÓTESIS	11
5. OBJETIVO	11
5.1. OBJETIVOS PARTICULARES	11
6. MATERIALES Y MÉTODOS	11
6.1. Animales	12
6.2. Modelo de hipoxia	12
6.3. Preparación de tejido cerebral	13
6.4. Black Gold II	13
6.5. Resonancia magnética	14

6.6. Análisis de motricidad	16
6.7. Cuantificación de densidad óptica	17
6.8. Análisis estadístico	17
7. RESULTADOS	17
7.1. Efectos de la hipoxia en etapas postnatal y adulta medidas con BGII	17
7.2. Alteraciones en las métricas de RM en animales expuestos a hipoxia	22
7.3. La hipoxia promueve alteraciones en la motricidad	28
8. DISCUSIÓN	31
9. CONCLUSIÓN	35
10. LITERATURA CITADA	37

1. INTRODUCCIÓN

La mielinización de vertebrados ha sido un avance evolutivo esencial para las funciones cognitiva, motora, sensorial y de orden superior. En el sistema nervioso central (SNC), el proceso de la mielinización se ejecuta por oligodendrocitos (OLs), que envuelven su membrana y citoplasma alrededor de los axones para generar una vaina membranosa de varias capas que corre a lo largo de la mayor parte de la longitud del axón, y es interrumpido periódicamente por nodos no mielinizados llamados nodos de Ranvier. Esta compleja arquitectura, orquestada por la comunicación entre OLs y neuronas, permite la rápida conducción en forma saltatoria de los potenciales de acción, que viaja óptimamente sobre las largas distancias que caracterizan a sistemas nerviosos complejos (Baumann and Pham-Dinh 2001).

El proceso de mielinización se inicia en la etapa embrionaria tardía, aunque en gran medida se produce durante el período posnatal, en donde sirve no solo para mantener las funciones de los circuitos neuronales establecidos (Fig. 1), sino también para generar o reforzar nuevas conexiones formadas durante los fenómenos plásticos, como la memoria y el aprendizaje (Zatorre, Fields, and Johansen-Berg 2013). Notablemente, la mielinización continúa en el cerebro adulto y está dinámicamente regulada por diferentes estímulos, incluida la actividad neuronal y balance metabólico (McTigue and Tripathi 2008).

En resumen, el proceso de mielinización es un fenómeno fundamental del SNC, en donde el funcionamiento neuronal requiere de una interacción estrecha de los axones con la glía mielinizante. De manera importante, las señales y las moléculas involucradas que determinan las capacidades mielinizantes de los OLs han sido parcialmente definidas, con lo cual, la investigación en el conocimiento de los mecanismos subyacentes en este proceso es de fundamental importancia porque permitirá, además de la generación de nuevo conocimiento, el detalle más específico de la participación de agentes o vías moleculares, como la señalización GABAérgica, y la formulación o posible diseño de estrategias terapéuticas en la resolución de patologías precisamente relacionadas con patrones de alteración en la mielina.

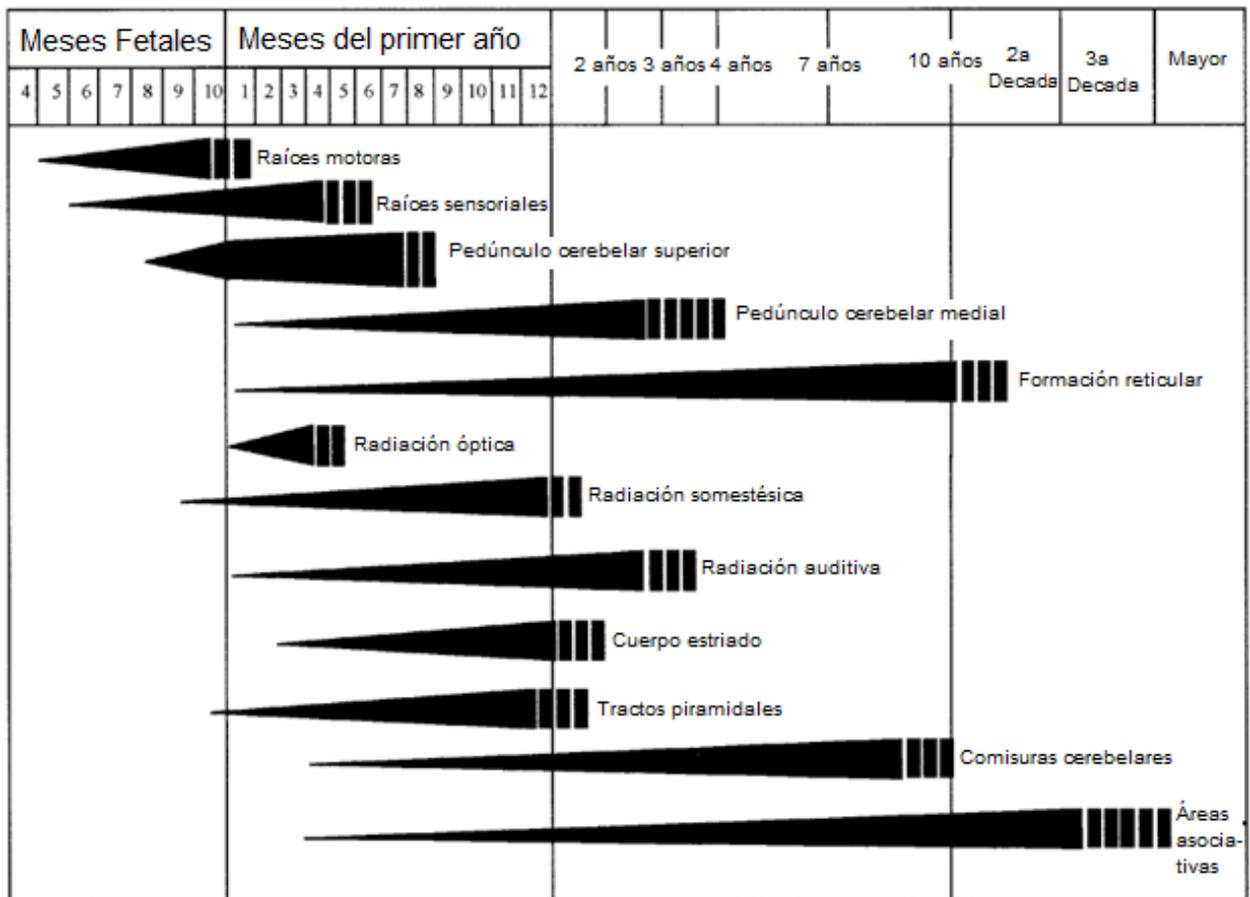


Figura 1. Procesos de mielinización durante el ciclo de vida humana. Se representan distintos procesos de mielinización de algunas estructuras a diferentes etapas del desarrollo. La mielinización comienza en la etapa fetal y continúa durante hasta la vejez, teniendo muchos de estos procesos en el primer año de vida. Tomado de Baumann and Pham-Dinh (2001).

1.1 Sistema Nervioso

El sistema nervioso está constituido por dos tipos celulares; las neuronas, que transmiten los impulsos nerviosos y las células de soporte: las células gliales o simplemente glía (Brodal 2016). A su vez, la glía se subdivide en diferentes tipos celulares cada una con sus funciones características: la oligodendroglía, la microglía, la astrogía y la ependimoglia en el SNC (Araque and Navarrete 2010). Mientras que para el sistema nervioso periférico el principal tipo de glía son las llamadas células de Schwann, que mantienen la homeostasis neuronal (Zhang et al. 2019)

1.2 Oligodendrocitos y mielinización

Los oligodendrocitos son células post mitóticas que se desarrollan a partir de células precursoras de oligodendrocitos (OPCs) (Fig. 2). Los OPCs migran desde el neuroepitelio de la zona ventricular/subventricular a la sustancia blanca en desarrollo (Simons and Nave 2016). Durante el desarrollo embrionario los OLs son originados a partir de células madre del ectodermo neuronal periventricular. Durante las etapas tempranas del desarrollo los OPCs aparecen en oleadas a partir de la región ventral del tubo neural, posteriormente durante el desarrollo tardío los OPCs provienen de la región dorsal. Estos OPCs se diferencian en oligodendrocitos premielinizantes (Mohammad, Olusegun, and Umaru 2016).

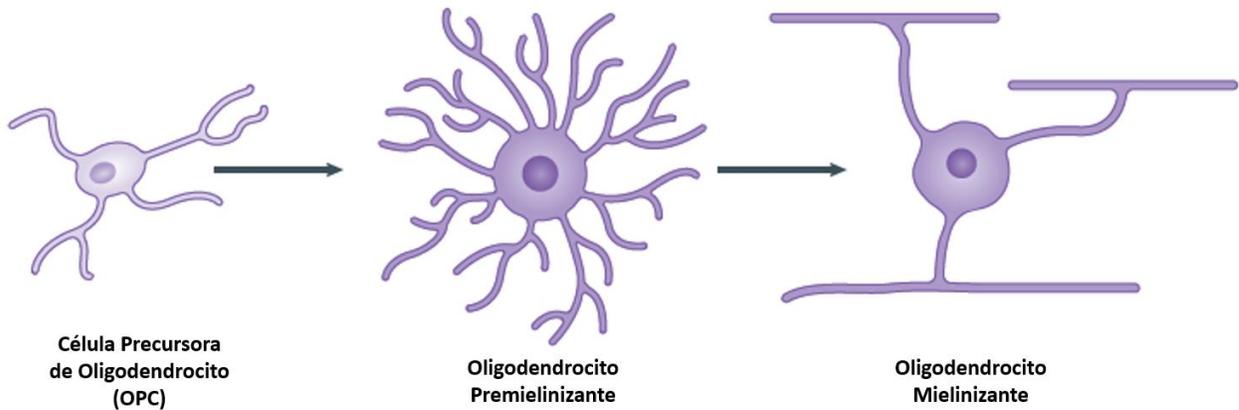


Figura 2. Linaje oligodendroglial. Se muestran esquemas de tres estadios del linaje oligodendroglial, partiendo de la célula precursora de oligodendrocito, además el oligodendrocito premielinizante que posee múltiples procesos celulares a diferencia del oligodendrocito mielinizante o maduro el cual posee un menor número de procesos celulares. Modificado de Fields (2015).

Morfológicamente los OLs se caracterizan por ser células pequeñas con relativamente pocos procesos (Fig. 2). Poseen un gran número de microtúbulos en sus procesos, posiblemente involucrados en la estabilidad de los mismos (Lunn, Baas, and Duncan 1997). Se localizan en el SNC y su función principal en la sustancia blanca es la de proveer

la mielina para la rápida conducción de las señales eléctricas a través del axón neuronal (Kandel Eric , Schwartz James , Jessell Thomas, Siegelbaum Steven 2013).

Los OLs producen capas de mielina, envolviendo al axón concéntricamente y en repetidas ocasiones (Fig. 3). Los segmentos mielinizados reciben el nombre de internodos, estos tienen una longitud entre 150-200 μm y tienen una periodicidad de 12 nm (Baumann and Pham-Dinh 2001). Los OLs son capaces de recubrir a más de un axón o al mismo axón, pero en diferentes puntos, siendo capaces de realizar de 1 hasta 30 segmentos (Kandel Eric , Schwartz James , Jessell Thomas, Siegelbaum Steven 2013). La característica de poseer nodos e internodos es lo que le otorga al impulso nervioso la característica de “conducción saltatoria” (Baumann and Pham-Dinh 2001).

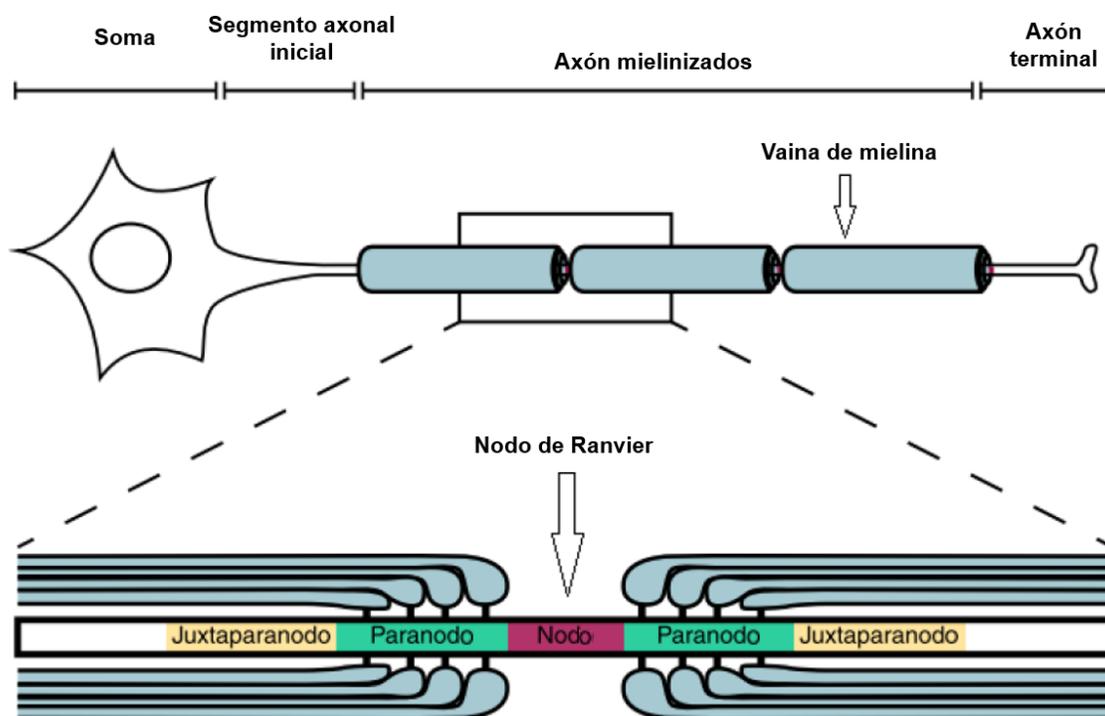


Figura 3. Estructura de una neurona con axón mielinizado. Esquematación de una neurona y sus partes. En éste se pueden resaltar los nodos de Ranvier y las vainas de mielina envueltas concéntricamente alrededor del axón, llamadas internodos. Modificado de Arancibia-Carcamo and Attwell (2014).

Además, los OLs y la misma mielina son factores importantes en la organización interna de la estructura axonal y del posterior crecimiento del calibre de este último, pues intervienen en el mantenimiento y supervivencia del propio axón. En ausencia de la proteína específica de mielina PLP/DM-20, por ejemplo, los axones presentan morfologías anormales, además de la degeneración de éstos (Baumann and Pham-Dinh 2001).

Por otro lado, en la comunicación entre OLs y neuronas, los neurotransmisores ejercen actividad moduladora sobre los OLs. Algunos de los principales neurotransmisores son el glutamato, la adenosina trifosfato (ATP), el ácido γ -aminobutírico (GABA) y la adenosina, que actúan sobre el OL a través de diversos mecanismos, algunos de ellos relacionados con señalización de calcio (Butt 2006). De manera importante, en el caso de GABA, principal neurotransmisor inhibitorio del SNC, éste se ha vinculado en la regulación de la mielinización axonal (Lee and Fields 2009). El neurotransmisor actúa sobre receptores a GABA (GABAR), es producido en las neuronas GABAérgicas a partir del aminoácido glutamato por medio de la enzima ácido-glutámico descarboxilasa (GAD) y es degradado por la enzima GABA transaminasa; además, GABA juega un papel en la modulación de la actividad neuronal (Radhakrishnan et al. 2011).

Se conocen dos clases de receptores GABAR; los ionotrópicos llamados GABA_AR y los metabotrópicos llamados GABA_BR (Vélez-Fort, Audinat, and Angulo 2012). Éstos se expresan en neuronas y también en células gliales (von Blankenfeld, Trotter, and Kettenmann 1991). Los GABA_BR están asociados a sistemas de segundos mensajeros que se acoplan a proteína G, canales iónicos de calcio (Ca^{2+}) y de potasio (K^+) (Bettler et al. 2004). Poseen dos subunidades, la GABA_{B(1)} y la GABA_{B(2)}. La subunidad GABA_{B(2)} debe coexpresarse con GABA_{B(1a)} o GABA_{B(1b)} para formar un receptor funcional (Bettler et al. 2004).

Por su parte, los GABA_AR son receptores activados por ligando, al unírsele GABA, induce la apertura de un canal iónico para Cl^- , lo que provoca en general una hiperpolarización. Los GABA_AR se conforman por cinco subunidades, que pueden estar dispuestas en diferentes combinaciones (Fig. 4). En los OLs, la expresión de estos receptores es

determinada por su interacción con neuronas y ha sido propuesto un papel importante en los procesos de mielinización (Arellano et al. 2016).

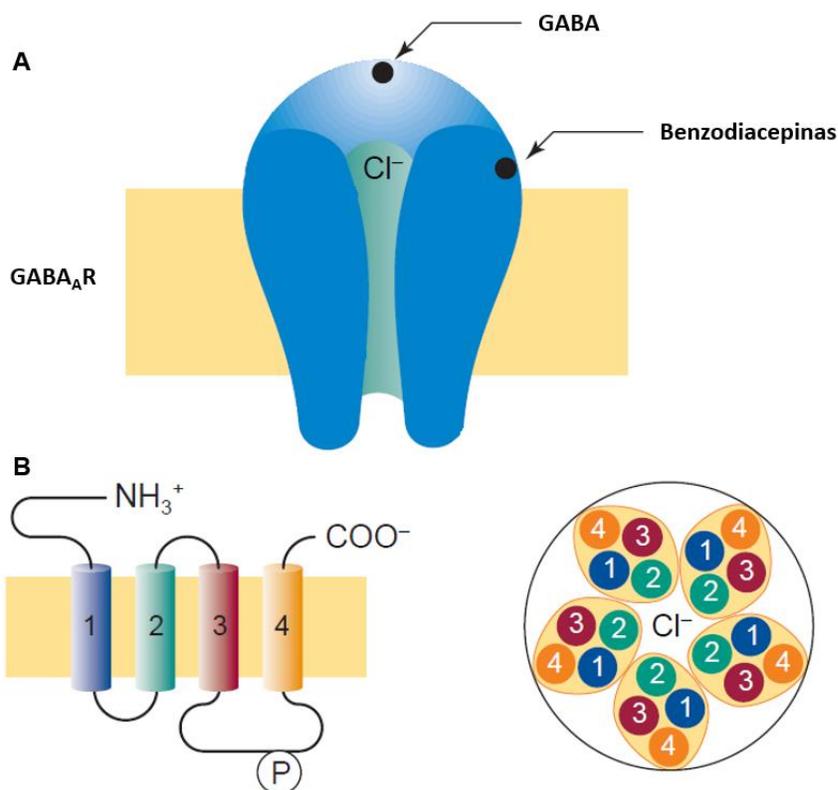


Figura 4. Estructura del receptor ionotrópico a GABA. Esquematación de un GABA_AR. A) El GABA_AR posee sitios de unión a GABA y a benzodiazepinas, entre otros. Este receptor permite el flujo de Cl⁻. B) Se compone por 5 subunidades. Cada subunidad contiene 4 dominios transmembranales (TM1-TM4) además, se indica un sitio intracelular de fosforilación por cinasas (P). Modificado de (Bormann 2000).

En trabajos previos se ha mostrado que los GABA_AR poseen un patrón farmacológico distintivo en receptores de OLs (Arellano et al. 2016). La evidencia sugiere que esta distinción podría conferirle propiedades de blanco terapéutico, con la idea de modificar los procesos mielinizantes.

Se conocen una gran cantidad de moléculas de distintas características que modulan activando, llamados agonistas, o inhibiendo, llamados antagonistas, a los GABA_AR. Uno de los moduladores clásicos es el diazepam, que es un agonista y potencia la respuesta a GABA (Campo-Soria, Chang, and Weiss 2006) o el indiplón que actúa como un modulador alostérico positivo (Petroski et al. 2006).

Además, existe otra clase de moduladores, lo denominados agonistas inversos: éstos se unen en el mismo sitio al que se une un agonista, pero ejerciendo un efecto contrario, inhibiendo al receptor. Existe un grupo de moléculas llamadas β -carbolinas, también moduladoras de los GABA_AR, que en neuronas actúan inhibiendo las respuestas a GABA (Rigo et al. 2002). Una de las moléculas que forman parte de este grupo es la butil- β -carbolina-3-carboxilato (β -CCB) que actúa como un agonista inverso e inhibe potentemente la unión de las benzodiazepinas con el receptor en neuronas. Por el contrario, en los GABA_AR oligodendrogiales, la β -CCB actúa potenciando la respuesta a GABA (Arellano et al. 2016). Es importante resaltar la distinción de funcionalidad de β -CCB entre OLs y neuronas, pues su característica de potenciación del GABA sobre los OLs, abre la posibilidad de modular funciones primordiales como la mielinización. Sin embargo, es necesario llevar a cabo las investigaciones pertinentes para desentrañar la factibilidad y alcance de estas ideas.

1.3 Lesión difusa de sustancia blanca (LDSB)

Dentro de los problemas de salud relacionados a la medicina neonatal, las lesiones cerebrales en infantes pretérmino son de particular importancia. En países de primer mundo, por ejemplo, más de 50,000 infantes nacen prematuros y con bajo peso, aunque debido a los avances en los cuidados intensivos neonatales, aproximadamente el 90% de estos infantes sobreviven el periodo neonatal. Sin embargo, de este 90% alrededor del 10% de infantes presentan en su desarrollo deficiencias espásticas motoras, que están categorizadas como parálisis cerebral. Además, un 25-50% adicional posteriormente manifiestan deficiencias cognitivas o conductuales (Volpe 2001).

Las lesiones cerebrales en infantes prematuros engloban una variedad de lesiones neuropatológicas, como las lesiones difusas de sustancia blanca que incluyen a la leucomalacia periventricular (LPV), la hemorragia de la matriz intraventricular germinal, hidrocefalia post hemorragia y muchos patrones de lesiones neuronales. Las primeras dos de estas lesiones son las más importantes y con la baja en la incidencia de la hemorragia intraventricular, la LPV se ha posicionado como la forma principal de lesión cerebral en infantes prematuros (Volpe 2001).

La neuropatología de la LPV consiste en dos principales componentes, el focal y el difuso (Fig. 5). El focal localizado en la sustancia blanca profunda del cerebro, está caracterizado por necrosis localizada de todos los elementos celulares con la subsecuente formación de quistes. El componente difuso es una lesión poco menos severa y aparentemente específica, lesionando precursores de oligodendrocitos (OL), que están destinados a desarrollarse a OLs maduros que son los encargados de formar la mielina que recubre los axones de la sustancia blanca cerebral (Zonouzi et al. 2015), de este modo, la LPV conlleva una hipomielinización de la sustancia blanca durante el desarrollo.

Los infantes nacidos prematuramente (23-32 semanas de gestación) están en gran riesgo de desarrollar *lesión difusa de la sustancia blanca* (LDSB), que es a menudo asociada a la hipoxia crónica (Zonouzi et al. 2015). La LDSB es asociada con la interrupción del desarrollo de la sustancia blanca subcortical además de la pérdida de células NG2 tardías (Zonouzi et al. 2015). Las NG2 son células gliales en el sistema nervioso central de mamíferos que expresan el proteoglicano NG2 que se diferencian a OPC's (Zhu, Bergles, and Nishiyama 2007). También está asociada con la reducción de la expresión de marcadores GABAérgicos en la corteza y en la sustancia blanca, y recientes estudios han identificado una reducción en GABA cortical con relevancia clínica en modelos murinos de LDSB (Zonouzi et al. 2015). Se ha demostrado que la LDSB disminuye la tasa de la proteína p27 de arresto del ciclo celular en células NG2, contribuyendo además a la interrupción del progreso del desarrollo de estas células e induciendo la desmielinización de la sustancia blanca subcortical. La proliferación y maduración de las células NG2 resulta en mejoras funcionales. Estas células NG2 expresan el GABA_AR y reciben sinapsis

GABAérgicas de interneuronas en el desarrollo temprano. La señalización GABAérgica durante la progresión del ciclo celular de las células NG2 les podrían proveer de un mecanismo para la regulación de la proliferación y diferenciación de éstas a oligodendrocitos (Zonouzi et al. 2015).

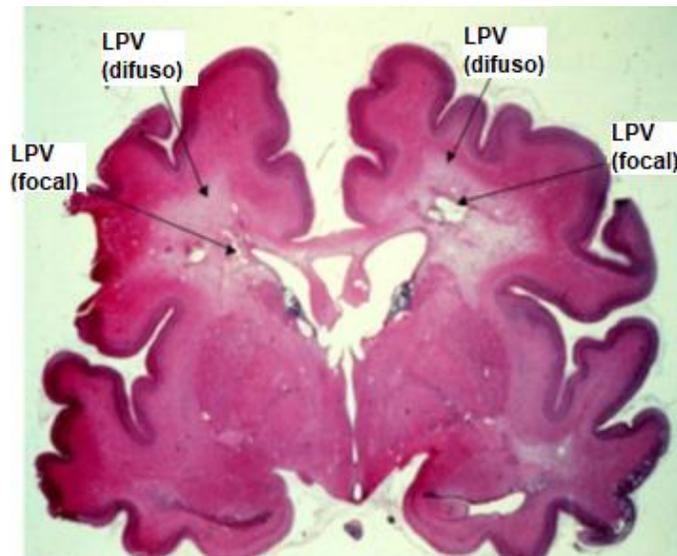


Figura 5. Componentes de la leucomalacia periventricular (LVP). Tinción hematoxilina-eosina de un corte coronal de cerebro de un infante prematuro fallecido por fallo cardiaco. Se pueden apreciar las lesiones presentes en la LPV, tanto el componente focal (necrosis quística) como el componente difuso en el que el linaje oligodendroglial se ve afectado, teniendo como consecuencia hipomielinización del área afectada. Tomada de Volpe et al (2011).

En general, las alteraciones en el desarrollo de la sustancia blanca debido al daño cerebral neonatal asociadas con la interrupción de la mielinización, que se correlaciona con un período de susceptibilidad regulada por el desarrollo de células progenitoras de oligodendrocitos tardíos (OPCs por sus siglas en inglés). Por esta razón, la identificación de mediadores moleculares de la regeneración de los OLs en sustancia blanca neonatal después de sufrir hipoxia es esencial para el desarrollo de estrategias terapéuticas para prevenir deficiencias del neurodesarrollo asociadas a esta patología (Jablonska et al. 2012).

2. ANTECEDENTES

La señalización GABAérgica está involucrada en la mielinización a través de las células NG2 de la sustancia blanca del cerebelo en modelos murinos de hipoxia (Zonouzi et al. 2015). La hipoxia causa la pérdida de la sinapsis mediada por GABA_AR, lo que provoca la proliferación de estas células y retrasa la maduración de los OLs, causando hipomielinización. Se ha reportado que, empleando tiagabina (inhibidor selectivo del transportador de GABA, GAT-1) y vigabatrina (inhibidor de la enzima GABA transaminasa) se contrarrestan los efectos de la hipoxia, pues estas moléculas provocan la acumulación y disponibilidad de GABA en el espacio sináptico, haciendo evidente su participación en estos procesos. El efecto particular que se observó fue la potenciación de la progresión de células NG2, disminuyendo su proliferación y promoviendo la oligodendrogénesis que, a su vez repercutió en una mejora de la mielinización (Zonouzi et al. 2015). Otros trabajos, realizados dentro de nuestro laboratorio, han mostrado que la β -CCB actúa como un potenciador de la respuesta a GABA_AR en los GABA_AR oligodendrogiales (Arellano et al. 2016). Estos receptores muestran una composición de subunidades $\alpha 3\beta 2\gamma 1$, la cual, se sugiere es la composición específica de estos receptores en los oligodendrocitos.

3. JUSTIFICACIÓN

Es importante el estudio del papel de la señalización GABAérgica en el proceso de mielinización durante el desarrollo postnatal normal y en condiciones patológicas. Por ello, desarrollar un modelo de alteración en la mielinización es crucial, pues permitiría utilizarlo con herramientas farmacológicas que respondan a la especificidad de la participación celular (OLs-Neus).

Con un modelo capaz de inducir hipomielinización, se proveerá de herramientas para el diseño de posibles estrategias terapéuticas.

4. HIPÓTESIS.

El tratamiento de hipoxia en la etapa postnatal inducirá hipomielinización en el SNC en ratones.

5. OBJETIVO.

Desarrollar un modelo de lesión en la mielinización de ratones postnatales y caracterizarlo longitudinalmente.

6.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Implementar un modelo de hipoxia en la etapa postnatal que induzca alteraciones de hipomielinización.
2. Determinar si existe hipomielinización en la etapa postnatal mediante histología por black gold II (BGII).
3. Evaluar el proceso de mielinización mediante resonancia magnética como técnica no invasiva en el estudio longitudinal del modelo en condiciones control y bajo tratamiento hipóxico.
4. Explorar la motricidad de animales expuestos a hipoxia en edad postnatal (al término del tratamiento) y adultas (posterior al tratamiento).

6. MATERIAL Y MÉTODOS.

La estrategia experimental planteada (Fig. 6) consistió en la aplicación de un tratamiento hipóxico de 5 exposiciones a ratones de la cepa cd1 en etapa post natal, iniciando al día post natal 3 y concluyendo al día 7. Al término del tratamiento hipóxico, se seleccionó aleatoriamente una muestra de animales y se disecó el tejido cerebral el cual se preparó para realizar un análisis histológico mediante la tinción black gold II (BGII). En los días p24

y p33 se realizó una prueba de motricidad y se obtuvieron imágenes mediante resonancia magnética. A p33, como en p7, se disecó y procesó el tejido cerebral para el posterior análisis histológico.

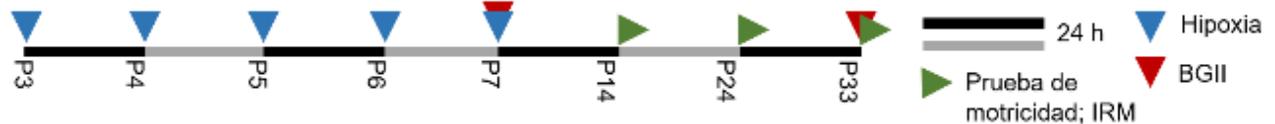


Figura 6. Estrategia experimental. Esquema que ilustra el diseño experimental seguido.

Animales: Se empleó un modelo murino, con ratones *Mus musculus* cepa cd1. En etapa post natal 3 (p3) a etapa post natal 33 (p33). Los ratones fueron mantenidos en cuarto de bioterio con una nodriza. Fueron monitoreados diariamente, registrando el peso, etiquetándolos y llevados al cuarto de procedimientos correspondiente, ya sea para exploración motriz o imagenología. Los sacrificios, para los análisis histológicos se hicieron al término de la prueba de imagenología. En breve, los animales fueron sacrificados por anestesia profunda con isofluorano (en cámara de gases), enseguida una dosis de 50 mg/Kg de pentobarbital sódico fue administrada vía intraperitoneal, como método de eutanasia. Luego, los ratones fueron perfundidos vía ventrículo izquierdo, primero con solución tampón de fosfatos (solución PBS 1X) y enseguida con PFA 4%.

Modelo de hipoxia. En una cámara de gases los ratones se expusieron a una atmósfera hipóxica la cual se compone de una mezcla de gases de 5% de O₂, 5% de CO₂ y 90% de N₂ (Fig. 7A). Los animales fueron expuestos desde edad p3, diariamente durante 6 horas, hasta p7. Se exploró la exposición a hipoxia durante 5 días. Posterior a cada sesión diaria, los animales fueron devueltos a su hábitat en bioterio, junto a la nodriza, hasta el siguiente paso experimental. Los animales control recibieron la misma manipulación con la excepción de ser expuestos a una atmósfera normóxica (Fig. 7B).

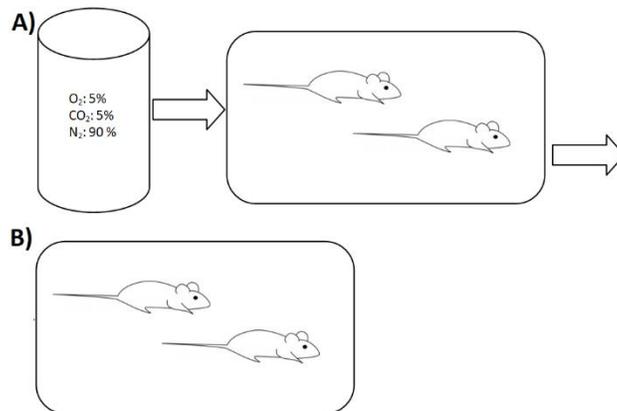


Figura 7. Estrategia experimental para la inducción de la hipoxia. A) Para el grupo con tratamiento hipóxico se utilizó una cámara de gases la cual está conectada a un tanque con la mezcla de gases (O₂: 5%, CO₂: 5%, N₂: 90 %) los cuales entran a la cámara y desplazan la atmósfera ambiental presente dentro de la cámara a una presión de 100 libras de fuerza por pulgada cuadrada (psi; por sus siglas en inglés pounds-force per square inch). B) Para el grupo control se utilizó una cámara de gases sin inducción de hipoxia (sin tanque de gases conectado).

Preparación de tejido cerebral. Los cerebros de los animales fueron disecados a distintas etapas de su desarrollo en condiciones patológicas y normales. Posteriormente se fijaron en paraformaldehído al 4% en solución buffer fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés). Para criopreservarlos se colocaron en una solución PBS-30% sacarosa (50 mL PBS/15 g sacarosa) durante 24 h. Tras 24 h de criopreservación, los tejidos fueron cortados de 50 micrómetros (µm) en un criostato (Leica® CM 1850) a una temperatura entre -24° y -26° C y colocados en portaobjetos electrocargados (VWR micro slides Superfrost® Plus).

Black Gold II. Para analizar la mielinización de los tejidos cerebrales, se empleó la tinción Black Gold II (BGII) (Millipore Black-Gold II Myelin Staining® kit), un compuesto de aurohalofosfatos específico para mielina. Para ello, los cortes de 50 µm, fueron hidratados con solución PBS y con H₂O Milli-Q durante 2 minutos (min) cada una, se incubaron en

solución de BGII (disuelto al 0.3% en solución NaCl 0.9%) durante 12-20 minutos a 60° C. Posteriormente recibieron una serie de lavados con PBS durante 2 min, seguido de tiosulfato de sodio 1% (Na-Tio) por 3 min a 60° C y otro lavado con PBS por 2 min. Enseguida, fueron contrastados con violeta de cresilo 0.1% (en H₂O Milli-Q y ácido acético glacial (3µl de ácido por mL de agua)) por 1 min. Tras un lavado con PBS por 2 min los cortes fueron deshidratados con alcoholes, etanol 70% 1 min y 96% 1 min. Para realizar el montaje, se les agregó xilol por 1 min y posteriormente se agregó medio DPX® y se les colocó un cubreobjetos, para posteriormente ser visualizadas en microscopio óptico de luz.

Resonancia magnética (RM). Dos grupos de ratones fueron sometidos a exploración mediante RM. Éstos fueron monitoreados después de concluido el tratamiento hipóxico, a p24 y p33. Las imágenes de resonancia fueron adquiridas en el resonador Bruker de 7T (Bruker®) del LANIREM. En particular, las imágenes son adquiridas en una secuencia 2D de imágenes exo-planares (EPI: Echo-Planar Image) de 30x20 mm, con 22 rebanadas virtuales de 650 µm (que cubre prácticamente todo el encéfalo). Se usó un tiempo de repetición de 2 s, tiempo de eco de 20 s y 64 direcciones. Un par de gradientes de campo pulsado con un valor b de 650 s/mm² se aplicó alrededor del pulso de RF de 180° en una secuencia spin-echo.

Una vez que se adquirieron las imágenes de difusión, éstas fueron procesadas mediante el software MRtix 3 (<https://www.mrtix.org/>). Dado que la microarquitectura del tejido cerebral obstruye el movimiento o la difusión de las moléculas de agua, causando perfiles de difusión dependientes del tejido, se empleó entonces un protocolo para medición del tensor de difusión (DTI: Diffusion Tensor Imaging), lo que da como resultado imágenes dependientes del tejido y de la orientación. De este modo, tejidos cerebrales con diferencias estructurales, por ej., sanos o enfermos, influyen de manera diferente en la difusión. De esta manera se calcularon los mapas de anisotropía (Fig. 8 A1-2), del vector de difusión (Fig. 8 B1-2), además de los mapas de la difusión axial y difusión radial.

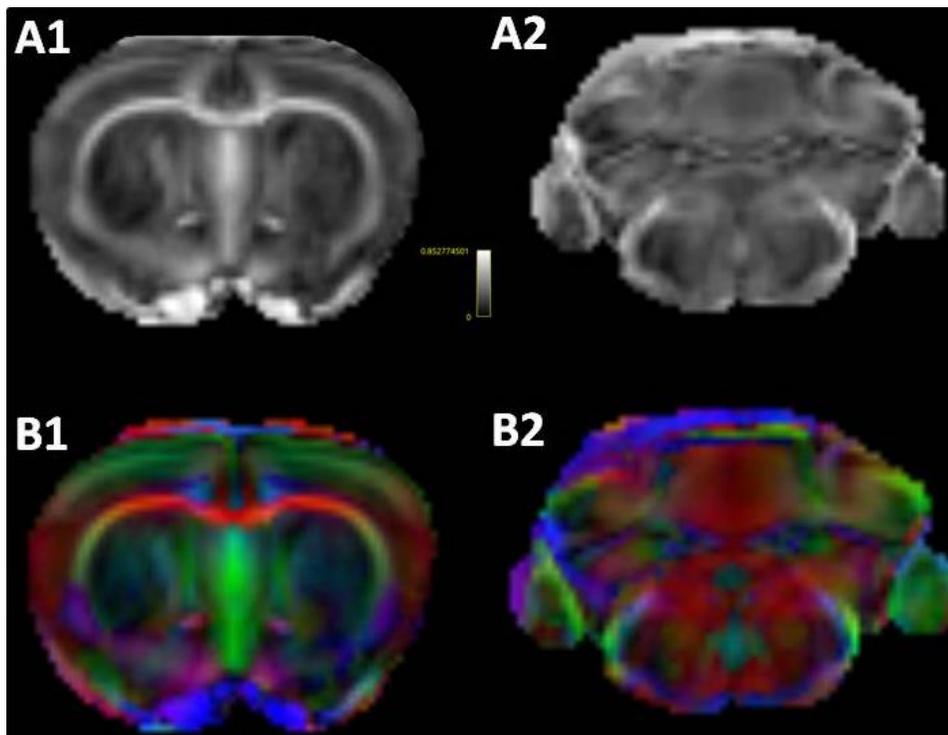


Figura 8. Exploración de imagenología por resonancia magnética (IRM). Imágenes en vista coronal, típicas del mapa de anisotropía (A) y del vector principal de difusión (B). Se muestran ejemplos en cerebro (A1, B1) y en cerebelo (A2, B2) de ratón cd1 (P24). Las intensidades de estos mapas representan la magnitud de FA, así como la orientación de los elementos del vector (rojo: izquierda-derecha, verde: dorsal-ventral y azul: rostral-caudal).

A partir de los mapas generados fue posible crear mapas de regiones de interés (ROI: Region of Interest) en el tejido cerebral los cuales delimitaban estructuras específicas (Fig. 9). Mediante las ROI's creadas se cuantificó, a través del software, los valores del factor de anisotropía, de la difusión axial y la difusión radial.

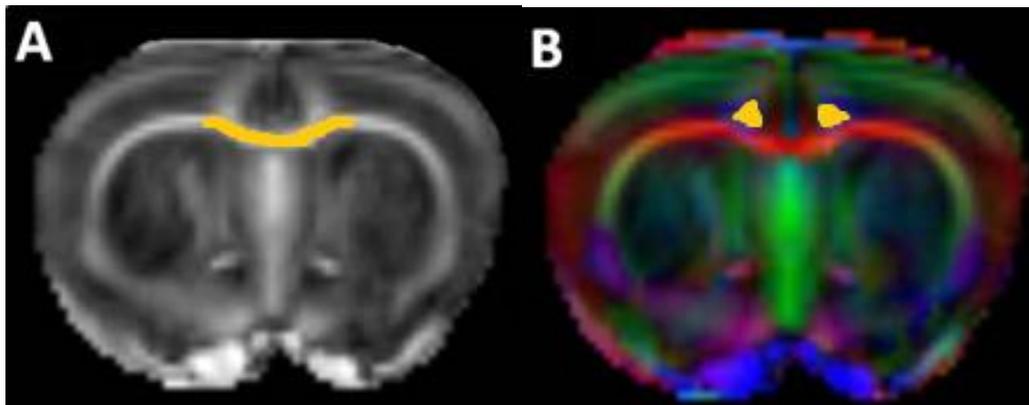


Figura 9. Mapas de regiones de interés (ROI). Imágenes ilustrativas que muestran cómo fueron seleccionadas las ROI's, región en amarillo. En A, se muestra la ROI del cuerpo calloso creada sobre el mapa de anisotropía. En B, la ROI del cíngulo creada sobre el mapa del vector de difusión.

Análisis de motricidad. Las pruebas utilizadas fueron adaptadas de los sistemas de puntuación descritos por otros para postnatales o animales adultos sometidos a diversos paradigmas de daño cerebral isquémico-hipóxico (Kim et al. 2017). Para evaluar la capacidad motriz se realizó una prueba que consistió en colocar al animal en el extremo de un pasillo de 20 centímetros (cm) de longitud, en el otro extremo se deposita aserrín que proviene del nido donde es alojado junto a la nodriza para estimular al sujeto para que atraviese el pasillo (Fig. 10). El animal debe atravesar los 20 cm y el tiempo que le lleva es cronometrado. Tras 1 serie de entrenamiento se realizaron 5 repeticiones por animal.



Figura 10. Estrategia experimental para análisis de motricidad. El animal recorre un pasillo de 20 cm de longitud, donde al final de los 20 cm se coloca aserrín tomado de su hábitat. Se cuantifica el tiempo en el que recorre los 20 cm, adicionalmente se calcula la velocidad.

Cuantificación de la densidad óptica. Se utilizó el software ImageJ (versión 1.52^a) para la cuantificación de la densidad óptica (DO) de áreas de distintas estructuras cerebrales teñidas con BGII. Primero las imágenes se convirtieron a escala de grises (8 bits). Posteriormente, se crearon ROI's a partir de las cuales la intensidad óptica (IO) fue obtenida. Se obtuvo la DO, normalizando los valores de IO de cada ROI (IO_{ROI}) contra la IO del fondo de cada ROI (IO_f) (Ec. 1)(Cisneros-Mejorado et al. 2019).

$$DO = \frac{IO_f - IO_{ROI}}{IO_f}$$

Ecuación 1. Densidad óptica normalizada.

Análisis estadístico. En cada análisis estadístico se muestra el promedio para cada grupo y como medida de dispersión se muestra el error estándar. Se utilizó la prueba t-Student para comparar las medias de dos grupos. Utilizando un intervalo de confianza del 95% ($P < 0.05$). Las pruebas estadísticas fueron realizadas con el software GraphPad Prism® (versión 6).

7. RESULTADOS

7.1. Efectos de la hipoxia en etapas postnatal y adulta medidas con BGII

Primero, animales normóxicos e hipóxicos fueron evaluados para comparar los niveles relativos de mielina, mediante BGII. La evaluación se hizo al terminar el tratamiento hipóxico, esto es en p7. Como se muestra en la figura 11, cortes coronales de cerebro fueron obtenidos, tanto de ratones expuestos a hipoxia como animales en condiciones normóxicas. Se obtuvieron micrografías de cortes secuenciales para cada caso, y en ellos

se cuantificó la densidad óptica, obtenida de BGII, en distintas zonas de cada rebanada, como se ejemplifica en la figura 11A-B. La densidad óptica medida en condiciones normóxicas fue de 0.58 ± 0.02 , mientras que para las condiciones hipóxicas fue de 0.35 ± 0.01 , es decir, una reducción del 40%. Esto sugiere que el daño por hipoxia resulta en una menor cantidad de mielina, de manera generalizada pues las zonas afectadas están ubicadas prácticamente en todo el cerebro.

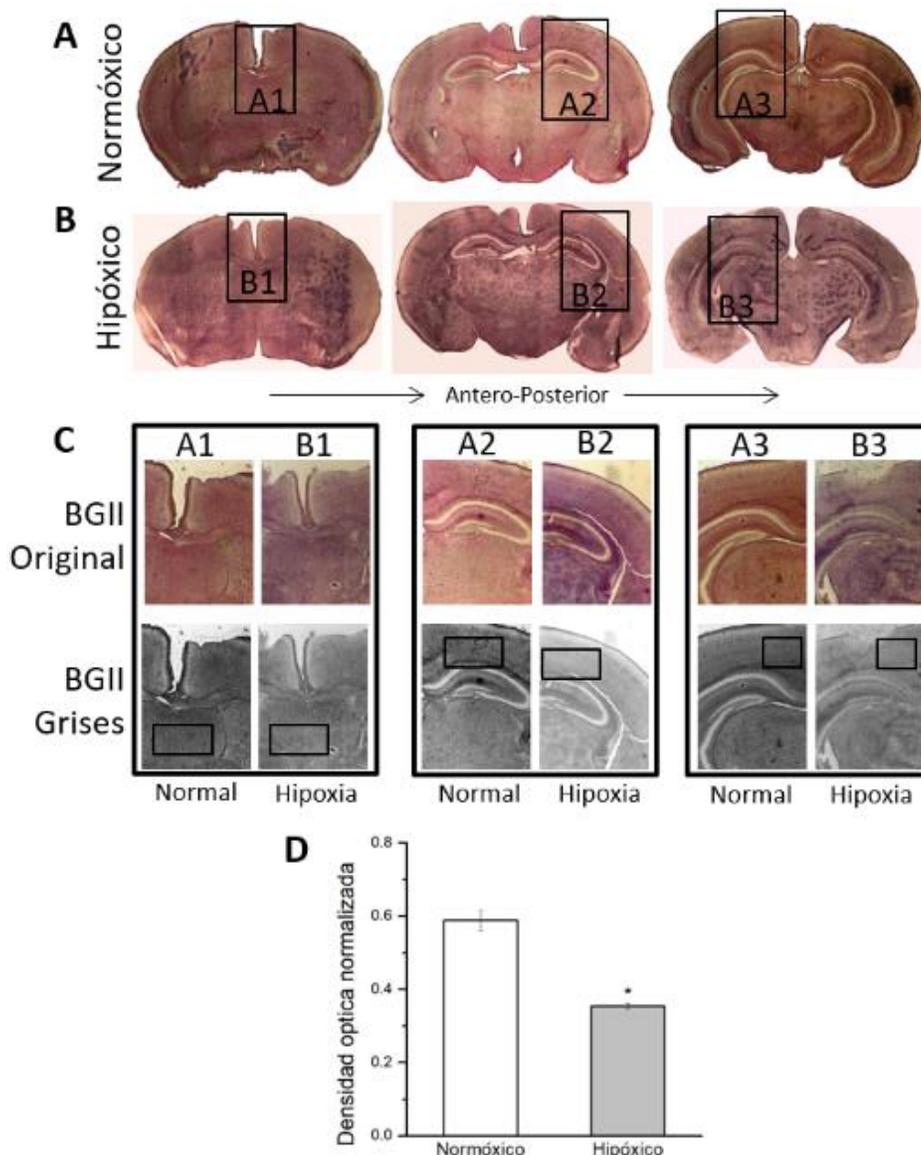


Figura 11. Mielinización en hipoxia en ratones p7. A y B muestran cortes coronales secuenciales (50 μ m) de cerebros de ratón en condiciones normóxicas (arriba) e hipóxicas (abajo)

en edad p7, justo al terminar el tratamiento hipóxico. Estas imágenes panorámicas son una composición de múltiples imágenes tomadas a 4X para cada corte coronal (composición de 16 a 20 imágenes, unidas en software ImageJ). Nótese una menor coloración de BGII en condiciones hipóxicas. **C**, micrografías correspondientes a los recuadros en negro en A y B, tomadas en objetivo 10X. Las micrografías originales de la tinción con BGII (BGII Original) son convertidas a escala de grises (BGII Grises) para posteriormente medir las intensidades de tinción en distintas estructuras de interés. **D**, DO normalizada para los dos grupos comparados, normóxicos e hipóxicos. La cuantificación proviene de medir la DO en las regiones de los recuadros marcados en C, para cada rebanada. La DO normalizada, proviene de la DO promediada para cada rebanada y luego por grupo. * $P < 0.05$ ($n=3$; se muestra promedio \pm error estándar).

Lo anterior sugiere que las condiciones de hipoxia promueven una alteración en la mielinización, lo que se muestra como una menor tinción con BGII, medida en distintas estructuras del cerebro de ratón. Adicionalmente, se evaluó si estos daños estructurales pueden ser recuperados en etapas posteriores, en la etapa adulta de los animales. Así, ratones normóxicos e hipóxicos se dejaron vivir hasta el día p33, y en esta etapa nuevamente se analizó la densidad óptica de distintas estructuras en cortes histológicos. El análisis se realizó en micrografías secuenciales de cortes coronales de tejido normóxico (Fig. 12A) como hipóxico (Fig. 12B), delimitando las áreas de interés para inicialmente realizar un análisis global (Fig. 12C). De manera interesante, se encontró que la DO global en el grupo normóxico fue de 0.4793 ± 0.02250 , mientras que en el de condiciones hipóxicas fue de 0.5434 ± 0.01453 . Para intentar discernir cuáles estructuras tenían DO diferente, lo que influencia sobre la DO global, se cuantificó este parámetro en diversas zonas como el cíngulo, el tálamo, el hipotálamo, el cuerpo caloso y la corteza cerebral. En algunas estructuras (p.e. el cíngulo, el tálamo, el hipotálamo) no se encontró diferencia significativa en la DO (Fig. 13), lo que sugiere que en esta etapa posterior existe una recuperación del daño hipomielinizante inducido por la hipoxia, hallazgos que están en acorde con estudios previos (Zonouzi et al. 2015). Sin embargo, en el cuerpo caloso se observa aún la persistencia del daño (DO 0.7709 ± 0.02119 normóxico, 0.6820 ± 0.01284 hipóxico) (Fig. 14), esto indica que el cuerpo caloso permanece dañado hasta edades más tardías. De

manera interesante, se encontró que la corteza cerebral tiene una mayor DO en los animales que fueron sometidos al tratamiento hipóxico (DO de 0.2708 ± 0.03204 normóxico, 0.5408 ± 0.01129 hipóxico) (Fig. 15).

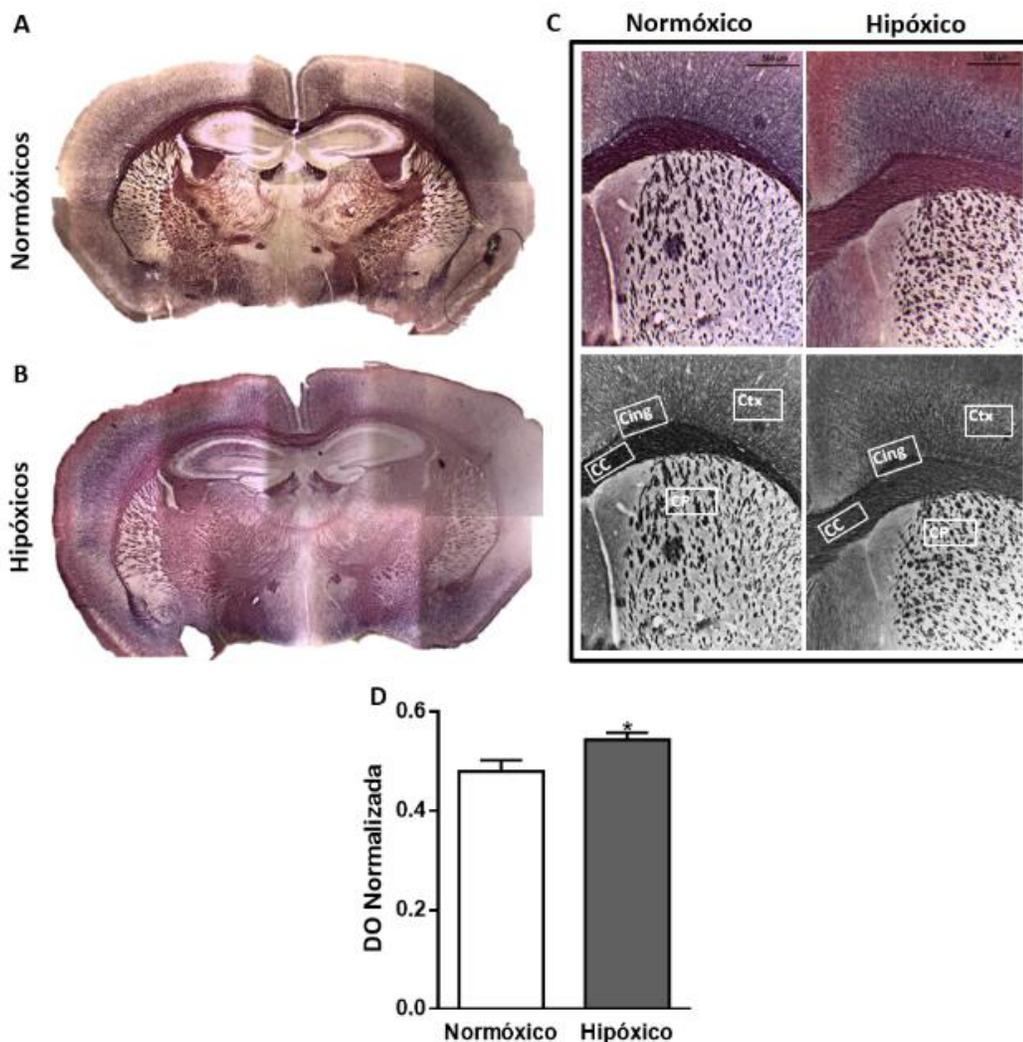


Figura 12. Mielinización en hipoxia en ratones p33. Cortes coronales (50 μ m) de cerebros de ratón en condiciones normóxicas (A) e hipóxicas (B) en edad p33. Estas imágenes panorámicas son composiciones de múltiples imágenes adquiridas con objetivo 4X de cortes coronales (composición de 9 a 12 imágenes, unidas en software ImageJ). C, método para cuantificar la densidad óptica en las tinciones con BGII: las imágenes originales (en color) son transformadas a escala de grises (8 bits), obtenidas con objetivo 4X. Además, se muestran recuadros ilustrativos de algunas áreas en las que se cuantificó la DO. Cuerpo calloso (CC), cíngulo (Cing), corteza (Ctx), caudoputamen (CP). Además, se cuantificó la DO en el tálamo y el hipotálamo (no ilustrado). Los

cortes provienen de dos cerebros representativos, uno normóxico y uno hipóxico. **D**, muestra la DO normalizada para los dos grupos comparados, normóxicos e hipóxicos. * $P=0.0158$ (Prueba t-Student desapareada de dos colas; $n=3$). Las gráficas son presentadas como la media \pm error estándar.

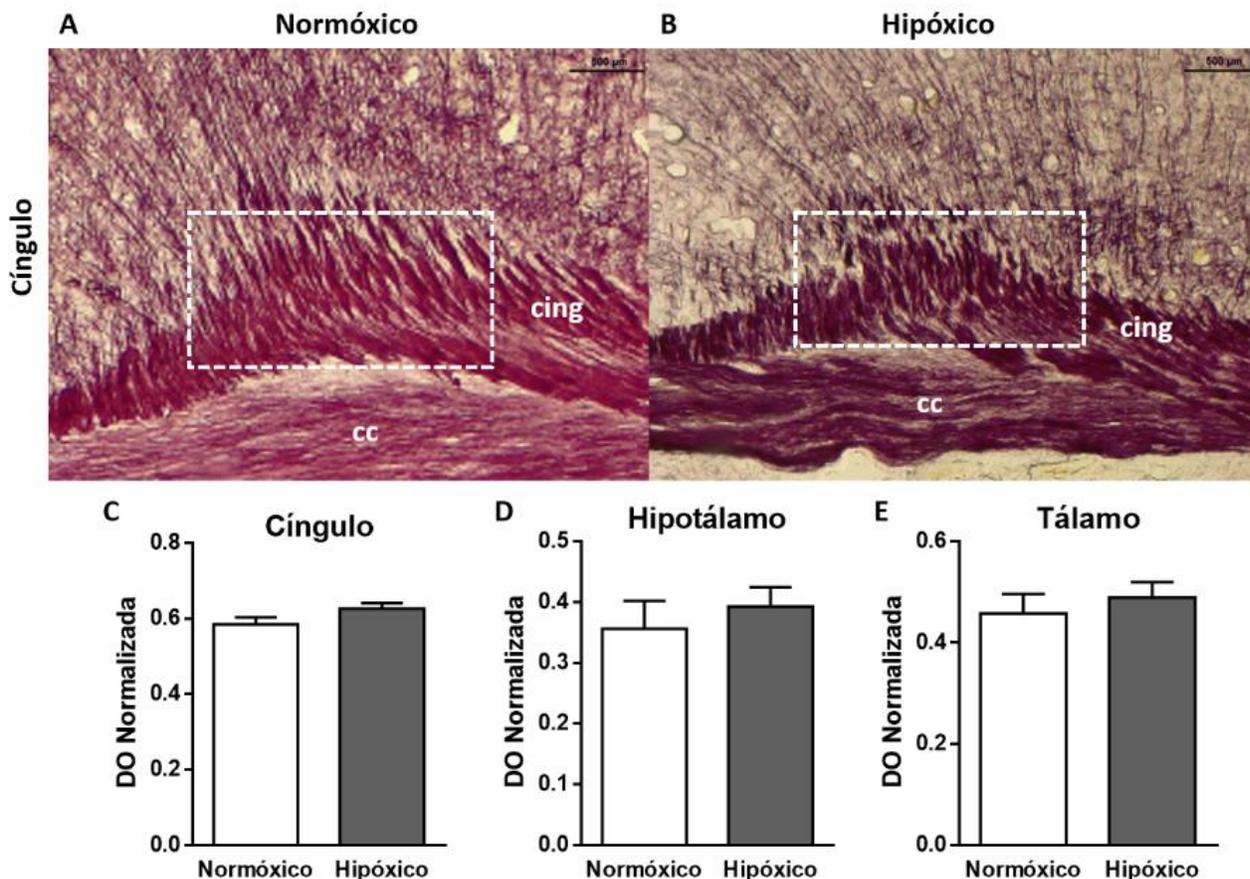


Figura 13. Densidad óptica (DO) normoxia vs hipoxia en edad p33. Cortes coronales de tejido normóxico (**A**) e hipóxico (**B**) en los que se observa el cíngulo (cing) y el área analizada dentro del recuadro. Los histogramas muestran la DO normalizada de normóxicos vs hipóxicos de distintas estructuras, el cíngulo (**C**), el hipotálamo (**D**) y el tálamo (**E**). Cuerpo calloso (cc). Prueba t-Student desapareada de dos colas; $n=3$. Las gráficas son presentadas como la media \pm error estándar.

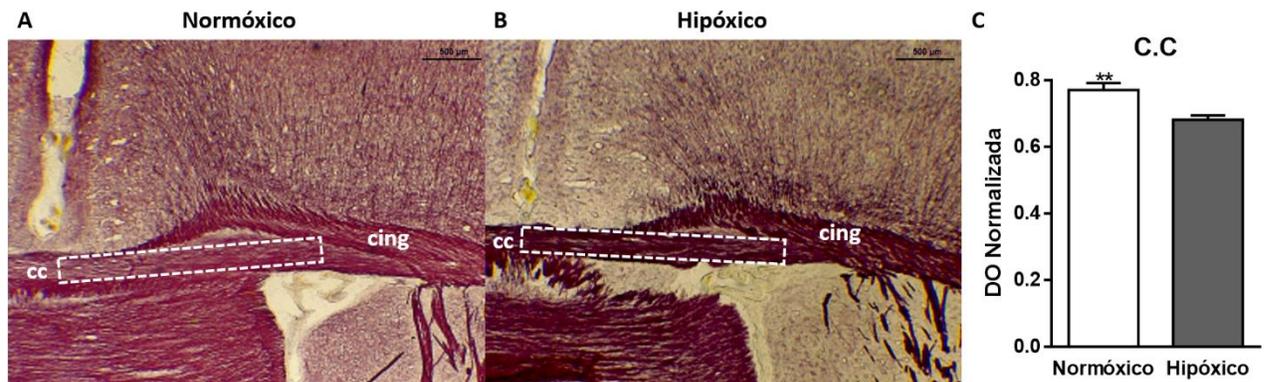


Figura 14. Densidad óptica (DO) de cuerpo calloso en edad p33. Micrografías representativas de tinciones BGII, en plano coronal, de tejido normóxico en **A** y tejido hipóxico en **B**. recuadro delinea el área del cuerpo calloso (cc) que fue analizada. **C** DO normalizada, la DO en el tejido normóxico es mayor que del grupo hipóxico. Cíngulo (cing). ****** $P=0.0013$. Prueba t-Student desapareada de dos colas; $n=3$. Las gráficas son presentadas como la media \pm error estándar.

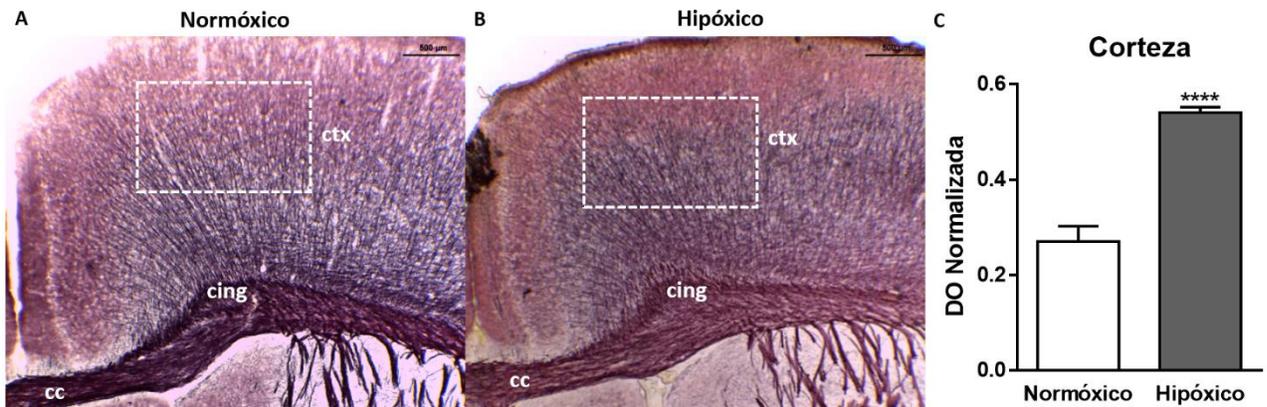


Figura 15. Densidad óptica (DO) de la corteza en edad p33. Micrografías representativas de tinciones BGII, en plano coronal, de tejido normóxico en **A** y tejido hipóxico en **B**. Los recuadros delinean las áreas ilustrativas que fueron analizadas sobre la corteza. **C** DO normalizada, la DO en el tejido normóxico es mayor que del grupo hipóxico. Corteza (ctx), cuerpo calloso (cc) y cíngulo (cing). ******** $P<0.0001$. Prueba t-Student desapareada de dos colas; $n=3$. Las gráficas son presentadas como la media \pm error estándar.

7.2. Alteraciones en las métricas de RM en animales expuestos a hipoxia

Para explorar *in vivo* el efecto de la exposición a hipoxia y la posible hipomielinización, se realizó un estudio mediante resonancia magnética por el método de difusión, que permitió realizar la cuantificación de la fracción de anisotropía (FA), mediante la cual se infirió la presencia de mielina. A partir de las imágenes obtenidas por difusión, se obtuvo el mapa de FA. La figura 8 muestra un ejemplo de mapas de FA en condiciones control (Fig. 16A) y con exposición a hipoxia (Fig. 16B).

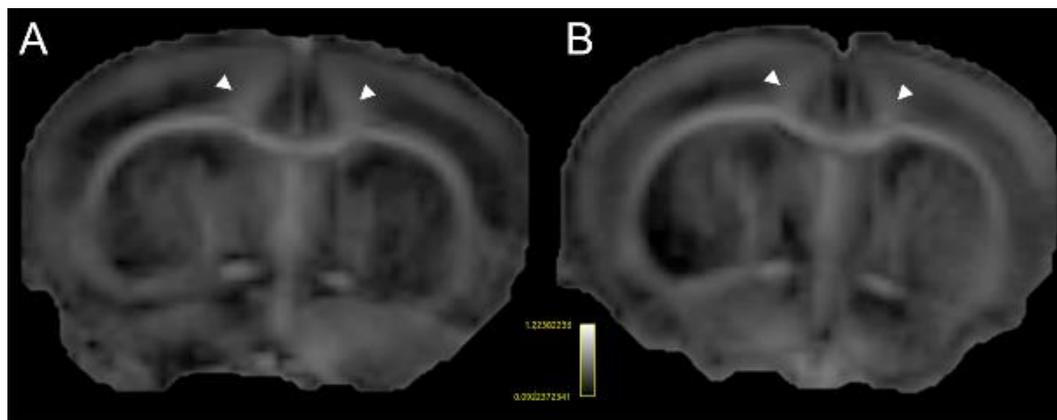


Figura 16. Mapa de anisotropía de animales en etapa p24. Se presentan dos imágenes representativas del mapa de anisotropía de un animal normóxico (A) y un animal hipóxico (B). Nótese las diferencias en la intensidad en el área donde se localiza el cíngulo (flechas), la hipoxia promueve una menor fracción de anisotropía.

Utilizando esta metodología, inicialmente, se exploró el daño en animales de edad p24, en ambos grupos normóxicos e hipóxicos. Se evaluó el FA en los animales expuestos a hipoxia (exposición de 6 h durante 5 días, 6 h/5 d). También en este grupo de animales se realizó el análisis de manera global (Fig. 17A), del cerebelo (Fig. 17B) y de algunas estructuras particulares (Fig. 17C). Se encontró que la hipoxia promueve disminuciones en el índice de FA globalmente y también a nivel estructura; por lo menos existen diferencias en el cerebelo, la corteza cerebral, el cíngulo y el miembro olfativo (Fig. 17). Los resultados anteriores sugieren que estas estructuras presentan hipomielinización, la cual es inducida

por el tratamiento hipóxico. Enseguida, para explorar este índice en edades más avanzadas y correlacionar con los hallazgos histológicos, se cuantificó el FA en p33 en ambos grupos.

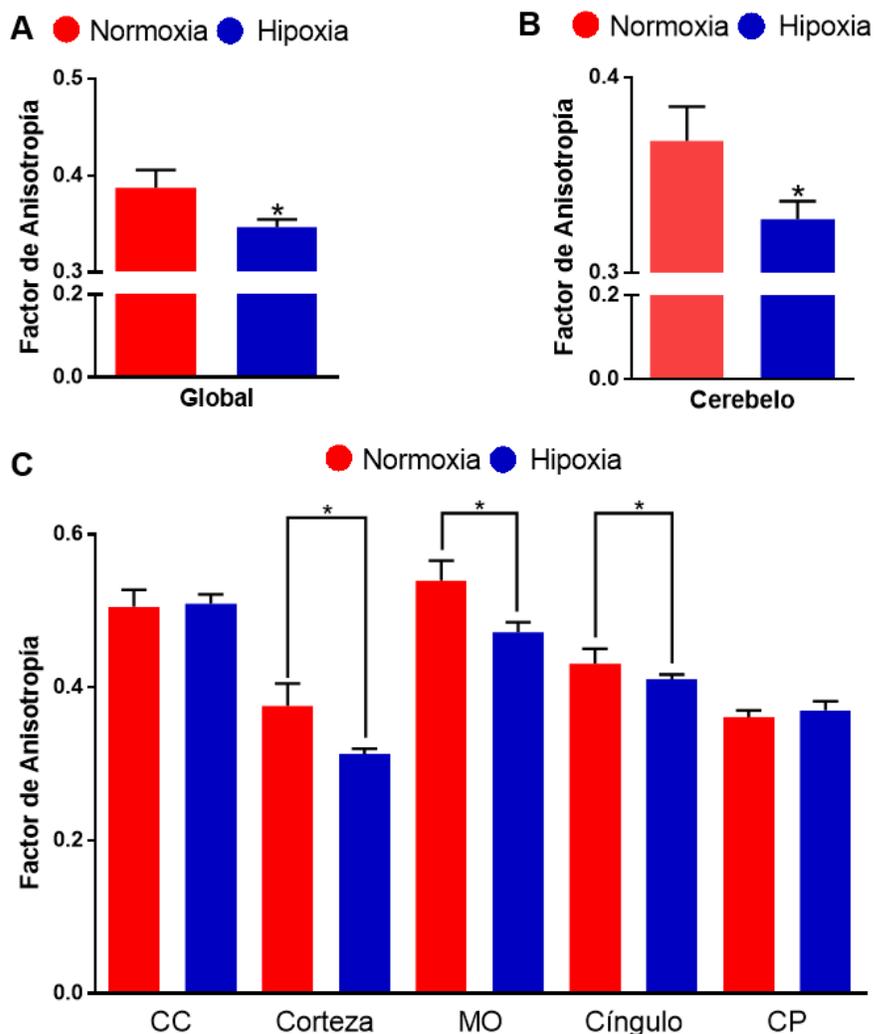


Figura 17. Índice de la fracción de anisotropía (FA) en p24. Se calculó la FA a través de las imágenes obtenidas por resonancia magnética. Comparación de la FA entre animales normóxicos e hipóxicos en etapa p24. De manera general, se observa un menor factor de anisotropía en los animales bajo condiciones hipóxicas, tanto en el análisis global como en estructuras individuales. Presentando una diferencia significativa en las estructuras del cíngulo, del miembro olfativo y de la corteza. Además la anisotropía global también se vio afectada. Cuerpo calloso (CC), miembro olfativo (MO) y caudoputamen (CP) * $P < 0.05$ $n \geq 3$ para cada caso. Las gráficas son presentadas como la media \pm error estándar.

Después de 25 días de la exposición hipóxica, no se encontraron diferencias en el FA de ambos grupos de animales. Ni en el análisis global, como tampoco en el análisis de estructuras particulares. Estos resultados sugieren la recuperación de la presencia de mielina en el grupo de animales expuestos a hipoxia casi un mes antes. Sin embargo, en contraste con los hallazgos histológicos, en donde se muestra hipomielinización en el cuerpo caloso, el valor de FA en esta estructura no difiere, es posible que el uso de diferentes metodologías confiera estas discrepancias, las cuales podrían ser resueltas con un mayor número de muestras en cada grupo.

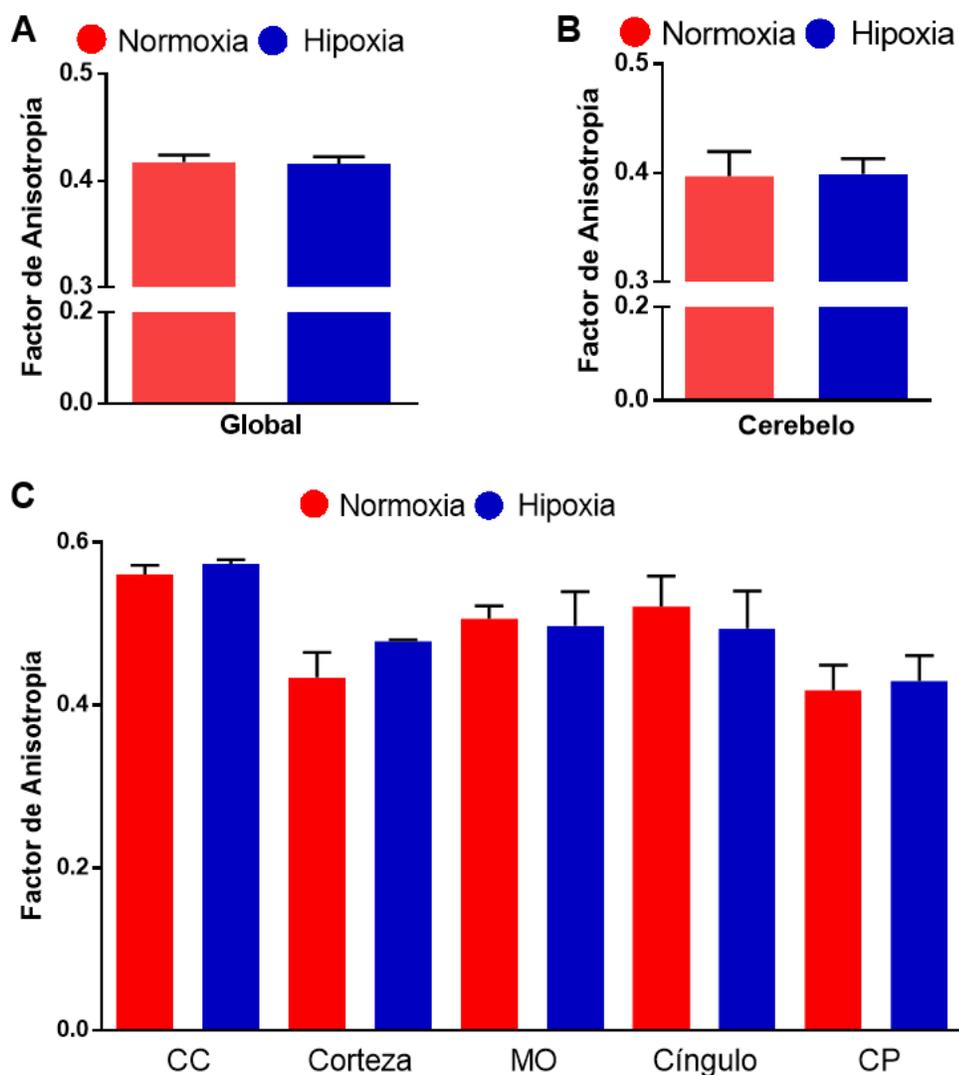


Figura 18. Índice de la fracción de anisotropía (FA) en etapa p33. Se calculó la FA a través de las imágenes obtenidas por resonancia magnética. Comparación de FA entre animales normóxicos

e hipóxicos en etapa p33. De manera general, no se observa diferencias significativas en el factor de anisotropía en los animales bajo condiciones hipóxicas, tanto en el análisis global como en estructuras individuales respecto al grupo de animales normóxicos. Cuerpo calloso (CC), miembro olfativo (MO) y caudoputamen (CP). Con $n=3$ para cada caso. Las gráficas son presentadas como la media \pm error estándar.

Por otro lado, dado que FA se ha correlacionado no sólo con alteraciones en la mielinización sino con daños axonales (Song et al. 2005, 2003), se evaluaron entonces dos parámetros conocidos como difusividades radial (D_{Radial}) y axial (D_{Axial}). La D_{Radial} está correlacionada con cambios o alteraciones en la mielina, en donde daños desmielinizantes, por ejemplo, promueven un aumento de este parámetro (Cisneros-Mejorado et al. 2019; Budde et al. 2011).

Por su parte, la D_{Axial} está correlacionada con alteraciones en los axones neuronales (Kumar et al. 2009; Laitinen et al. 2015, 2010).

De este modo, se encontró que la D_{Radial} aumenta significativamente en los animales expuestos a hipoxia ($3.3 \times 10^{-4} \pm 1.09 \times 10^{-5}$) respecto de los animales normóxicos ($5.62 \times 10^{-4} \pm 1.06 \times 10^{-5}$), cuando se analizaron a p24, sugiriendo una alteración en la mielinización. Además, aumentó D_{Radial} en la corteza y el cerebelo, mientras que, las demás estructuras no mostraron cambios significativos. Al observar la D_{Axial} se encontró que ésta disminuye únicamente en el miembro olfativo de los animales hipóxicos ($0.00119 \pm 3.10 \times 10^{-5}$) con respecto a los normóxicos ($0.00127 \pm 3.99 \times 10^{-6}$), lo que hace pensar que los cambios en FA en esta estructura son primordialmente debidos a alteraciones axonales a p24 (Fig. 19).

De nueva cuenta, en la evaluación de estas métricas, como con FA, no se mostraron cambios significativos en ninguna estructura a edad p33, lo que sugiere, como en la evaluación histológica, una recuperación del daño hipomielinizante promovido por la hipoxia (Fig. 20).

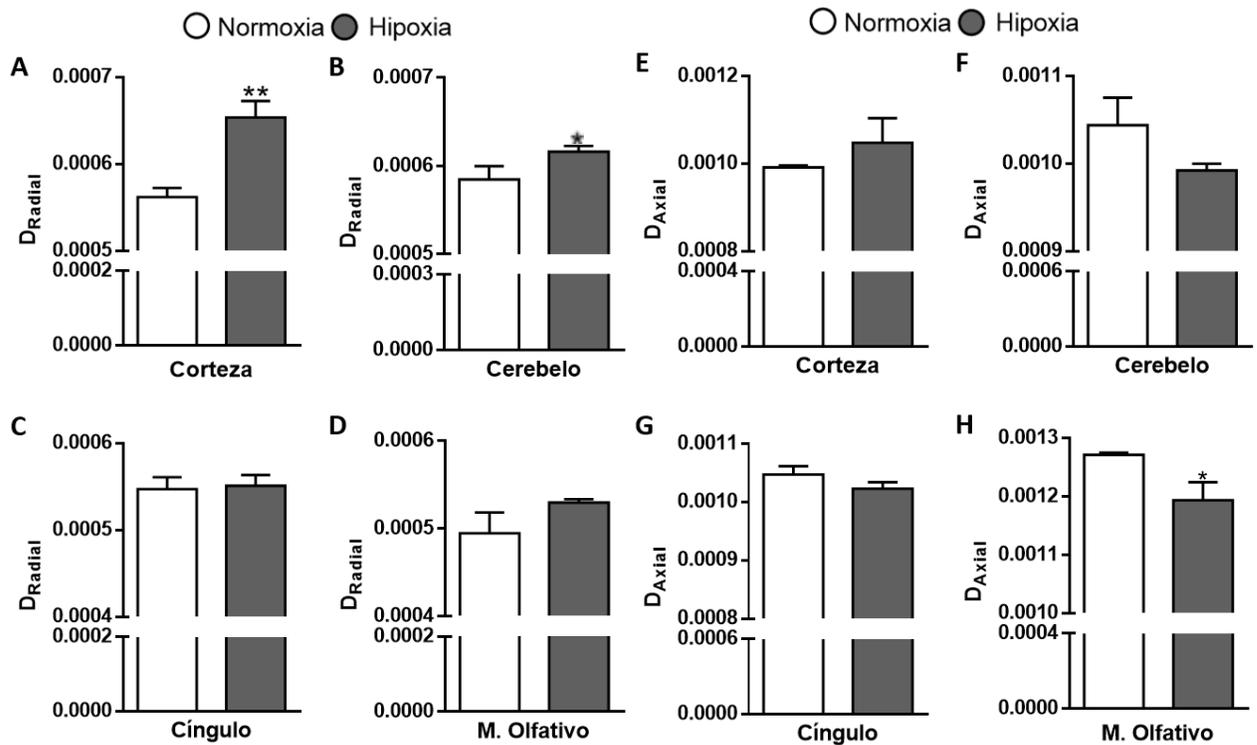


Figura 19. Difusividades radial y axial en p24. A-D muestran la comparativa entre los valores obtenidos para la D_{Radial} de ambos grupos experimentales de algunas estructuras respectivamente, donde se encuentra un incremento en los valores de la corteza cerebral y el cerebelo del grupo hipóxico. En E-H se muestran los valores de la D_{Axial} de las mismas estructuras, reflejando un decremento en los valores del miembro olfativo. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ $n \geq 3$ para cada caso. Las gráficas son presentadas como la media \pm error estándar.

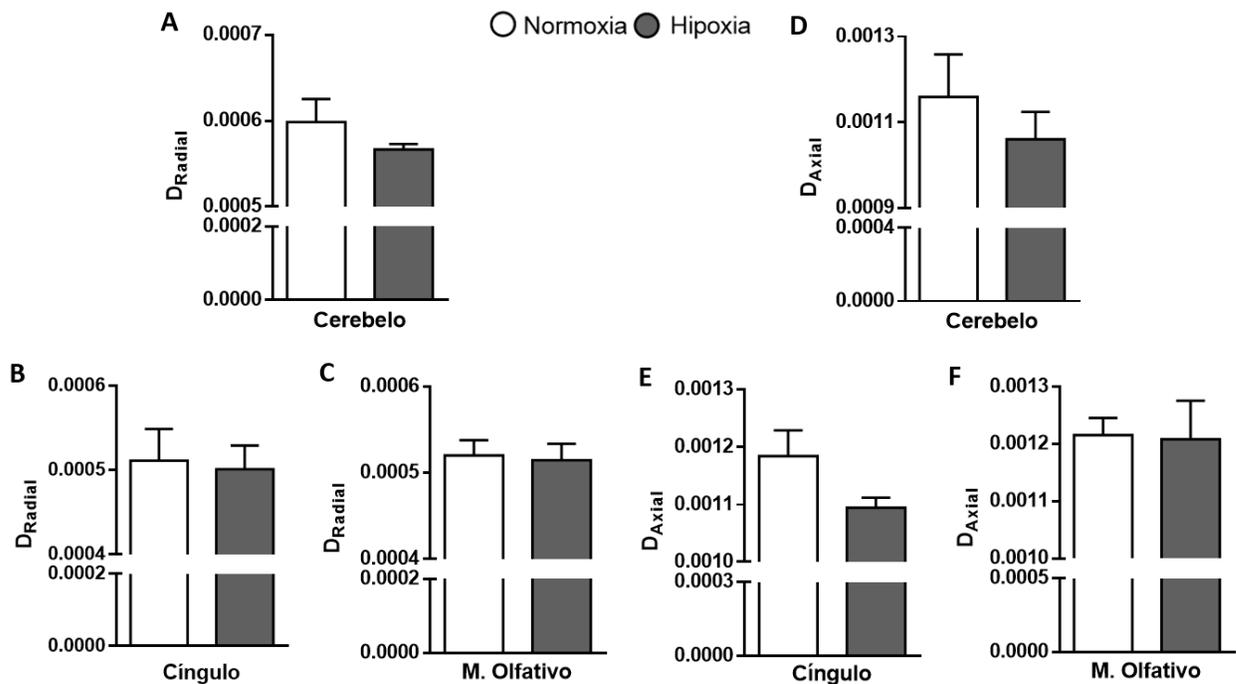


Figura 20. Difusividades radial y axial en p33. A-C muestra la comparativa entre los valores obtenidos para la D_{Radial} de ambos grupos experimentales de algunas estructuras respectivamente. En D-F se muestran los valores de la D_{Axial} de las mismas estructuras. No existen diferencias entre los grupos en ninguno de los valores y estructuras analizadas. $n \geq 3$ para cada caso. Las gráficas son presentadas como la media \pm error estándar.

7.3. La hipoxia promueve alteraciones en la motricidad

Finalmente, se realizó un análisis de motricidad a distintas etapas del desarrollo (p14, p24 y p33). Al principio, se exploró si una exposición aguda a la hipoxia promueve alteraciones funcionales en este análisis, de este modo, un primer tratamiento hipóxico fue hecho durante 6 horas en 1 día solamente, es decir en p3; enseguida se evaluó la motricidad en las edades posteriores mencionadas. Bajo este tratamiento hipóxico agudo, se cuantificó el tiempo que les tomó recorrer un pasillo de 20 cm. En la figura 21 se muestran gráficas del tiempo (Fig. 21A) tanto para el grupo control como para el grupo hipóxico. Además, se muestra la gráfica de la velocidad (Fig. 21B).

La hipoxia induce una disminución en la velocidad de cruce del pasillo horizontal en los animales hipóxicos tanto en p24 (0.095 ± 0.0071 m/s) como en p33 (0.088 ± 0.0083 m/s), comparados con animales controles (p24= 0.12 ± 0.0079 y p33= 0.12 ± 0.0086 m/s). Lo anterior es reflejo del mayor tiempo requerido en cruzar el pasillo, por parte de los animales sometidos a hipoxia.

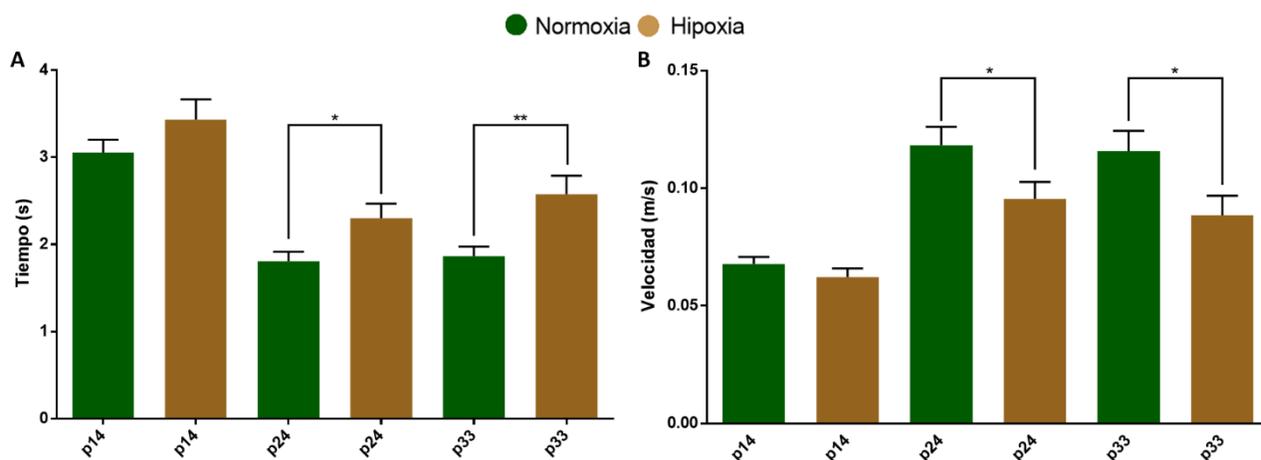


Figura 21. Análisis de la motricidad con 1 sesión (6h/1d). Gráficas comparativas del tiempo (A) y velocidad (B) de los animales control contra los animales bajo tratamiento hipóxico a diferentes etapas del desarrollo, p14, p24 y p33. *P<0.05, **P<0.01. Prueba t-Student desapareada de dos colas; n=3. Las gráficas son presentadas como la media \pm error estándar.

Posteriormente, se realizó esta cuantificación en condiciones crónicas de hipoxia, como en las metodologías anteriores, esto es, hipoxia de 6 horas durante 5 días (desde p3 a p7). En contraste con los animales expuestos a hipoxia aguda, en estos experimentos, los animales expuestos a hipoxia crónica mostraron una diferencia a los animales normóxicos desde p14 (Fig. 22), respecto a la velocidad de cruce del pasillo (Normoxia= 0.052 ± 0.0029 m/s vs. Hipoxia= 0.066 ± 0.0031 m/s). También en p24 y p33 existen diferencias significativas entre los animales controles (p24= 0.1532 ± 0.0094 y p33= 0.1263 ± 0.0095 m/s, respectivamente) y los expuestos a hipoxia (p24= 0.0887 ± 0.0050 y p33= 0.0796 ± 0.0044 m/s, respectivamente). Lo anterior sugiere que, una exposición crónica a atmósfera

hipóxica (que se consigue al aumentar el número de sesiones) si bien no tiene un aumento en el efecto a la motricidad, sí provoca que el efecto que provoca la hipoxia en la motricidad se presente en etapas más tempranas.

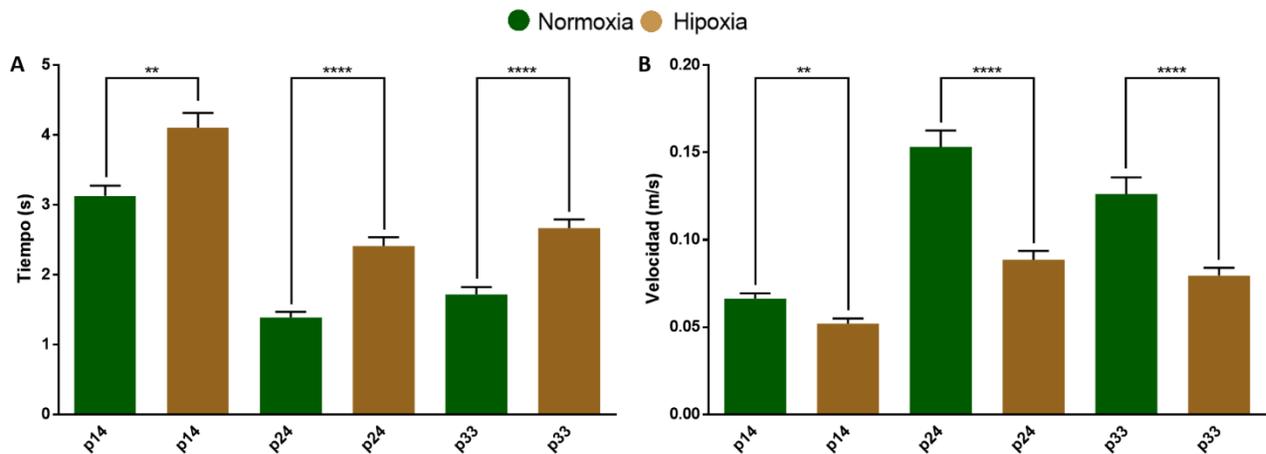


Figura 22. Análisis de motricidad 5 sesiones (6h/5d). Gráficas comparativas del tiempo (A) y velocidad (B) de los animales control contra los animales bajo tratamiento hipóxico a diferentes etapas del desarrollo (p14, p24 y p33). ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$; Prueba t-Student desapareada de dos colas; $n \geq 3$ para cada caso. Las gráficas son presentadas como la media \pm error estándar.

8. DISCUSIÓN

Los bebés que nacen prematuramente (23–32 semanas de gestación) tienen un alto riesgo de desarrollar lesión difusa de sustancia blanca (LDSB), que a menudo está relacionada con la hipoxia crónica (Anjari et al. 2009; Back 2006). Los mecanismos complejos y las consecuencias funcionales en las alteraciones de la mielinización de estos eventos dañinos en el SNC aún no se han entendido completamente; por lo tanto, los modelos animales se han vuelto útiles para investigar los mecanismos subyacentes de estos procesos.

En este trabajo, usando un modelo de ratón *in vivo*, se implementó un modelo de hipoxia neonatal crónica, y se observó que éste promueve alteraciones en la mielinización; esto se infirió midiendo la densidad óptica mediante un análisis histológico con la técnica de BGII. Numerosos estudios apoyan una correlación directa entre la intensidad de la tinción (de rojo a marrón) usando BGII y el contenido de mielina (Chen et al. 2004; Schmued et al. 2008; Hakkarainen et al. 2016; Holleran et al. 2017; Yeh et al. 2017), de este modo, se sugiere que la disminución observada en la tinción con BGII en el grupo sometido a hipoxia indica una posible disminución en la mielina. Similar a otros estudios con estrategias similares (Zonouzi et al. 2015), fue posible observar características de hipomielinización en diversas estructuras del SNC. Además, de manera interesante se observó que, a excepción del cuerpo calloso, la mayoría de estructuras analizadas en una etapa posterior al daño hipóxico (p33) no muestran cambios significativos en la tinción con BGII, lo que sugiere una recuperación a este tiempo post hipoxia, hallazgos que concuerdan con estudios previos (Zonouzi et al. 2015). Es importante mencionar que para establecer una correlación directa entre las observaciones histológicas y la morfología de la mielina en las distintas estructuras, es necesario hacer una evaluación mediante ultraestructura (microscopía electrónica), por lo que este modelo permite además ampliar las investigaciones a futuro, generando así mayor conocimiento en el contexto de la mielinización en diferentes contextos de daño y la posible recuperación o reparación.

Un objetivo clave para el desarrollo de los modelos animales como el que se utiliza aquí, es encontrar estrategias para promover la posible modulación farmacológica y eventualmente probar la posible reparación de los daños en el SNC. Es así que los estudios longitudinales, para monitorear los fenómenos de la hipomielinización, son de interés para evaluar esos efectos potenciales de nuevas estrategias farmacológicas.

En este estudio, utilizamos resonancia magnética para cuantificar anomalías en el modelo de hipoxia y correlacionar cualitativamente estas medidas con alteraciones histológicas utilizando la técnica BGII. Aplicamos técnicas de análisis de difusión por resonancia magnética en una manera longitudinal, lo que ofrece información detallada sobre la microestructura del cerebro. Estructuras como la corteza cerebral, el cíngulo, el cerebelo, entre otros, son especialmente adecuadas para esta tarea porque el análisis es más robusto en tractos mielinizados que carecen de cruces o caminos entrelazados.

Nuestro objetivo principal fue explorar si los cambios observados después de la hipoxia podrían monitorearse usando técnicas de análisis de imágenes. Dado que el análisis de DTI proporciona información sobre la microestructura de la materia blanca en condiciones normales o patológicas (p. ej. Cisneros-Mejorado et al. 2019; Concha et al. 2006; Song et al. 2003, 2005), se decidió evaluar éste a través del cálculo del índice de FA, este parámetro refleja la organización microscópica coherente de los axones. Por lo tanto, ya que una disminución de FA se correlaciona con la materia blanca lesionada, podría existir tanto una disminución en el contenido de mielina como un aumento del daño axonal (Song et al. 2002, 2003; Kumar et al. 2009). En este trabajo, observamos disminución del índice de FA en distintas estructuras (principalmente la corteza cerebral, el cerebelo, el cíngulo y el miembro olfativo) en animales sometidos a hipoxia previamente. Como con la evaluación histológica, a edades más avanzadas (p33) los valores de FA son muy similares a las condiciones normóxicas, lo cual sugiere una reparación de la mielinización, como se ha mostrado en otros estudios (Zonouzi et al. 2015). Ahora bien, dado que disminuciones de FA no puede correlacionarse directamente con una disminución en la mielinización, se decidió seccionar este parámetro en un análisis de otros dos, conocidos como

difusividades (D_{Axial} y D_{Radial}), en el intento de discernir si el daño hipóxico era mediado por hipomielinización o posiblemente alteraciones axonales. La D_{Radial} aumenta, principalmente en la corteza y cerebelo, en los animales hipóxicos, lo cual sugiere disminución en el conteo mielínico (Song et al. 2003; Cisneros-Mejorado et al. 2019), mientras que permanece invariable en el resto de estructuras. Al mismo tiempo, la D_{Axial} disminuye significativamente en el miembro olfativo, lo que sugiere un daño axonal inducido por la hipoxia, mientras que en el resto de estructuras no cambia; indicando así que la estructura mayormente hipomielinizada es el cerebelo, mientras que el miembro olfativo se ve dañado incluso a nivel axonal.

Por su parte, encontramos que existen cambios motrices a largo plazo. Monitoreando el patrón motriz de ratones expuestos a hipoxia crónica, se encontró que la velocidad de los ratones hipóxicos, al cruzar por pasillo horizontal, es menor, lo cual es reflejo del mayor tiempo de cruce, comparado con animales controles. Cabe destacar que en el caso de las pruebas de motricidad los resultados no se invierten en la edad p33. Una posible explicación a estos resultados, es que a pesar de haber recuperación en la cantidad de mielina en las distintas estructuras, el hecho de ver retrasado el proceso normal de mielinización podría repercutir en el establecimiento de la circuitería involucrada en estos procesos y que en condiciones normales se establecen y permiten el funcionamiento pleno del mismo. Pudiendo ser alteraciones en los tractos de los circuitos o incluso que no exista el circuito en estos animales.

En resumen, estos resultados sugieren fuertemente que el modelo de hipoxia implementado en este trabajo, induce cambios desde nivel celular y hasta nivel de organismo completo de la mielinización en el SNC. Como modelo de LDSB, ciertamente evidencia una posible hipomielinización, la que eventualmente conlleva a cambios microestructurales, que pueden ser monitoreados histológicamente con BGII e *in vivo* mediante IRM, y también cambios en la motricidad, que finalmente son el reflejo del déficit en la mielina. Estos hallazgos abren líneas de investigación para abundar sobre el papel del células específicas en el proceso de mielinización, como el linaje oligodendroglial, así

como la investigación de la posible modulación farmacológica de receptores en este linaje celular, con la intención de una promoción en la mielinización posterior a un daño hipóxico.

Las perspectivas de este trabajo, además de lo mencionado previamente, abren la posibilidad de estudiar los cambios morfológicos en la mielinización a través de estudios de ultraestructura, para vincular directamente los resultados plasmados en este trabajo con parámetros de medidas directas sobre la mielina en distintos contextos, normales y ante hipoxia. Además, con una correlación directa entre morfología, histología e imagenología, análisis de la funcionalidad receptores oligodendrogiales, protagonistas en la mielinización, sería también un siguiente paso para delatar la implicación de estos receptores en ambos contextos.

9. CONCLUSIONES

La exposición a hipoxia, mediante una cámara de gases con sólo 5% O₂, promueve alteraciones en la mielina de diferentes estructuras, esto se sugiere midiendo la DO de cortes teñidos con BGII, en donde se observa que la hipoxia tiene un efecto que reduce hasta en el 40% de esta tinción en el grupo de animales expuestos (p7) que es revertida en edad más avanzada (p33).

Adicionalmente, mediante exploración por IRM, se encontró un menor índice en la fracción de anisotropía en animales hipóxicos, de manera global. Particularmente, estructuras como la corteza cerebral, el miembro olfativo o el cíngulo, se ven comprometidas en este evento de hipoxia. Lo anterior sugiere que estas zonas contienen menos fibras mielinizadas. De manera interesante, se observó que no hubo diferencia en el índice de la FA entre los grupos de animales control y los del grupo hipóxico de 6h/5d en p33. Resultados de cortes coronales de cerebros p33, tanto normóxicos como hipóxicos, teñidos con BGII con la posterior cuantificación de la DO, acompañan los resultados obtenidos mediante el FA e indican que no presentan diferencia en el patrón de mielinización. Esto podría deberse a que el grupo de animales expuestos, desarrollaron tolerancia a condiciones hipóxicas. Se requieren otra serie de experimentos que nos permitan dilucidar el mecanismo que subyace en este fenómeno.

Mediante el análisis de la difusión axial y radial, se encontró que a p24 existe degeneración axonal en el miembro olfativo. Además, se hipotetiza una disminución en la cantidad de mielina en la corteza cerebral y en el cerebelo.

También, existen cambios en la motricidad a largo plazo. Monitoreando el patrón motriz de ratones expuestos a 6h/1d o a 6h/5d, se encontró que la velocidad de los ratones hipóxicos, al cruzar por pasillo horizontal, es menor en ambos escenarios, lo cual es reflejo del mayor tiempo de cruce, comparado con animales controles.

Estos resultados, sugiere que el modelo de hipoxia implementado en este trabajo, induce cambios desde nivel celular y hasta nivel de organismo completo, de la mielinización en el SNC. Finalmente, como se mencionó antes, el modelo es propicio de usarse para la evaluación de la participación de la señalización GABAérgica en los procesos de mielinización, en particular en procesos de hipomielinización, y ahondar sobre la participación del linaje oligodendroglial, mediante el uso de herramientas farmacológicas en este modelo.

10. LITERATURA CITADA

- Anjari, Mustafa, Serena J. Counsell, Latha Srinivasan, Joanna M. Allsop, Joseph V. Hajnal, Mary A. Rutherford, and A. David Edwards. 2009. "The Association of Lung Disease with Cerebral White Matter Abnormalities in Preterm Infants." *Pediatrics* 124 (1): 268–76. <https://doi.org/10.1542/peds.2008-1294>.
- Arancibia-Carcamo, I. Lorena, and David Attwell. 2014. "The Node of Ranvier in CNS Pathology," 161–75. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1305-z>.
- Araque, Alfonso, and Marta Navarrete. 2010. "Glial Cells in Neuronal Network Function," 2375–81. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0313>.
- Arellano, Rogelio O, María Victoria Sánchez-Gómez, Elena Alberdi, Manuel Canedo-Antelo, Juan Carlos Chara, Aitor Palomino, Alberto Pérez-Samartín, and Carlos Matute. 2016. "Axon-to-Glia Interaction Regulates GABAA Receptor Expression in Oligodendrocytes." *Molecular Pharmacology* 89 (1): 63–74. <https://doi.org/10.1124/mol.115.100594>.
- Back, Stephen A. 2006. "PERINATAL WHITE MATTER INJURY:THE CHANGING SPECTRUM OF PATHOLOGY AND EMERGING INSIGHTS INTO PATHOGENETIC MECHANISMS." *MENTAL RETARDATION AND DEVELOPMENTAL DISABILITIES* 287 (12): 129–40. <https://doi.org/10.1002/mrdd.20107>.
- Baumann, Nicole, and Danielle Pham-Dinh. 2001. "Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System." *Physiological Reviews* 81 (2): 871–927. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2009.02340.x>.
- Bettler, Bernhard, Klemens Kaupmann, Johannes Mosbacher, Martin Gassmann, and Molecular Structure. 2004. "Molecular Structure and Physiological Functions of GABA B Receptors." *Fisiol Rev* 84: 835–67. <https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2003>.

- Blankenfeld, G. von, J. Trotter, and H. Kettenmann. 1991. "Expression and Developmental Regulation of a GABAA Receptor in Cultured Murine Cells of the Oligodendrocyte Lineage." *European Journal of Neuroscience* 3 (4): 310–16. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1991.tb00817.x>.
- Bormann, Joachim. 2000. "The ' ABC ' of GABA Receptors" 21 (January): 151–53.
- Brodal, Per. 2016. *The Central Nervous System*. Fifth. Oxford University Press.
- Budde, Matthew D., Lindsay Janes, Eric Gold, Lisa Christine Turtzo, and Joseph A. Frank. 2011. "The Contribution of Gliosis to Diffusion Tensor Anisotropy and Tractography Following Traumatic Brain Injury: Validation in the Rat Using Fourier Analysis of Stained Tissue Sections." *Brain* 134 (8): 2248–60. <https://doi.org/10.1093/brain/awr161>.
- Butt, Arthur M. 2006. "Neurotransmitter-Mediated Calcium Signalling in Oligodendrocyte Physiology and Pathology." *Glia* 54 (7): 666–75. <https://doi.org/10.1002/glia.20424>.
- Campo-Soria, Claudia, Yongchang Chang, and David S. Weiss. 2006. "Mechanism of Action of Benzodiazepines on GABA A Receptors." *British Journal of Pharmacology* 148 (7): 984–90. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706796>.
- Chen, Ming Kai, Kwamena Baidoo, Tatyana Verina, and Tomás R. Guilarte. 2004. "Peripheral Benzodiazepine Receptor Imaging in CNS Demyelination: Functional Implications of Anatomical and Cellular Localization." *Brain* 127 (6): 1379–92. <https://doi.org/10.1093/brain/awh161>.
- Cisneros-Mejorado, Abraham J., Edith Garay, Juan Ortiz-Retana, Luis Concha, Juan P. Moctezuma, Samuel Romero, and Rogelio O. Arellano. 2019. "Demyelination–Remyelination of the Rat Caudal Cerebellar Peduncle Evaluated with Magnetic Resonance Imaging." *Neuroscience*, July. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2019.06.042>.

- Concha, Luis, Donald W. Gross, B. Matt Wheatley, and Christian Beaulieu. 2006. "Diffusion Tensor Imaging of Time-Dependent Axonal and Myelin Degradation after Corpus Callosotomy in Epilepsy Patients." *NeuroImage* 32 (3): 1090–99. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.04.187>.
- Fields, R Douglas. 2015. "A New Mechanism of Nervous System Plasticity : Activity-Dependent Myelination." *Nature Publishing Group* 16 (12): 756–67. <https://doi.org/10.1038/nrn4023>.
- Hakkarainen, Hanne, Alejandra Sierra, Silvia Mangia, Michael Garwood, Shalom Michaeli, Olli Gröhn, and Timo Liimatainen. 2016. "MRI Relaxation in the Presence of Fictitious Fields Correlates with Myelin Content in Normal Rat Brain." *Magnetic Resonance in Medicine* 75 (1): 161–68. <https://doi.org/10.1002/mrm.25590>.
- Holleran, Laurena, Joong Hee Kim, Mihika Gangolli, Thor Stein, Victor Alvarez, Ann McKee, and David L. Brody. 2017. "Axonal Disruption in White Matter Underlying Cortical Sulcus Tau Pathology in Chronic Traumatic Encephalopathy." *Acta Neuropathologica* 133 (3): 367–80. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1686-x>.
- Jablonska, B., J. Scafidi, A. Aguirre, F. Vaccarino, V. Nguyen, E. Borok, T. L. Horvath, D. H. Rowitch, and V. Gallo. 2012. "Oligodendrocyte Regeneration after Neonatal Hypoxia Requires FoxO1-Mediated P27Kip1 Expression." *Journal of Neuroscience* 32 (42): 14775–93. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2060-12.2012>.
- Kandel Eric , Schwartz James , Jessell Thomas, Siegelbaum Steven, Hudspeth A.j. 2013. *Principles of Neural Science*.
- Kim, MinGi, Ji Hea Yu, Jung Hwa Seo, Yoon-Kyum Shin, Soohyun Wi, Ahreum Baek, Suk-Young Song, and Sung-Rae Cho. 2017. "Neurobehavioral

Assessments in a Mouse Model of Neonatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury.” *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, no. 129: 2–7.
<https://doi.org/10.3791/55838>.

Kumar, Raj, Mazhar Husain, Rakesh K. Gupta, Khader M. Hasan, Mohammad Haris, Atul K. Agarwal, C. M. Pandey, and Ponnada A. Narayana. 2009. “Serial Changes in the White Matter Diffusion Tensor Imaging Metrics in Moderate Traumatic Brain Injury and Correlation with Neuro-Cognitive Function.” *Journal of Neurotrauma* 26 (4): 481–95.
<https://doi.org/10.1089/neu.2008.0461>.

Laitinen, Teemu, Alejandra Sierra, Asla Pitkänen, and Olli Gröhn. 2010. “Diffusion Tensor MRI of Axonal Plasticity in the Rat Hippocampus.” *NeuroImage* 51 (2): 521–30. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.02.077>.

Laitinen, Teemu, Alejandra Sierra López, Tamuna Bolkvadze, Asla Pitkänen, and Olli Gröhn. 2015. “Diffusion Tensor Imaging Detects Chronic Microstructural Changes in White and Grey Matter after Traumatic Brain Injury in Rat.” *Frontiers in Neuroscience* 9 (MAR): 1–12.
<https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00128>.

Lee, Philip R, and R Douglas Fields. 2009. “Regulation of Myelin Genes Implicated in Psychiatric Disorders by Functional Activity in Axons.” *Frontiers in Neuroanatomy* 3 (June): 4. <https://doi.org/10.3389/neuro.05.004.2009>.

Lunn, K F, P W Baas, and I D Duncan. 1997. “Microtubule Organization and Stability in the Oligodendrocyte.” *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 17 (13): 4921–32.

McTigue, Dana M., and Richa B. Tripathi. 2008. “The Life, Death, and Replacement of Oligodendrocytes in the Adult CNS.” *Journal of Neurochemistry* 107 (1): 1–19. <https://doi.org/10.1111/j.1471->

4159.2008.05570.x.

Mohammad, Abdullah, Joseph Olusegun, and Mohammed Umaru. 2016.

“Pathophysiology Regulation of Oligodendrocyte Differentiation : Insights and Approaches for the Management of Neurodegenerative Disease.”

Pathophysiology 23 (3): 203–10.

<https://doi.org/10.1016/j.pathophys.2016.05.007>.

Petroski, Robert E., Jordan E. Pomeroy, Ronnie Das, Heath Bowman, Weidong

Yang, Adele P. Chen, and Alan C. Foster. 2006. “Indiplon Is a High-Affinity Positive Allosteric Modulator with Selectivity for A1 Subunit-Containing

GABAA Receptors.” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*

317 (1): 369–77. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.096701>.

Radhakrishnan, Harsha, Weicheng Wu, David Boas, and Maria A. Franceschini.

2011. “Study of Neurovascular Coupling by Modulating Neuronal Activity with

GABA,” 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.11.082>.

Rigo, J-M, G Hans, L Nguyen, V Rocher, S Belachew, B Malgrange, P Leprince, et

al. 2002. “The Anti-Epileptic Drug Levetiracetam Reverses the Inhibition by Negative Allosteric Modulators of Neuronal GABA- and Glycine-Gated

Currents.” *British Journal of Pharmacology* 136 (5): 659–72.

<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704766>.

Schmued, Larry, John Bowyer, Matthew Cozart, David Heard, Zbigniew Binienda,

and Merle Paule. 2008. “Introducing Black-Gold II, a Highly Soluble Gold Phosphate Complex with Several Unique Advantages for the Histochemical

Localization of Myelin.” *Brain Research* 1229: 210–17.

<https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.06.129>.

Simons, Mikael, and Klaus Armin Nave. 2016. “Oligodendrocytes: Myelination and

Axonal Support.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (1): 1–16.

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020479>.

Song, Sheng Kwei, Shu Wei Sun, Won Kyu Ju, Shioh Jiuan Lin, Anne H. Cross, and Arthur H. Neufeld. 2003. "Diffusion Tensor Imaging Detects and Differentiates Axon and Myelin Degeneration in Mouse Optic Nerve after Retinal Ischemia." *NeuroImage* 20 (3): 1714–22. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2003.07.005>.

Song, Sheng Kwei, Shu Wei Sun, Michael J. Ramsbottom, Chen Chang, John Russell, and Anne H. Cross. 2002. "Dysmyelination Revealed through MRI as Increased Radial (but Unchanged Axial) Diffusion of Water." *NeuroImage* 17 (3): 1429–36. <https://doi.org/10.1006/nimg.2002.1267>.

Song, Sheng Kwei, Jun Yoshino, Tuan Q. Le, Shioh Jiuan Lin, Shu Wei Sun, Anne H. Cross, and Regina C. Armstrong. 2005. "Demyelination Increases Radial Diffusivity in Corpus Callosum of Mouse Brain." *NeuroImage* 26 (1): 132–40. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2005.01.028>.

Vélez-Fort, Mateo, Etienne Audinat, and María Cecilia Angulo. 2012. "Central Role of GABA in Neuron–Glia Interactions." *The Neuroscientist* 18 (3): 237–50. <https://doi.org/10.1177/1073858411403317>.

Volpe, Joseph J. 2001. "Neurobiology of Periventricular Leukomalacia in the Premature Infant." *Pediatric Research* 50 (5): 553–62. <https://doi.org/10.1203>.

Volpe, Joseph J, Hannah C Kinney, Frances E Jensen, and Paul A Rosenberg. 2011. "The Developing Oligodendrocyte: Key Cellular Target in Brain Injury in the Premature Infant." *International Journal of Developmental Neuroscience* 29 (4): 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2011.02.012>.

Yeh, Tzu Yin, Shang Ming Wang, Guo Fang Tseng, and Pei Hsin Liu. 2017. "Differential Regulation of Glial Reactions in the Central Facial Tract and the Facial Nucleus after Facial Neurorrhaphy." *Journal of Chemical Neuroanatomy*

79: 38–50. <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2016.11.005>.

Zatorre, Robert J, R.D Fields, and Heidi Johansen-Berg. 2013. “Plasticity in Gray and White : Neuroimaging Changes in Brain Structure during Learning.” *Nature Neuroscience* 15 (4): 528–36.
<https://doi.org/10.1038/nn.3045>.Plasticity.

Zhang, Sophia H, Galina V Shurin, Hasan Khosravi, Rashek Kazi, Oleg Kruglov, Michael R Shurin, and Yuri L Bunimovich. 2019. “Immunomodulation by Schwann Cells in Disease.” *Cancer Immunology, Immunotherapy*, no. 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02424-7>.

Zhu, X., D. E. Bergles, and A. Nishiyama. 2007. “NG2 Cells Generate Both Oligodendrocytes and Gray Matter Astrocytes.” *Development* 135 (1): 145–57.
<https://doi.org/10.1242/dev.004895>.

Zonouzi, Marzieh, Joseph Scafidi, Peijun Li, Brian McEllin, Jorge Edwards, Jeffrey L Dupree, Lloyd Harvey, et al. 2015. “GABAergic Regulation of Cerebellar NG2 Cell Development Is Altered in Perinatal White Matter Injury.” *Nature Neuroscience* 18 (5): 674–82. <https://doi.org/10.1038/nn.3990>.

Hic, non omnia finit, est initium.