



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM, CAMPUS JURQUILLA

ALTERACIONES EN EL PROCESO DE MIELINIZACIÓN EN LA ETAPA POSTNATAL EN RATONES KNOCKOUT DEL RECEPTOR A PROLACTINA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

LIC. MARCO ANTONIO DIMAS RUFINO

TUTORES:

DRA. YAZMÍN MACOTELA GUZMÁN
DR. ABRAHAM JOTSEL CISNEROS MEJORADO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. TERESA MORALES GUZMÁN
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA
DRA. PENÉLOPE AGUILERA HERNÁNDEZ
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA

UNAM Campus Juriquilla, Querétaro, Diciembre 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN

Dra. Aurea Orozco Rivas Presidente

Dr. Abraham J. Cisneros Mejorado Secretario

Dra. Laura Cristina Berumen Segura Vocal

Dra. María Teresa Morales Guzmán Suplente

Dr. Sarael 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 de la Dra. Yazmín Macotela Guzmán, el Dr. Abraham J. Cisneros Mejorado y el Dr. Rogelio Arellano Ostoá. Becario CONACYT No. 858743. Además, contó con los financiamientos PAPIIT-DGAPA-UNAM IN209518 a YM, e IN203519 y CONACYT 252121 a RA.

RESUMEN

Las funciones del sistema nervioso central (SNC) requieren del proceso de mielinización llevada a cabo por los oligodendrocitos (OLs). La mielinización en mamíferos comienza y es muy importante en el periodo postnatal, alcanzando un pico en el proceso durante el día 12 posnatal (p12) en roedores. Entre los múltiples factores reguladores de la mielinización, se encuentra la prolactina (PRL), hormona peptídica secretada por las células lactotropas de la hipófisis anterior que ejerce efectos pleiotrópicos. En el SNC, se ha mostrado que la PRL promueve la proliferación y la maduración de los OL durante el embarazo. Sin embargo, se desconoce si la PRL está involucrada en la mielinización del SNC durante el desarrollo postnatal. Para explorar esta posibilidad, se analizó la mielinización en ratones p12 tanto silvestres como nulos (knockout) para el receptor de PRL ($PrIr^{+/+}$ y $PrIr^{-/-}$, respectivamente). Primero, utilizando tinción de violeta de cresilo, se observó una disminución del 40% en el volumen del cuerpo calloso (c.c.), una estructura con una densidad elevada de fibras mielinizadas, en los animales $PrIr^{-/-}$ en comparación con los ratones $PrIr^{+/+}$. También, mediante la tinción específica para mielina Black Gold II evaluamos el grado de mielinización de las siguientes estructuras cerebrales: cuerpo calloso (c.c), fimbria y caudoputamen. Se encontró una menor área de mielinización (cerca del 50% de reducción) en el c.c, en la fimbria y en el caudoputamen de los ratones $PrIr^{-/-}$ comparado con los $PrIr^{+/+}$. Una hipomielinización también fue evidenciada por experimentos de inmunocitoquímica contra la proteína básica de la mielina (MBP), cuyos resultados confirmaron una menor cantidad de MBP en los animales $PrIr^{-/-}$ con respecto a los animales $PrIr^{+/+}$. En conjunto, nuestros resultados sugieren que la hormona PRL promueve el proceso de mielinización durante la etapa postnatal.

SUMMARY

The correct function of the central nervous system depends on myelination, a process carried out by oligodendrocytes (OLGs). In mammals, myelination starts postnatally, reaching a peak around postnatal day twelve in rodents. One of the several factors regulating myelination is prolactin, a peptidic hormone secreted by lactotrophs from the anterior hypophysis which exerts with pleiotropic effects. During pregnancy, prolactin promotes proliferation and maturation of the OLGs lineage in the central nervous system; however, it is unknown whether prolactin is also involved in the myelination process during postnatal development. To explore this possibility, myelination was analyzed in 12 days old mice wild type (Prlr^{+/+}) or knockout for the prolactin receptor (Prlr^{-/-}). Using cresyl violet, we found that the corpus callosum (c.c.), a structure with a high density of myelinated fibers, showed 40% less volume in Prlr^{-/-} mice in comparison with the same structure in Prlr^{+/+} mice. Additionally, using the myelin-specific staining Black Gold II, we found that c.c, fimbria, and caudoputamen of Prlr KO mice have around 50% less myelinated area than the same structures in Prlr^{+/+} mice. These findings were also supported by immunohistochemistry of the myelin basic protein (MBP) in brain slices, showing that Prlr^{-/-} mice express less MBP than their wildtype counterparts. Altogether, our results suggest that prolactin promotes myelination during the postnatal stage in mice.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primero a mi familia por haberme apoyado siempre en mi formación personal y profesional y darme ese privilegio de poder ir alcanzando cada una de mis metas y mis sueños.

Agradezco a las personas que fueron parte de la dirección de este proyecto, a la Dra. Yazmín Macotela Guzmán, Dr. Abraham J. Cisneros Mejorado, Dra. Teresa Edith Garay Rojas y al Dr. Rogelio Arellano Ostoá, por proporcionar los materiales y los conocimientos requeridos para llevar a cabo este trabajo.

Agradezco de manera personal al Dr. Abraham Cisneros por todo su apoyo durante este camino, ya que siempre conté con él en cualquier circunstancia y siempre me dio ese voto de confianza, además tuve el privilegio de estar trabajando codo a codo en la mayoría de experimentos realizados. Al Dr. Rogelio Arellano por aportar esos detalles tan finos para realizar un gran proyecto, por confiar y apoyar cada una de mis ideas. A la Dra. Edith Garay por tener la paciencia para enseñarme un poco de los muchos conocimientos que posee. A la Dra. Yazmín Macotela por siempre estar al pendiente de mi formación académica durante este periodo.

A los miembros del comité tutorial, a la Dra. María Teresa Morales Guzmán y la Dra. Penélope Aguilera Hernández por aportar sus conocimientos, sus críticas, su tiempo y sus comentarios y por su paciencia otorgada para desarrollar este proyecto.

A los miembros del jurado de examen, a la Dra. Aurea Orozco Rivas, a la Dra. Laura Cristina Berumen Segura, a la Dra. María Teresa Guzmán y al Dr. Sarael Alcauter Solórzano, por brindar sus conocimientos, sus comentarios y observaciones.

A mis compañeros del laboratorio D13, a Cindy Lucero García, a Antonia Colom, a Rainald Pablo Ordaz, a Juan Pablo Moctezuma y a Fidel Vélez por siempre brindarme su apoyo, por su amistad y por haber hecho mi estancia muy amena y divertida.

A Nydia Hernández por apoyarme de manera importante en la unidad de microscopia.

A la Dra. Nuri Aranda por el apoyo en todo el seguimiento y trámites realizados en la unidad de enseñanza.

A la Lic. Ma. Lourdes Lara por el apoyo en las videoconferencias y enlaces en exámenes y clases.

A la Dra. Alejandra Castilla por el apoyo otorgado en el bioterio.

A CONACYT por el apoyo económico brindado y a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme seguir creciendo en el ámbito profesional.

DEDICATORIAS

Esta tesis va dirigida a las personas que más quiero en la vida, a mis padres y a mi hermano por siempre apoyarme en todas mis decisiones a lo largo de mi existencia. Son siempre la motivación extra que siempre me saca adelante en los momentos más difíciles y complicados.

A mis amigos que me acompañaron durante este proceso en especial a Fidel por ser parte fundamental, por siempre brindarme su amistad en todas las circunstancias y siempre apoyarme en todo momento, definitivamente el camino fue mejor con su compañía.

A mi amigo el Dr. Abraham, que tuve el placer de conocerlo durante este proceso y que fungió como tutor de maestría, y que además fungió como tutor de vida, por siempre estar pendiente de mi vida académica y personal, por darme su apoyo en los momentos más difíciles, y además por siempre tener las palabras adecuadas ante cualquier situación. Definitivamente me llevo muy buenos aprendizajes de su parte y muy buenos momentos.

A las personas que formaron parte de este proceso, que me dieron de su apoyo incondicional, por compartir una parte de su vida, por motivarme a siempre salir adelante y hacerme el camino más ameno. A la persona que conocí justo antes de iniciar este proyecto de vida y que por circunstancias de la vida nos encontramos y vivimos momentos que jamás olvidare.

ÍNDICE

RESUMEN	iii
SUMMARY	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIAS	vi
Introducción	1
Antecedentes	2
1.1 Mielinización en el SNC.....	4
1.2 Prolactina en la mielinización	7
Planteamiento del problema	9
Justificación	10
Hipótesis	11
Objetivo general	11
Objetivos particulares	11
Materiales y métodos	12
Animales	12
Histología.....	13
Tinción con Black Gold II (BGII)	13
Cuantificación del área de mielinización.....	13
Tinción con violeta de cresilo para medición del volumen cerebral.	14
Perfusión.....	15
Inmunofluorescencia.....	16
Análisis de Difusión por Resonancia Magnética.....	17
Ensayo conductual, barra de equilibrio.....	19
Análisis estadístico.....	19
Resultados	20
1.1 Medición del volumen cerebral: PrIr ^{-/-} tienen un menor volumen del cc.....	20
1.2 Mielinización del SNC mediante tinción con Black Gold II (BGII)	21
1.3 La delección del receptor de PRL promueve hipomielinización	22
1.4 Inmunohistoquímica contra la proteína básica de la mielina (MBP)	26
1.5 Los ratones PrIr ^{-/-} presentan menos MBP con respecto a los PrIr ^{+/+}	27

1.6 Exploración motriz: la deficiencia de PRLR conduce a alteraciones en el equilibrio	30
1.7 Exploración mediante RM: comparación entre Prlr ^{-/-} y Prlr ^{+/+}	31
1.7.1 Difusión por Resonancia Magnética en muestras <i>ex vivo</i>	31
1.7.2 Difusión por Resonancia Magnética en modo in vivo	32
Discusión	34
Conclusiones	38
Bibliografía	39

Introducción

El sistema nervioso está constituido por varios tipos de células, dentro de las cuales se encuentran neuronas y células gliales. Las neuronas son las principales unidades de señalización del sistema nervioso, estas forman redes específicas de señalización que median conductas específicas. Mientras que las células gliales tienen diferentes funciones, dan soporte trófico y metabólico, median la respuesta inmune y facilitan la conducción de los potenciales de acción. Esta última está dada por las células de Schwann en el sistema nervioso periférico (SNP) y por los oligodendrocitos (OLs) en el sistema nervioso central (SNC).

Los OLs son las células mielinizantes del sistema nervioso central, constituyen cerca del 5 al 10% de la población glial total. Estas células producen las vainas de mielina en el SNC, importantes para la rápida y eficiente conducción de los potenciales de acción a través de los axones. Otra función importante que desempeñan los OLs, es mantener la integridad axonal. La proliferación, diferenciación y maduración de los OLs se realiza en un programa preciso y definido que involucra factores intracelulares y extracelulares, con distintas funciones en cada paso (Barateiro, Brites, & Fernandes, 2016). Dentro de estos factores extracelulares involucrados se encuentran neurotransmisores, como el ácido γ -aminobutírico (GABA) (Arellano et al., 2016), factores de crecimiento, por ejemplo el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Watzlawik, Warrington, & Rodriguez, 2013) y hormonas, como la hormona tiroidea (T3) (J. Y. Lee & Petratos, 2016) y prolactina (PRL) (Christopher Gregg, 2009), entre otros factores.

Dentro de este conjunto de factores extracelulares las hormonas desempeñan funciones importantes en la proliferación, diferenciación y maduración de los OLs, en etapas cruciales del proceso de mielinización. Tal es el caso de PRL que se ha demostrado que participa en la proliferación y maduración de OLs durante la gestación y la remielinización ante una lesión desmielinizante en la etapa adulta. Pero se desconoce la función que desempeña durante una de las etapas más importantes de la mielinización, la etapa postnatal. Etapa en la cual coincide con diferentes eventos fisiológicos del desarrollo

como la lactancia, evento en cual las crías obtienen diferentes nutrientes y hormonas a través de la leche materna, dentro de ellas PRL.

La determinación de la función de PRL en el proceso de mielinización durante la etapa postnatal es muy importante, ya que permitirá conocer los mecanismos por el cual la hormona lleva a cabo sus acciones y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en patologías asociadas a estos eventos.

Antecedentes

Las funciones motoras, sensoriales y cognitivas del sistema nervioso central (SNC) requieren de la propagación rápida del potencial de acción, misma que en vertebrados se debe a las vainas de mielina que recubren a los axones. La mielina está conformada por lípidos y proteínas de asociación, en una relación aproximada de 70% de lípidos y 30% de proteínas (Norton & Poduslo, 1973); la función principal de esta estructura es aumentar la velocidad de conducción de los potenciales de acción en los axones de las neuronas, a través de disminuir la capacitancia y aumentar la resistencia transversal de la membrana plasmática axonal. Otra característica importante de los axones mielinizados es la propagación del impulso en forma saltatoria, la cual aumenta la velocidad con la que se propaga un potencial de acción. Esta característica está dada por la formación de nodos de Ranvier, regiones de aproximadamente 1 μ m de longitud provistos con una alta densidad de canales de K⁺ y Na⁺ voltaje dependientes, mientras que las zonas recubiertas de mielina se les llama zonas internodales (figura 1) (Arancibia-Carcamo & Attwell, 2014). Además, se ha mostrado que la mielina proporciona un soporte trófico y metabólico esencial para los axones (Bercury & Macklin, 2015).

La adquisición de las vainas de mielina en los vertebrados, emergió en peces cartilagosos hace más de 500 millones de años (Zalc, Goujet, & Colman, 2008). Durante este periodo de tiempo la mayoría de constituyentes y reguladores de la mielinización se fueron reclutando de otras funciones celulares (Li & Richardson, 2008).

En el caso de algunos invertebrados y vertebrados lograron la propagación rápida del impulso nervioso aumentando el diámetro de sus axones. En estas especies solo se desarrollaron pocos axones de un diámetro gigante, los cuales eran específicos de ciertos reflejos motores. La aparición de la mielina y la función en la cual está involucrada, indica que surgió como una ventaja evolutiva en las especies para sobrevivir en un ecosistema peligroso. Por ejemplo en algunos pequeños crustáceos, como los copépodos calanoides, la mielina acelera la respuesta de escape cuando se sienten amenazados.

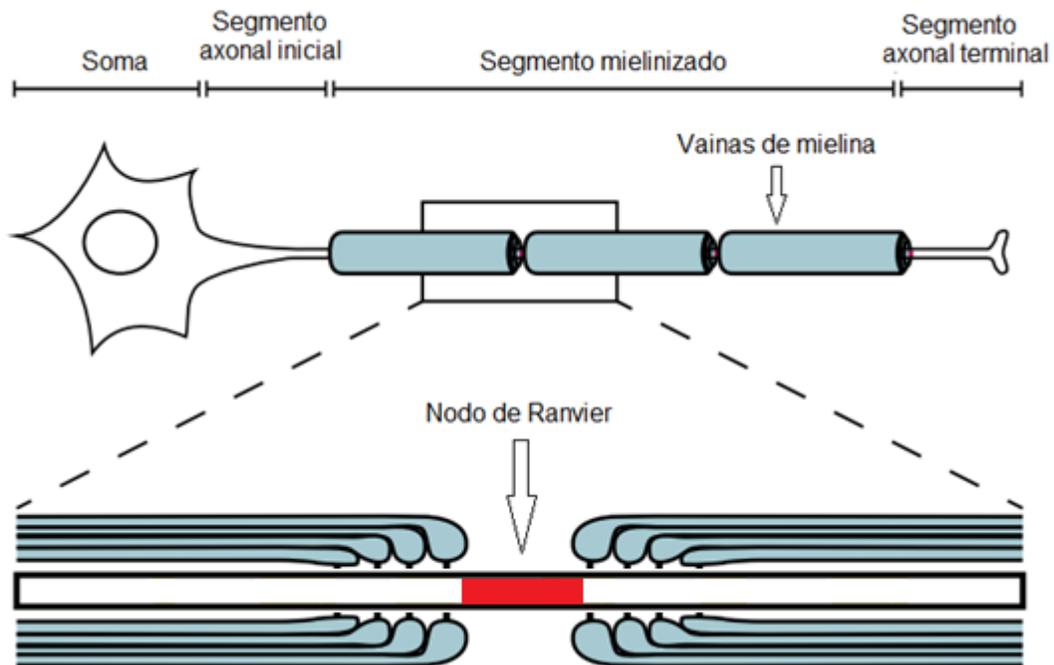


Figura 1. Esquema de la distribución de las vainas de mielina en un axón mielinizado. Representación esquemática de una neurona, cuyo axón está cubierto de mielina. La distribución comienza después del segmento axonal inicial y termina antes del segmento axonal terminal, la región donde se encuentran las vainas de mielina se le conoce como segmento mielinizado. Dentro de este segmento mielinizado se encuentran los Nodos de Ranvier, regiones no mielinizadas con una alta densidad de canales de K^+ y Na^+ voltaje dependientes (modificado de Arancibia-Carcamo & Attwell, 2014).

1.1 Mielinización en el SNC

En el SNC el proceso de mielinización de las neuronas es llevado a cabo por los oligodendrocitos (OLs). Estas células son capaces de mielinizar hasta 15 zonas internodales de un mismo axón o de diferentes axones (Eric Kandel, James Schwartz, Thomas Jessell, Steven Siegelbaum, 2013). Los OLs son el producto final de un linaje celular que debe someterse a un programa preciso y complejo de proliferación, migración, diferenciación y mielinización para finalmente producir las vainas de mielina de los axones. Su linaje oligodendroglial comienza a partir de las células progenitoras de OLs (OPCs) hasta llegar al estadio de OL mielinizante (figura 2) (Podbielska, Banik, Kurowska, & Hogan, 2013). Los OPCs se originan a partir de células de la glía radial por medio de división asimétrica durante la etapa embrionaria, en zonas germinales ventriculares (VZ) del cerebro y de la medula espinal. Posteriormente migran a través del SNC durante el desarrollo para posteriormente diferenciarse a OLs mielinizantes (Bergles & Richardson, 2016).

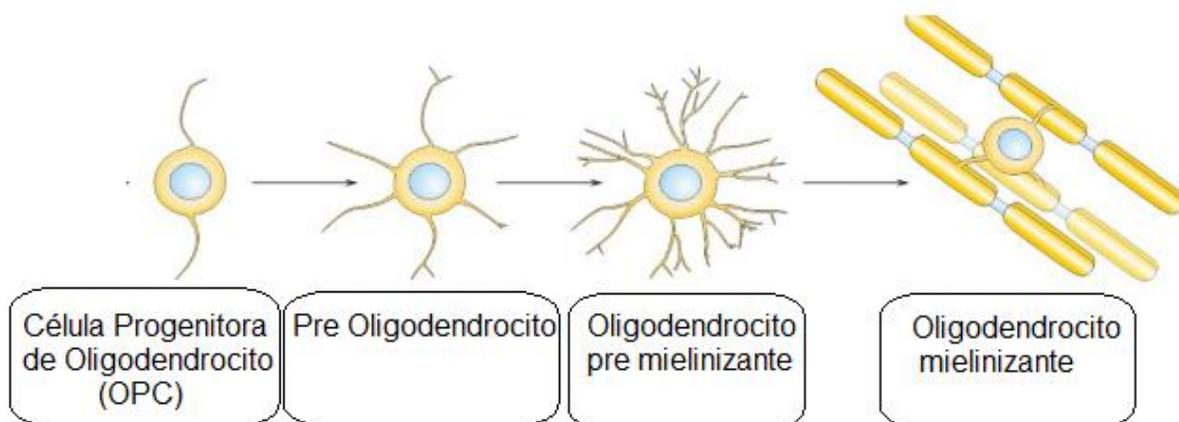


Figura 2. Estadios de maduración de los oligodendrocitos. Se observa en primer lugar a los OPCs surgidos de células de la glía radial, posteriormente estos se diferencian a pre oligodendrocitos, oligodendrocitos pre mielinizantes y finalmente a oligodendrocitos mielinizantes (modificado de Podbielska *et al.*, 2013).

La mielinización ocurre en una secuencia de eventos complejos en la cual los OLs y los axones de las neuronas establecen una relación muy importante a través de las vainas de mielina. El primer evento es la proliferación y migración de los OPCs hacia las distintas regiones cerebrales. El segundo es la identificación de los axones blanco y el establecimiento de la comunicación axón-glía por la actividad eléctrica de las células y distintas señales moleculares. Posteriormente ocurre la diferenciación de los OPCs a OLs mielinizantes como una secuencia de esta comunicación. El cuarto evento es el crecimiento de las membranas de los OLs, la expansión radial para enrollar a los axones y el aumento del tráfico de proteínas y diferentes componentes de la membrana, y como último evento ocurre la compactación y maduración de la mielina y la formación de los nodos de Ranvier (Emery, 2011; Nave & Werner, 2014).

En humanos, la proliferación y diferenciación de los OPCs ocurre durante la semana 10-41 de gestación, siendo esta una etapa clave para el inicio de este proceso. En roedores, de manera similar, en el día embrionario 9 (E9) comienza la proliferación de OPCs, en el día postnatal 2 (P2) comienza la diferenciación de éstos a pre OLs y en el día postnatal 7 (P7) la diferenciación a OLs pre mielinizantes (Barateiro & Fernandes, 2014).

El proceso de mielinización en mamíferos por lo general empieza durante el periodo perinatal, finalizando en la etapa postnatal; en estas etapas es cuando se observan los mayores picos o etapas de la mielinización. En el cerebro de ratón este proceso comienza al nacer y se completa en todas la regiones cerebrales al cabo de entre 40-60 días después del nacimiento. En humanos el pico de mielinización ocurre durante el primer año postnatal y tiene otro pico durante la adolescencia, en esta etapa se da principalmente en fibras corticales y en áreas asociativas (Baumann & Pham-Dinh, 2001).

Se ha descrito que en humanos la mielinización empieza desde la etapa fetal a partir del quinto mes, que es cuando se empiezan a mielinizar las raíces motoras. En la etapa postnatal se terminan de mielinizar las raíces motoras, sensoriales, el pedúnculo cerebeloso superior, la radiación óptica, los tractos piramidales y comienza la mielinización del pedúnculo cerebeloso medio entre otras estructuras (figura 3) (Baumann & Pham-Dinh, 2001). Durante esta etapa del desarrollo también se pueden presentar algunas patologías desmielinizantes e hipomielizantes, como leucopatías (Bradl &

Lassmann, 2010), algunas encefalomyelitis y algunas mutaciones genéticas, por ejemplo en el gen *jimpy (Plp1)*, el cual codifica para la proteína proteolípida (PLP), proteína abundante en las vainas de mielina, forma parte estructural de la mielina. Una mutación de este gene repercute a un evento de desmielinización (Baumann & Pham-Dinh, 2001).

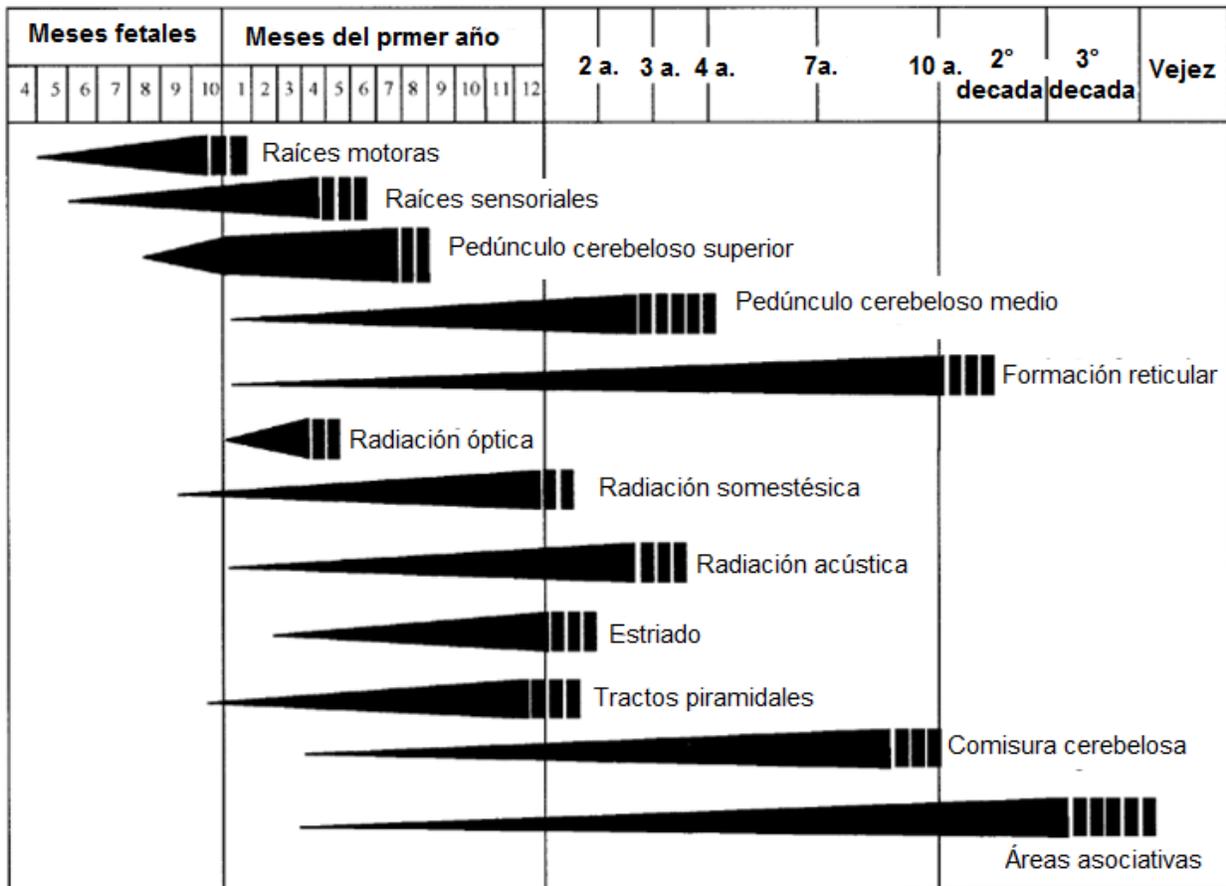


Figura 3. Mielinización del SNC en humanos durante su ciclo de vida. El esquema describe el proceso la mielinización en las diferentes etapas de vida en humanos, cada barra negra muestra en forma creciente las etapas de mielinización, con cortos períodos de mielinización intermitente, al final de cada barra. Este proceso comienza durante la etapa fetal y es durante la etapa postnatal que se mielinizan la mayoría de estructuras cerebrales, por lo que esta etapa es clave para el estudio de este proceso (modificado de Baumann & Pham-Dinh, 2001).

Uno de los factores importantes para que se lleve a cabo de manera adecuada el proceso de mielinización en la etapa neonatal, es la alimentación de la madre. Se ha descrito que durante el embarazo, la obesidad materna provocada por una dieta alta en grasas (DAG), por ejemplo, induce respuestas inflamatorias crónicas que afectan al feto/neonato durante el periodo perinatal, lo que conlleva a un proceso de mielinización deficiente (Graf et al., 2017). También se ha descrito que durante la lactancia, una DAG en la madre altera los componentes de la leche materna, lo que tiene un impacto negativo en el desarrollo de las crías. Así, una DAG materna disminuye los normalmente elevados niveles de la hormona prolactina en la leche (de los Ríos et al., 2018), lo que contribuye a diversas alteraciones metabólicas en las crías. A su vez, la prolactina ejerce efectos en la dinámica de mielinización en madres gestantes (C. Gregg et al., 2007), sin embargo se desconocen sus efectos en este proceso en las crías neonatales.

1.2 Prolactina en la mielinización

Dentro de todos los mecanismos moleculares investigados sobre los procesos de mielinización, se ha descubierto que algunas hormonas también intervienen en este proceso, tal es el caso de la prolactina (PRL). La PRL es una hormona peptídica secretada por las células lactotropas de la hipófisis anterior o adenohipófisis, que estimula la producción de leche en las glándulas mamarias y la síntesis de progesterona en el cuerpo lúteo. Además, la PRL está involucrada en funciones diversas que van desde la osmorregulación, el crecimiento, la angiogénesis, y el metabolismo (Cabrera-Reyes, Limón-Morales, Rivero-Segura, Camacho-Arroyo, & Cerbón, 2017). La vía de señalización de la prolactina inicia mediante la unión de esta hormona con el receptor de prolactina (PRLR), un miembro de la superfamilia de receptores de citocinas clase I, que se expresa en una variedad de tejidos (Binart, Ormandy, & Kelly, 2002). El PRLR comprende un dominio de unión a ligando extracelular, un dominio transmembranal y un dominio intracelular. La principal vía de señalización activada por la interacción PRL-PRLR es la vía JAK/STAT. Las proteínas janus quinasas (JAK) son una familia perteneciente a las enzimas asociadas a receptores de citoquinas, y forman parte de vías de señalización implicadas en la regulación de la expresión génica. La familia de

De manera interesante, estudios previos postulan que durante el embarazo, existe un aumento considerable en la proliferación de OPCs y la generación de oligodendrocitos mielinizantes en el SNC de la madre, particularmente en estructuras como el cuerpo calloso y la medula espinal, y esto es atribuido a los altos niveles de PRL durante esta etapa. También se demostró la presencia del PRLR en OPCs por inmunohistoquímica. Además, el tratamiento con PRL a una dosis de 20 µg/inyección por tres días aumentó la proliferación de OPCs en el cuerpo calloso y la médula espinal en ratones hembras vírgenes, y también fue eficaz para aumentar el número de oligodendrocitos mielinizantes recién generados en el sitio de lesión inducida por lisolecitina en la médula espinal (C. Gregg *et al.*, 2007). Estos resultados concluyen que la vía de señalización de PRL interviene en la proliferación de OPCs y que éstos a su vez podrían llevar a cabo el proceso de mielinización del SNC en el cerebro de la hembra gestante. Esta investigación ha sido de suma importancia ya que apoya la idea de que esta hormona se podría utilizar como agente terapéutico, para enfermedades desmielinizantes como la esclerosis múltiple (C. Gregg *et al.*, 2007). Sin embargo se desconoce si la PRL es uno de los factores que interviene en el proceso de mielinización durante el desarrollo postnatal.

Planteamiento del problema

Como se ha mencionado brevemente, la mielinización de los axones es un fenómeno fundamental que permite la comunicación en el sistema nervioso. A través de la mielinización los axones del sistema nervioso central son envueltos en mielina producida por los OLs y esta envoltura, además, protege y promueve la sobrevivencia de las neuronas. Su estructura permite también la generación de dominios membranales especializados, modificando las características eléctricas del axón, de tal manera que permite la rápida propagación del impulso nervioso (Eric Kandel, James Schwartz, Thomas Jessell, Steven Siegelbaum, 2013).

En los últimos años se han ido dilucidando los factores genéticos, moleculares y celulares que son necesarios para que se lleve a cabo de manera correcta este proceso. Dentro de estos factores se ha descrito que las vías hormonales participan en la mielinización,

entre las cuales se encuentra la PRL. La PRL promueve la proliferación de OPCs, lo cual da una mayor capacidad para generar OLs mielinizantes en la sustancia blanca durante el embarazo (C. Gregg *et al.*, 2007), esto sugiere que esta hormona podría ser importante en la mielinización perinatal, etapa en la que la PRL llega a la cría a través del cordón umbilical, mientras que en la etapa neonatal y postnatal en roedores (hasta la tercera semana de nacimiento que la cría produce su propia PRL) llega a través de la leche materna.

Justificación

En un contexto patológico o de daño en la sustancia blanca, una falla en el proceso de formación de la mielina tiene consecuencias graves en las funciones cerebrales; esto es lo que ocurre en varias patologías desmielinizantes e hipomielinizantes. De manera reciente, se ha comenzado a reconocer el papel de la mielinización en diferentes procesos cognitivos, motores, así como en la etiología de diversos trastornos mentales (P. R. Lee & Fields, 2009; McKenzie *et al.*, 2014). Estas patologías y trastornos ocurren con mayor frecuencia durante la etapa neonatal y postnatal en humanos.

Dado lo anterior es muy importante dilucidar si la hormona prolactina participa en el proceso de mielinización durante el desarrollo postnatal, y en su caso cuales son los mecanismos de acción. De esta manera los resultados obtenidos permitirán ahondar en el conocimiento de los mecanismos de mielinización y la participación de la prolactina. Más aún, el proyecto permitirá a mediano o largo plazo diseñar o plantear una estrategia terapéutica que involucre moduladores de la vía de señalización mencionada, para tratar de contrarrestar o tratar algunas de las patologías desmielinizantes.

Hipótesis

La Prolactina (PRL) promueve el proceso de mielinización durante el desarrollo postnatal en ratones.

Objetivo general

Determinar la participación de prolactina (PRL) en el proceso de mielinización en la etapa postnatal.

Objetivos particulares

1. Caracterizar el proceso de mielinización mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas en ratones de edad p12 silvestres (PrIr^{+/+}) y con delección del receptor de prolactina (PrIr^{-/-})
2. Caracterizar por medio de resonancia magnética (imágenes sensibles a difusión) *ex vivo* el proceso de mielinización en ratones p12 en condiciones PrIr^{+/+} y PrIr^{-/-}.
3. Explorar si se presentan alteraciones conductuales en los ratones PrIr^{-/-} con respecto a los PrIr^{+/+}.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron ratones hembra adultas heterocigotos ($PrIr^{+/-}$) de la cepa C57BL/6J, las cuales fueron apareadas con ratones macho de la misma cepa carentes del receptor de prolactina ($PrIr^{-/-}$), heterocitos ($PrIr^{+/-}$), o silvestres ($PrIr^{+/+}$). De estas cruzas se obtienen crías de los siguientes genotipos: heterocigotos ($PrIr^{+/-}$), knockout ($PrIr^{-/-}$) y silvestres ($PrIr^{+/+}$) (figura 5). Las crías fueron sacrificadas al día p12 para su análisis histológico e inmunohistoquímico.

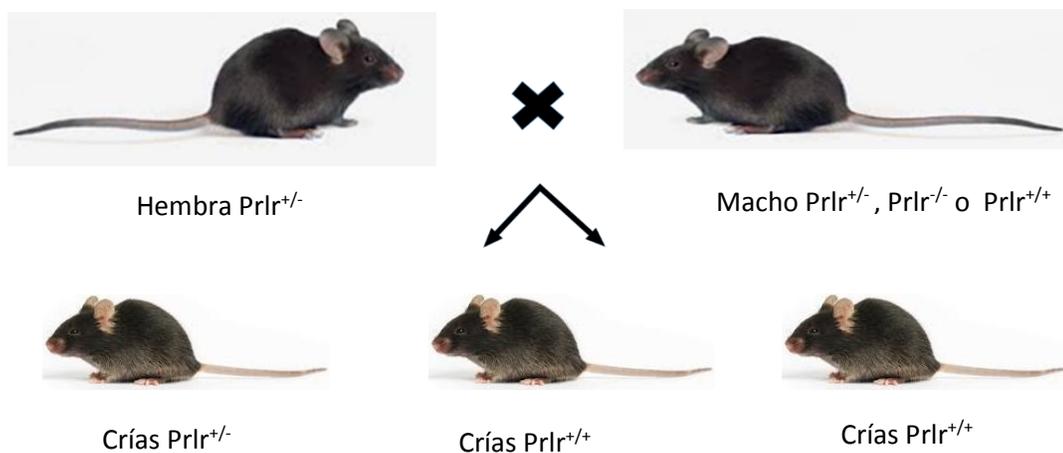


Figura 5. Apareamientos para obtener crías $PrIr^{-/-}$ y $PrIr^{+/+}$. Esquema de las cruzas realizadas para obtener crías con diferentes genotipos para el receptor de prolactina (PRLR).

Todos los procedimientos y manejo de los animales se llevaron a cabo de acuerdo al Manual de Usuarios del Bioterio del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, campus Juriquilla, emitido por el comité de bioética de dicha institución.

Histología

Tinción con Black Gold II (BGII)

En histología, se ha usado el BGII para observar mielina en cortes de tejido cerebral; es un complejo de haloaurofosfatos los cuales se intercalan en los lípidos de la mielina y emiten una coloración de rojo claro a rojo oscuro o negro (Schmued et al., 2008). En este trabajo, esta técnica fue utilizada para evaluar los niveles relativos de mielinización en los ratones $PrIr^{+/+}$ y con $PrIr^{-/-}$ en edad P12. En breve, después de la disección de los cerebros, previamente fijados por perfusión (véase abajo detalles de perfusión), éstos se colocan en una solución de formalina (10%) durante 24 horas. Posteriormente, los tejidos son criopreservados por inmersión en sacarosa a diferentes concentraciones (10% 1h, 20% 1h y 30% 24 h) a una temperatura de 4°C. Los tejidos entonces son seccionados a 50 μm de grosor y se colocan en portaobjetos para su posterior tinción. Para teñir con BGII (Black Gold II Myelin Staining Kit, Millipore) primero se hidrata el tejido con PBS pH 7.4 y posteriormente con agua desionizada y después la muestra se incuba en solución BGII (0.3%, disuelto en NaCl 0.9%) a una temperatura de 60-65°C, se lava el exceso con tiosulfato de Na^+ (1%) a la misma temperatura y se vuelve a lavar para posteriormente agregar el violeta de cresilo, utilizado para contrastar la tinción de BGII. Finalmente, se utiliza DPX como medio de montaje. Para la evaluación de las zonas mielinizadas, las secciones de tejido para BGII se visualizaron y analizaron con un microscopio óptico (Leica), y se obtuvieron imágenes representativas con una cámara Leica ICC50 HD (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania).

Cuantificación del área de mielinización

Para cuantificar el área que ocupa la mielina en distintas regiones, se implementó un método analítico semiautomático que mide dicha área a partir de imágenes obtenidas en la tinción con BGII. De este modo, utilizando el programa ImageJ, se logró obtener medidas de área de mielinización en distintas zonas. En breve, sobre las imágenes se hace una descomposición en colores básicos principales, el cual divide una imagen RGB

en tres imágenes de escala de grises de 8 bits que contiene los componentes rojo, azul y verde de la imagen original, entonces, empleando únicamente los componentes rojos y realizando un límite umbral (*threshold*), fue posible dicha medición de área de mielinización (Figura 6).



Figura 6. Cuantificación de área de mielinización a partir de imágenes histológicas. A), tejido cerebral teñido con BGII de un raton $Prlr^{+/+}$, p21. En esta imagen original (RGB) se observa parte del cuerpo calloso. **B)**, imagen que contiene solo los componentes rojos de la imagen A **C)**, Threshold de la imagen en B, donde se marcan las zonas mielinizadas medidas por el software.

Tinción con violeta de cresilo para medición del volumen cerebral.

La tinción con violeta de cresilo es una técnica histológica la cual tiñe los núcleos celulares y cuerpos de Nissl (retículo endoplasmico rugoso) de las neuronas, y se utiliza para remarcar estructuras cerebrales en el SNC. Es empleado como contraste para algunas tinciones (como se usó para contrastar las tinciones con BGII). Sin embargo, debido a la resolución y contraste que se obtiene con esta técnica en estructuras muy definidas, se utilizó también de manera individual para determinar los cambios en el volumen de las estructuras cerebrales que están compuestas principalmente por fibras mielinizadas y también para evaluar el volumen total del cerebro. Los cerebros se criogenizan con nitrógeno líquido y posteriormente seccionados en el criostato a 20 μm de grosor y se colocan en portaobjetos para su posterior tinción. Se recolecta el primer corte cuando comienza a aparecer la corteza cerebral comenzando a cortar desde la parte de los bulbos olfatorios hasta la parte más posterior. El segundo se recolecta después del corte número 25, y así sucesivamente hasta terminar, de manera que se tiene una secuencia representativa de cada región cerebral. Para teñir con violeta de

cresilo, primero se hidrata el tejido con agua desionizada y después se incuba con el violeta de cresilo durante 2 minutos a temperatura ambiente. Posterior a la incubación se realizan lavados con agua desionizada para remover el exceso y se realiza una deshidratación gradual del tejido con etanol a diferentes concentraciones. Después las muestras se montan para obtener las imágenes en un microscopio de luz (microscopio óptico Leica). Una vez obtenidas las imágenes de los tejidos cerebrales se midió el área total cerebral y el área del cuerpo caloso de cada corte histológico usando el software ImageJ. Para obtener el volumen total se calculó multiplicando la suma de las áreas seleccionadas por la distancia entre cada corte recuperado.

Perfusión

Las crías $Prlr^{-/-}$ y $Prlr^{+/-}$ de edad p12 fueron perfundidas con las siguientes soluciones; PBS (0.1M, pH 7.4) y paraformaldehído (PFA, pH 7.0) al 4%. Previamente, los animales se anestesiaron con isoflurano saturante en una cámara de inducción (Sofloran, Pisa S.A. de C.V.). Posteriormente, se les realizó una escisión en la cavidad torácica de modo que quedara expuesto el corazón. Después, se introdujo una aguja del equipo de perfusión en el ventrículo izquierdo y se realizó una pequeña escisión en la aurícula derecha para drenar la sangre. La circulación de las soluciones fue por gravedad. De inmediato se hizo pasar 40 ml de PBS como solución de lavado. Una vez que terminada la perfusión con la solución de lavado se realizó la perfusión con la solución de fijación, 50 ml de PFA al 4% (figura 7). Finalmente se extrajeron los cerebros con precaución para evitar daño al tejido y se colocaron en recipientes con PFA 4% durante 24 horas a 4°C. Después de transcurrido este tiempo se les retiró el PFA y se les colocó PBS y se guardaron a 4°C.

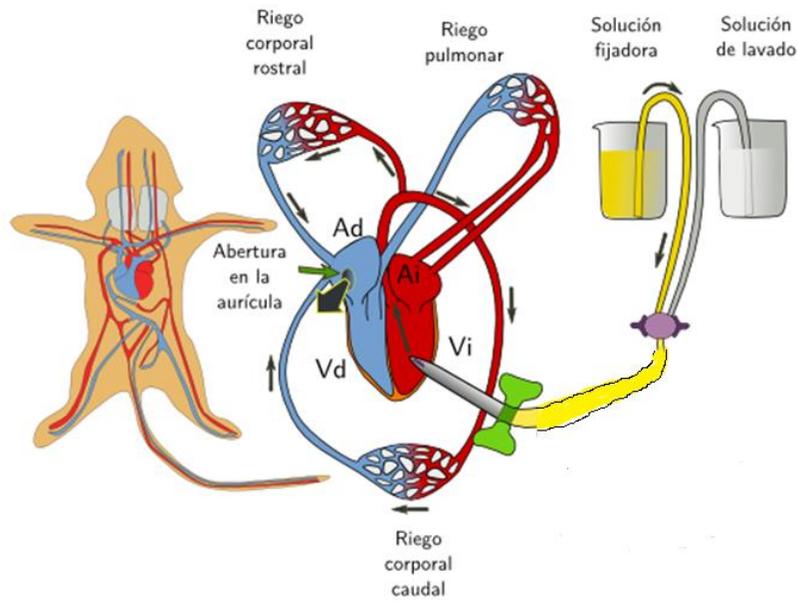


Figura 7. Perfusión con PFA para la fijación de los tejidos. Esquema representativo de la perfusión con la solución de fijación llevada a cabo en los animales experimentales.

Inmunofluorescencia

Esta técnica consiste en observar proteínas específicas de interés, en este caso de mielina. El principio fundamental de la inmunofluorescencia es dirigir un anticuerpo primario contra las proteínas de interés y después dirigir un anticuerpo secundario que tenga una proteína reportera, en esta caso que emita fluorescencia al ser excitada con un láser. Con esta técnica se evaluó la cantidad de mielina en ratones p12 Prlr^{+/+} y Prlr^{-/-}. Los cerebros se criopreservan por inmersión y en sacarosa a diferentes concentraciones (10%, 20% y 30%) a una temperatura de 4°C. Los tejidos entonces son seccionados en el criostato a 50 µm de grosor y se colocan en etilenglicol a una temperatura de 4°C. Después se realiza un lavado con PBS (0.1M, pH 7.4) durante 5 minutos en agitación, posteriormente se colocan en un buffer de citratos a una temperatura a punto de ebullición durante 20 minutos. Se realizan dos lavados con PBS de 5 minutos cada uno en agitación, después se incuban con PBS-BSA-Tween durante 30 minutos a 37 °C en agitación, posteriormente se incuban con PBS-Glicina durante 30 minutos a temperatura

ambiente en agitación. Después se incuban con el anticuerpo primario (anti-MBP Covance SMI-99 Mouse IgG2b) a una concentración 1:1000 durante 24h a 4°C. Posteriormente se realizan dos lavados con PBS-Tween y otro con PBS durante 5 minutos cada uno en agitación. Después se incuba con el anticuerpo secundario (cabra anti ratón FITC 81-6511 Zymed) a una concentración 6:800 durante 2h a temperatura ambiente en agitación. Después se realiza un lavado con PBS por 5 minutos y se coloca el marcador nuclear (DAPI) por 10 minutos a una concentración de 1:1000. Después se realizan tres lavados con PBS de 5 minutos cada uno y posteriormente se montan en un portaobjetos utilizando Vectashield. La adquisición de imágenes se realiza en un microscopio confocal Zeiss LSM DUO 780.

Análisis de Difusión por Resonancia Magnética

La resonancia magnética (RM) es una técnica no invasiva que consiste en escanear un organismo y obtener imágenes, las cuales permiten visualizar las diferentes regiones anatómico-estructurales. Por su parte, mediante la obtención de imágenes sensibles a difusión en resonancia magnética (dMRI) es posible medir de manera indirecta la cantidad de mielina del SNC y complementarlo con los análisis histológicos. En este trabajo, se tomaron imágenes dMRI en el Laboratorio Nacional de Imagenología por Resonancia Magnética (LANIREM), se usó un magneto de 7T (Bruker Pharmascan 70/16US). Se implementaron los protocolos para el escaneo de cerebros *ex vivo* de ratones P12 *PrIr^{+/+}* y *PrIr^{-/-}*. En este caso de escaneo *ex vivo*, los animales son previamente perfundidos con PFA, como habitualmente, con la adición al medio de fijación de Glutaraldehído 2% y Gadolinio 0.002 mM, con la finalidad de mejorar el contraste de las imágenes obtenidas. En particular, las imágenes son adquiridas en una secuencia 2D de imágenes eco-planares (EPI:Echo-Planar Image), con 22 rebanadas virtuales de 400µm (que cubre prácticamente todo el encéfalo). Se usó un tiempo de repetición (TR) de 2s, tiempo de eco (TE) de 20s, FOV=20x20mm, tamaño de imagen=150x150mm, 40 direcciones, un valor de sensibilidad a la difusión (b) de 1500 s/mm², 1 promedio y con un tiempo total de escaneo de 59 min. Después, las imágenes obtenidas son post procesadas en el software MRtrix3 (<http://www.mrtrix.org>), en cual se

recorta el espacio, se realiza un suavizado, se corrige el movimiento, se calcula el tensor de difusión (DTI, por sus siglas en inglés *Difussion Tensor Imaging*) y se obtienen los mapas de la fracción de anisotropía (FA), el mapa del vector principal de difusión (VPD) y el mapa del coeficiente de difusión aparente (ADC). Posteriormente con el visualizador de imágenes del software se construyen las regiones de interés (ROI) de las estructuras cerebrales a analizar, para ello se utiliza el mapa VPD para delinear manualmente las ROIs (figura 8).

De manera paralela, en este trabajo se hizo una exploración de esta técnica utilizando dMRI en animales *in vivo*. Para ello, los animales fueron anestesiados con isoflurano (4%, en aire comprimido) en una cámara anestésica, se colocaron dentro del magneto y se mantuvieron con 1-2% (aire comprimido) durante la adquisición de las imágenes. Los datos para dMRI fueron obtenidos usando una secuencia 2D de imágenes eco-planares (EPI:Echo-Planar Image), con grosor de rebanada de 650 μ m, sin inter espaciado, TR=2.1s, TE=23.4s, FOV=20x20mm, tamaño de imagen=150x150mm, 40 direcciones de difusión, b=650s/mm², 1 promedio, 30 rebanadas y con un tiempo total de escaneo de 17min. Como en el caso *ex vivo*, las ROIs se delinearón manualmente utilizando el mapa VPD para posteriormente cuantificar mapas de anisotropía, ADC y otros parámetros llamados difusividades (axial y radial)

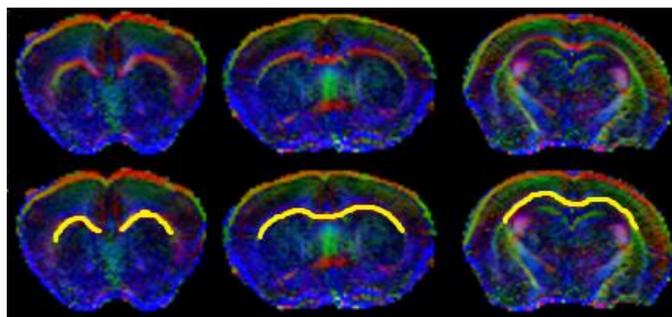


Figura 8. Construcción de las regiones de interés (ROIs) provenientes de la Imagenología por Resonancia Magnética. En las imágenes de la parte superior se observan los mapas del vector principal de difusión (VPD) de rebanadas coronales de cerebro de ratón. En las imágenes de la parte inferior se observa cómo se realizan las ROIs de forma manual de las estructuras de interés por analizar. Estas imágenes corresponden a animales escaneados en modo *in vivo*.

Ensayo conductual, barra de equilibrio.

Este ensayo se realizó bajo condiciones apropiadas de iluminación y silencio para estresar lo menos posible a los animales experimentales. Ratones $Pr1r^{+/+}$ y $Pr1r^{-/-}$ machos juveniles de edad P28, fueron colocados en el punto medio de una barra cilíndrica de 50 cm de longitud y 7mm de diámetro. Esto montado en una jaula para ratas donde la barra estaba a una altura de 15 cm (figura 9) (Care & Instruments, 2001). Cada ensayo tuvo una duración de 1.5 min y durante este tiempo se cuantificaron las siguientes variables: número de caídas y tiempo en que tardaron en caerse por primera vez.

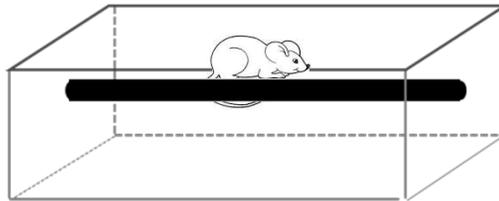


Figura 9. Arreglo experimental para el ensayo de la barra de equilibrio. Se utilizó una barra cilíndrica de madera de una longitud de 50 cm y un diámetro de 7 mm, colocada dentro de una jaula amplia, a una altura de 15 cm respecto del piso de la jaula. Los ensayos fueron video filmados con una cámara semiprofesional (SONY alfa6) colocada enfrente de la jaula.

Análisis estadístico

En cada experimento cuantitativo se muestra el promedio para cada grupo experimental y el error estándar como medida de dispersión. Para evaluar las diferencias entre ambos grupos se realizó la prueba t-Student con un intervalo de confianza del 95% ($P < 0.05$). Para realizar estas pruebas estadísticas se utilizó el programa GraphPad Prism versión 6 para Windows.

Resultados

1.1 Medición del volumen cerebral: Prlr^{-/-} tienen un menor volumen del cc

El SNC a grandes rasgos se divide en dos partes en sustancia gris y sustancia blanca, la sustancia gris se compone de los cuerpos celulares neuronales dendritas axones y células gliales, mientras que la sustancia blanca en su mayoría está compuesta por la mielina producida por los oligodendrocitos y axones mielinizados. Durante el desarrollo del SNC posterior al nacimiento, una de las principales causas del aumento del volumen cerebral es debido a la mielinización. De este modo, se evaluó si el volumen cerebral cambia debido a la ausencia del receptor a PRL. Esta caracterización se realizó con ayuda de la tinción con violeta de cresilo, en cerebros de ratones de edad P12 Prlr^{+/+} y Prlr^{-/-}. Observamos que en los ratones Prlr^{-/-} el volumen cerebral total fue similar al de los ratones Prlr^{+/+} ($229 \pm 8 \text{ mm}^3$ vs. $232 \pm 6 \text{ mm}^3$, respectivamente). Sin embargo, cuando analizamos el cuerpo calloso, encontramos que el volumen de esta región, en cortes coronales de $20 \mu\text{m}$ de grosor, fue alrededor de 40% menor en los animales Prlr^{-/-} en comparación con los ratones Prlr^{+/+} ($3 \pm 0.68 \text{ mm}^3$ vs. $5.4 \pm 0.18 \text{ mm}^3$, respectivamente, figura 10).

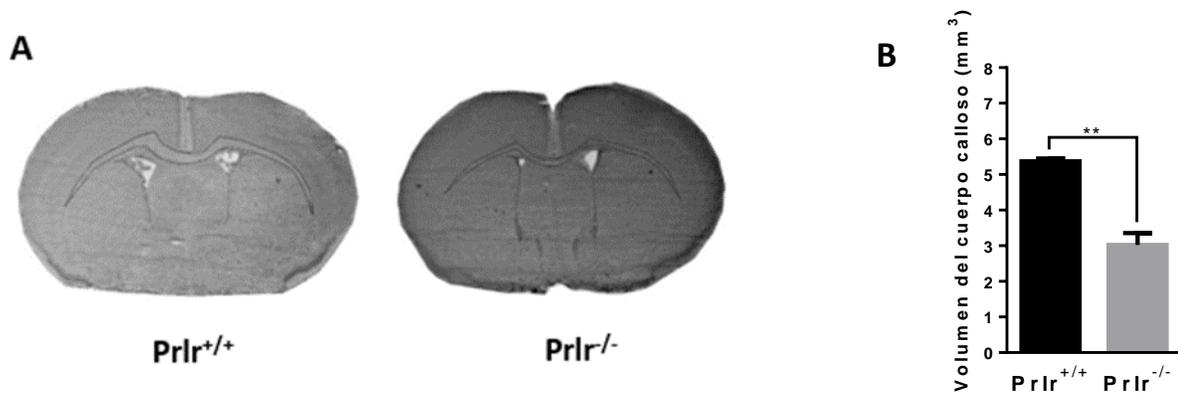


Figura 10. Evaluación del volumen cerebral. A) secciones coronales del cerebro de ratones P12 Prlr^{+/+} y Prlr^{-/-} (se delinea el cuerpo calloso). B) El volumen del cuerpo calloso, una estructura con una alta densidad de fibras mielinizadas, fue aproximadamente un 40% menor en los

animales $PrIr^{-/-}$ en comparación con los $PrIr^{+/+}$ ($3 \pm 0.68 \text{ mm}^3$ vs. $5.4 \pm 0.18 \text{ mm}^3$, respectivamente, T-test; $n=6 \text{ PrIr}^{+/+}$ vs $n=4 \text{ PrIr}^{-/-}$ $**p=0.006$).

1.2 Mielinización del SNC mediante tinción con Black Gold II (BGII)

Schmued y colaboradores (2008) desarrollaron una técnica histológica específica denominada Black Gold II para detectar fibras mielinizadas en cortes cerebrales. Con ésta, es posible observar regiones del encéfalo que contengan mielina, y además, observar si en condiciones patológicas o de daño la mielina sufre cambios o se ve alterada en su morfología. De este modo, inicialmente se exploraron con esta tinción, dos etapas postnatales, p12 y p21 para validar esta técnica en nuestro laboratorio. La figura 11 muestra cortes coronales de ratón en p12 y p21. Como era esperado, el BGII tiñe en coloración de rojo a rojo oscuro todas las zonas con estructuras mielinizadas.

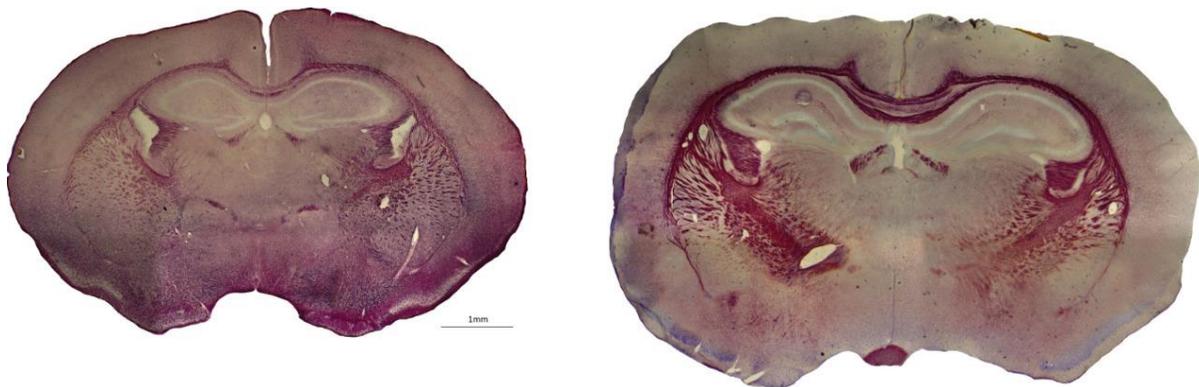


Figura 11. Tinción con BGII en dos etapas de desarrollo postnatal en cerebro de ratón silvestre P12 y P21. Cortes coronales representativos de cerebro de ratón en p12 (izquierda) y P21 (derecha). BGII tiñe en coloración de rojo a rojo oscuro en todas las zonas con estructuras mielinizadas.

Una exploración detallada de estructuras particulares fue revisada. En la figura 12 se advierten micrografías ampliadas de cerebro de ratón en los mismos cortes coronales, en donde es posible visualizar zonas con alta densidad de fibras mielinizadas (p. ej. cuerpo calloso) o zonas con fibras individuales (p. ej. en la corteza cerebral).

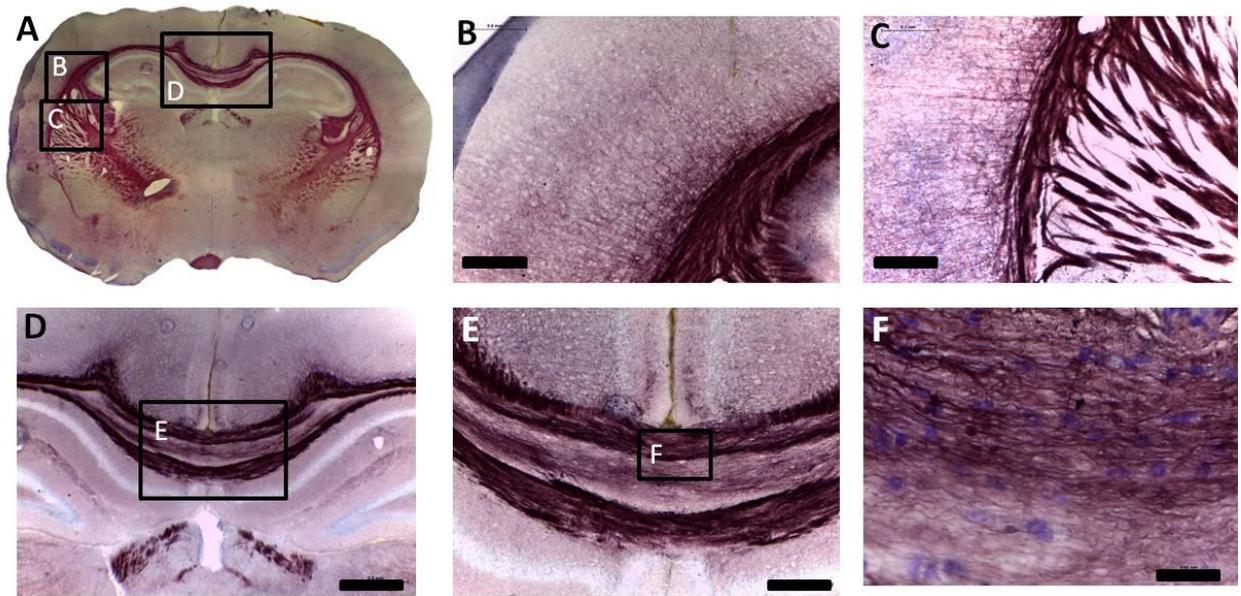


Figura 12. Tinción con Black Gold II, cerebro de ratón P21, WT. A) Corte en la región medial del cerebro, donde se observan los diferentes tractos de fibras mielinizadas, es posible identificar estructuras como la fimbria, cuerpo caloso, cíngulo caudoputamen, pedúnculo cerebral, entre otras. B) Amplificación de la imagen A donde se puede observar como proyectan las fibras desde el cuerpo caloso hacia la corteza auditiva. C) Amplificación de la imagen A donde se observa la corteza somatosensorial y como emergen fibras mielinizadas individuales hacia esta. D) Amplificación del recuadro central de la imagen A, donde se aprecia la corteza somatosensorial del hemisferio izquierdo, se puede observar el mismo patrón de mielinización que la corteza del hemisferio derecho, las barras tienen una longitud de 200 μm .

1.3 La delección del receptor de PRL promueve hipomielinización

Enseguida, se caracterizó la presencia de mielina del SNC de los ratones $\text{PrIr}^{-/-}$ y los $\text{PrIr}^{+/+}$ (P12) histológicamente mediante la tinción con BGII. Los hallazgos muestran una diferencia evidente en las áreas de mielinización entre un ratón $\text{PrIr}^{+/+}$ y $\text{PrIr}^{-/-}$, en estructuras como cuerpo caloso, cíngulo, la fimbria, caudoputamen y la corteza cerebral, por ejemplo. En la figura 13 se pueden observar estas diferencias en cortes secuenciales de ambos genotipos de ratones.

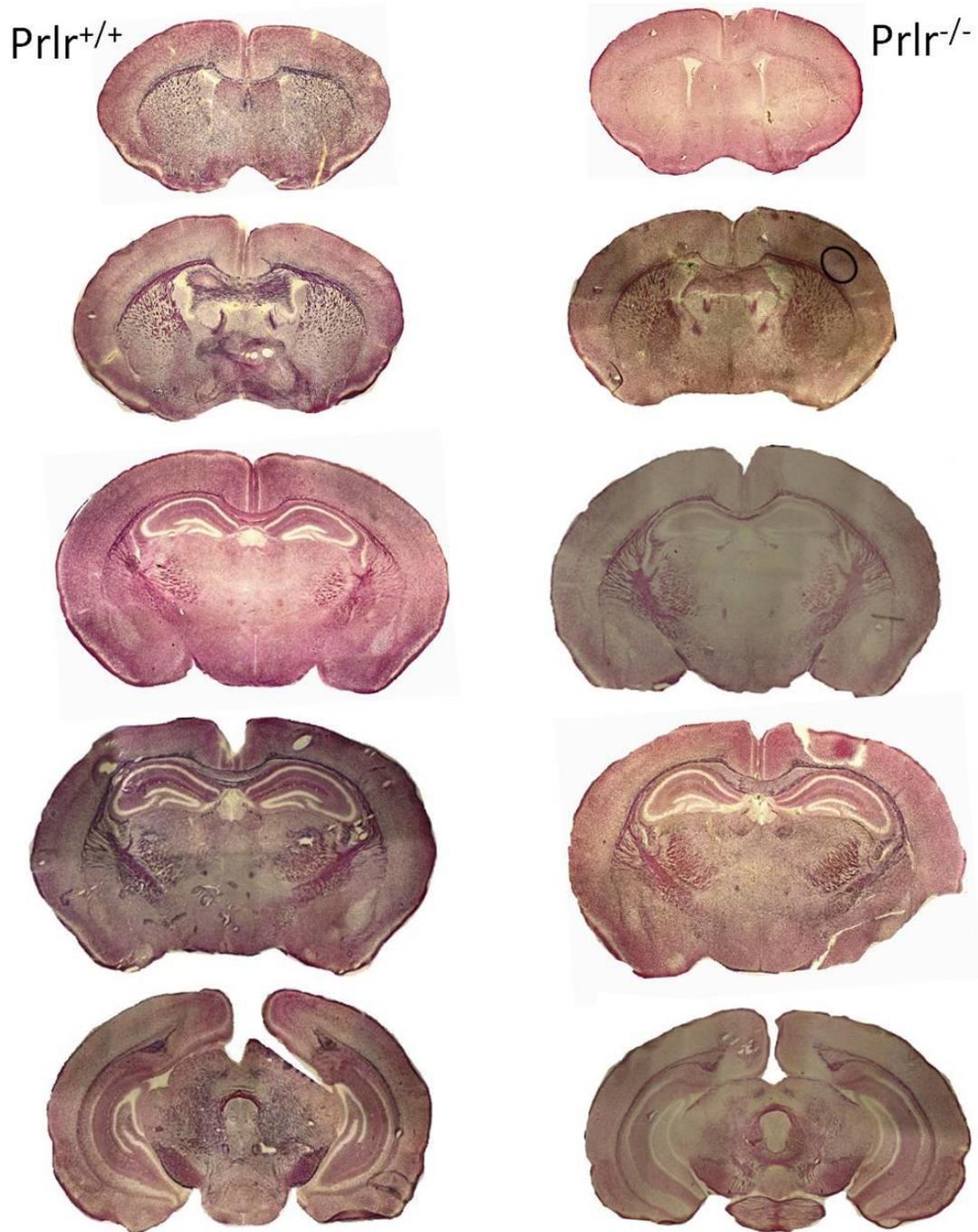


Figura 13. Mielinización del SNC de ratones $Prlr^{+/+}$ y $Prlr^{-/-}$. Tejido cerebral de ratón P12 $Prlr^{+/+}$ y $Prlr^{-/-}$, ordenado en forma antero-posterior desde la arte superior a inferior. En esta imagen es posible observar las diferentes estructuras cerebrales como por ejemplo el cuerpo calloso, cíngulo, caudoputamen, hipocampo, corteza cerebral entre otras, desde la parte anterior, medial y posterior del cerebro.

Realizando una ampliación de una región anterior del cerebro, donde se localizan estructuras como en el cuerpo calloso y el cíngulo de la región anterior del cerebro, es posible distinguir fibras individuales o agrupadas así como su dirección y su proyección, (figura. 14).

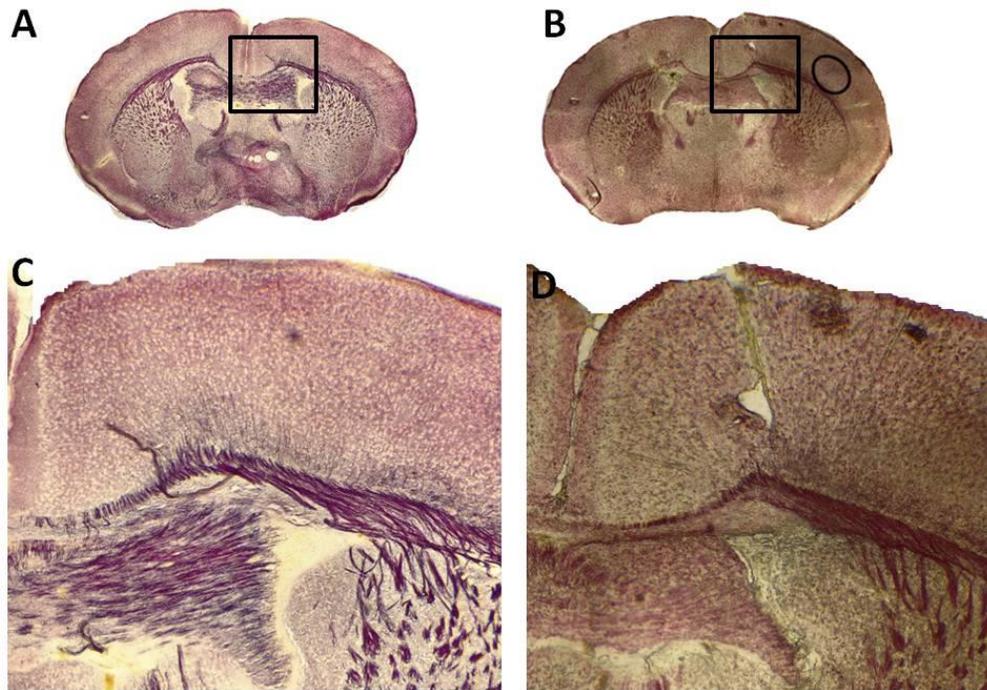


Figura 14. Mielinización en cuerpo calloso, cíngulo y fimbria. A) Amplificación del recuadro del cerebro $Prlr^{+/+}$, en donde se pueden observar estructuras como el cuerpo calloso, cíngulo y la fimbria, estructuras con una alta densidad de fibras mielinizadas. B) Amplificación del recuadro del cerebro $Prlr^{-/-}$, en donde se observan las mismas estructuras que la imagen A y es claro observar una menor cantidad de mielina en dichas estructuras.

Finalmente, se midió el área de mielinización en el cuerpo calloso en una región medial y también una parte de la fimbria. Se construyeron regiones de interés (ROIs) de 600X600 ppp para el cuerpo calloso, y 600X400 ppp para la fimbria, y se les aplicó un *threshold* (umbral de 110) para realizar la cuantificación en el programa ImageJ (figura 15). Con este método, existe una diferencia del 50% en la reducción del área de mielinización en

los animales Prlr^{-/-}, con respecto de los animales Prlr^{+/+}, tanto en el cuerpo calloso como en la fimbria.

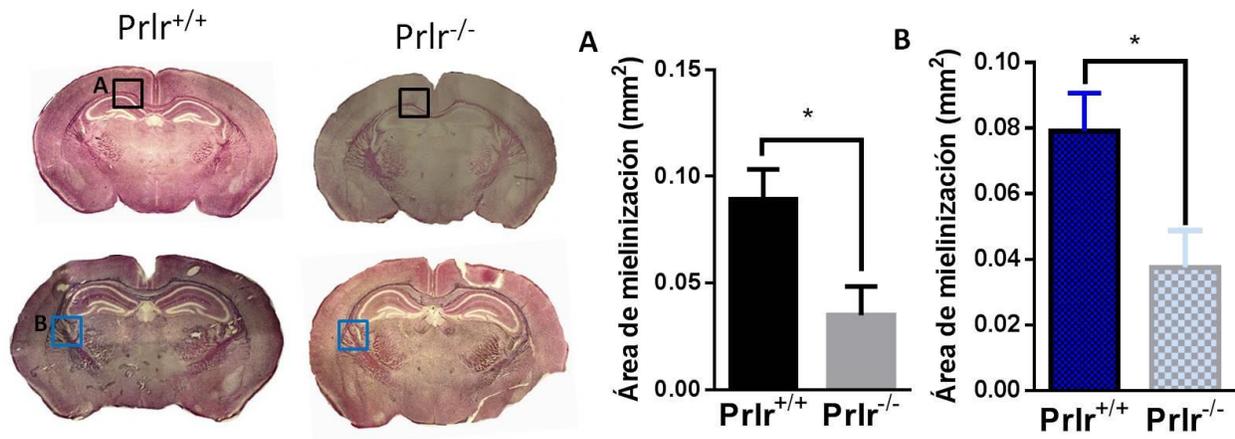


Figura 15. Cuantificación del área de mielinización en el cuerpo calloso y la fimbria. A) Comparación del área de mielinización del cuerpo calloso (recuadro negro) de un Prlr^{+/+} vs Prlr^{-/-} (t-test; n=5 (Prlr^{+/+}) vs n=4 (Prlr^{-/-}) *p=0.0290). B) Comparación del área de mielinización de la fimbria (recuadro azul), donde se observa una diferencia significativa en el área de mielinización (t-test; n=5 (Prlr^{+/+}) vs n=4 (Prlr^{-/-}) *p=0.0394).

Después, se realizó una cuantificación extensiva para el cuerpo calloso, para ello fueron tomadas tres regiones cerebrales diferentes, dos regiones mediales y una región posterior, donde se contiene el cuerpo calloso (figura 16). Estos resultados juntos indican que la delección del receptor de prolactina repercute negativamente en el proceso de mielinización durante la etapa postnatal, en el SNC esto observado de manera cuantitativa en estructuras como cuerpo calloso y la fimbria, las cuales se caracterizan por tener una alta densidad de fibras mielinizadas.

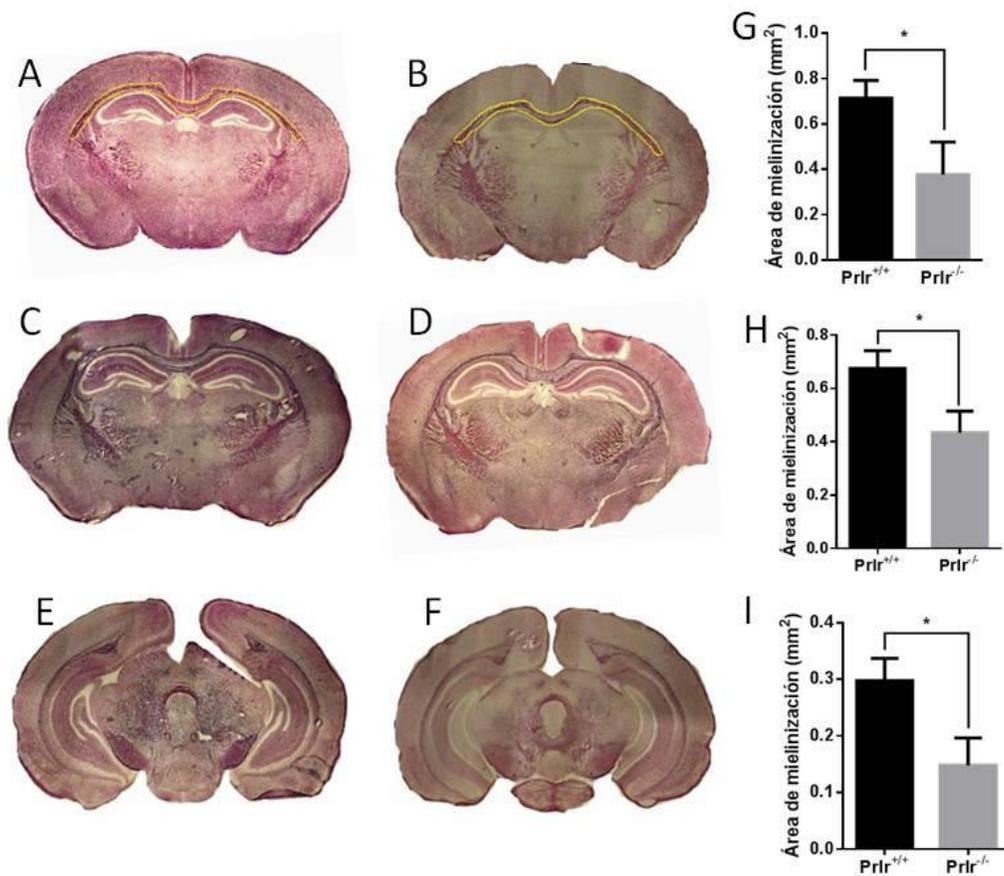


Figura 16. Cuantificación del área de mielinización del cuerpo calloso completo. A), B), G) Comparación del área de mielinización del cuerpo de un Prlr^{+/+} vs Prlr^{-/-}, (t-test; n=5 Prlr^{+/+} vs n=4 Prlr^{-/-}; *p=0.0327). C), D), H), Región posterior donde se sigue observando la misma diferencia en la mielinización del cuerpo calloso (t-test; n=5 Prlr^{+/+} vs n=4 Prlr^{-/-}) *p=0.0266. E), F), I) Se observa la misma diferencia aun en una región más posterior (t-test; n=5 Prlr^{+/+} vs n=4 Prlr^{-/-} *p=0.0232).

1.4 Inmunohistoquímica contra la proteína básica de la mielina (MBP)

La proteína básica de la mielina (MBP) es una de las principales proteínas presentes en la mielina y muy abundante en oligodendrocitos mielinizantes, con lo cual es un blanco perfecto para detectar mielina en el SCN y caracterizar el proceso de mielinización de manera directa. En este trabajo, esta técnica se ajustó en cortes de tejido cerebral de 50 μ m de grosor, más gruesos de lo habitualmente utilizados, con la finalidad de observar mayor densidad de fibras mielinizadas y por ende más cantidad de mielina. Se logró

estandarizar esta técnica y en las imágenes (figura 17) se observa la fluorescencia típica del tejido con un anticuerpo contra MBP en fluorescencia en animales P12 de $PrIr^{+/+}$.

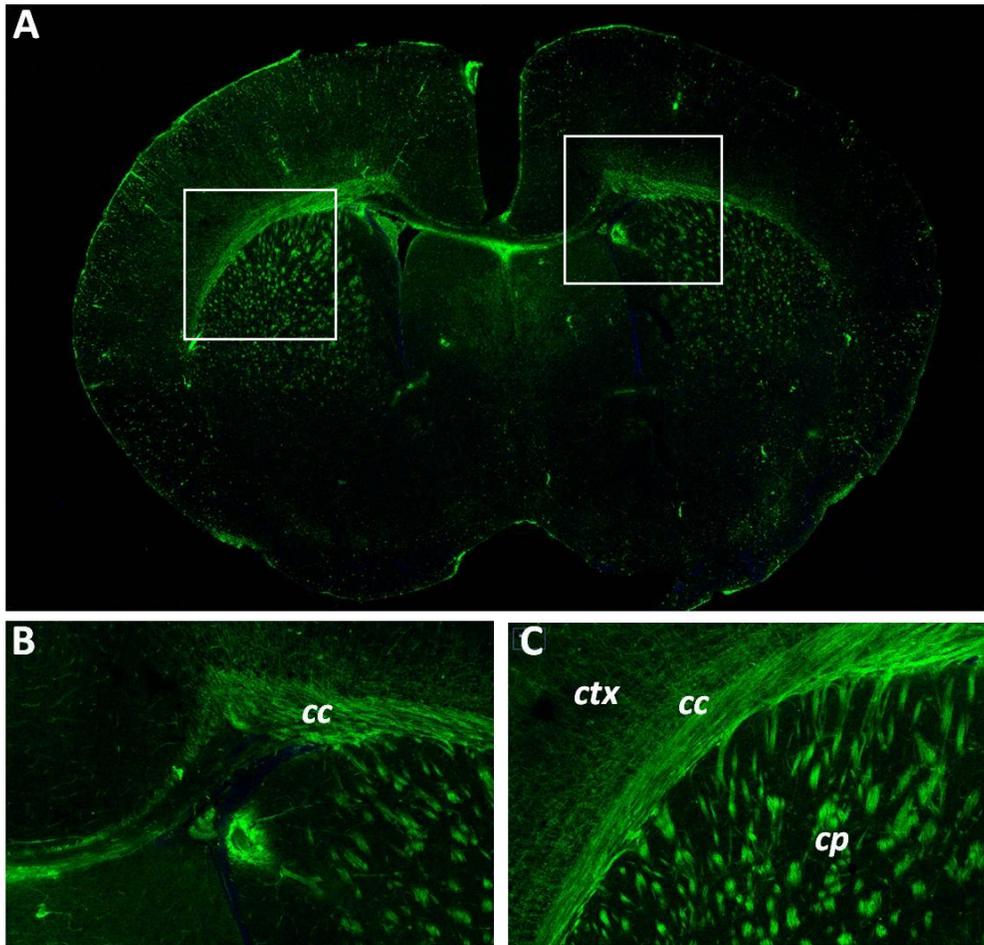


Figura 17. Inmunohistoquímica contra MBP en un cerebro de ratón p12 $PrIr^{+/+}$. A) Imagen de un corte coronal del cerebro completo de un ratón P12 $PrIr^{+/+}$, donde se aprecian estructuras como el cuerpo caloso, el estriado entre otras. B) Amplificación de una región del cuerpo caloso donde se observan fibras mielinizadas que emergen hacia la corteza. C) Amplificación del cuerpo caloso y el cíngulo, donde se observa la proyección y dirección de las fibras mielinizadas.

1.5 Los ratones $PrIr^{-/-}$ presentan menos MBP con respecto a los $PrIr^{+/+}$

Una vez estandarizado el protocolo se evaluó la presencia de MBP del SNC en los ratones $PrIr^{-/-}$ y los $PrIr^{+/+}$ (P12). Los resultados muestran una clara diferencia en los

niveles de MBP de los ratones $PrIr^{-/-}$, donde se puede observar de forma cualitativa que existe menor cantidad de MBP con respecto a los $PrIr^{+/+}$. Esto en estructuras como el cuerpo calloso, el estriado y caudoputamen, las cuales se caracterizan por tener altos niveles de esta proteína (figura 18). Finalmente, todo lo anterior sugiere que existe un fenómeno de hipomielinización, en el día postnatal 12 (P12) los animales $PrIr^{-/-}$ tienen menos mielina en comparación con los animales $PrIr^{+/+}$ (figura 19).

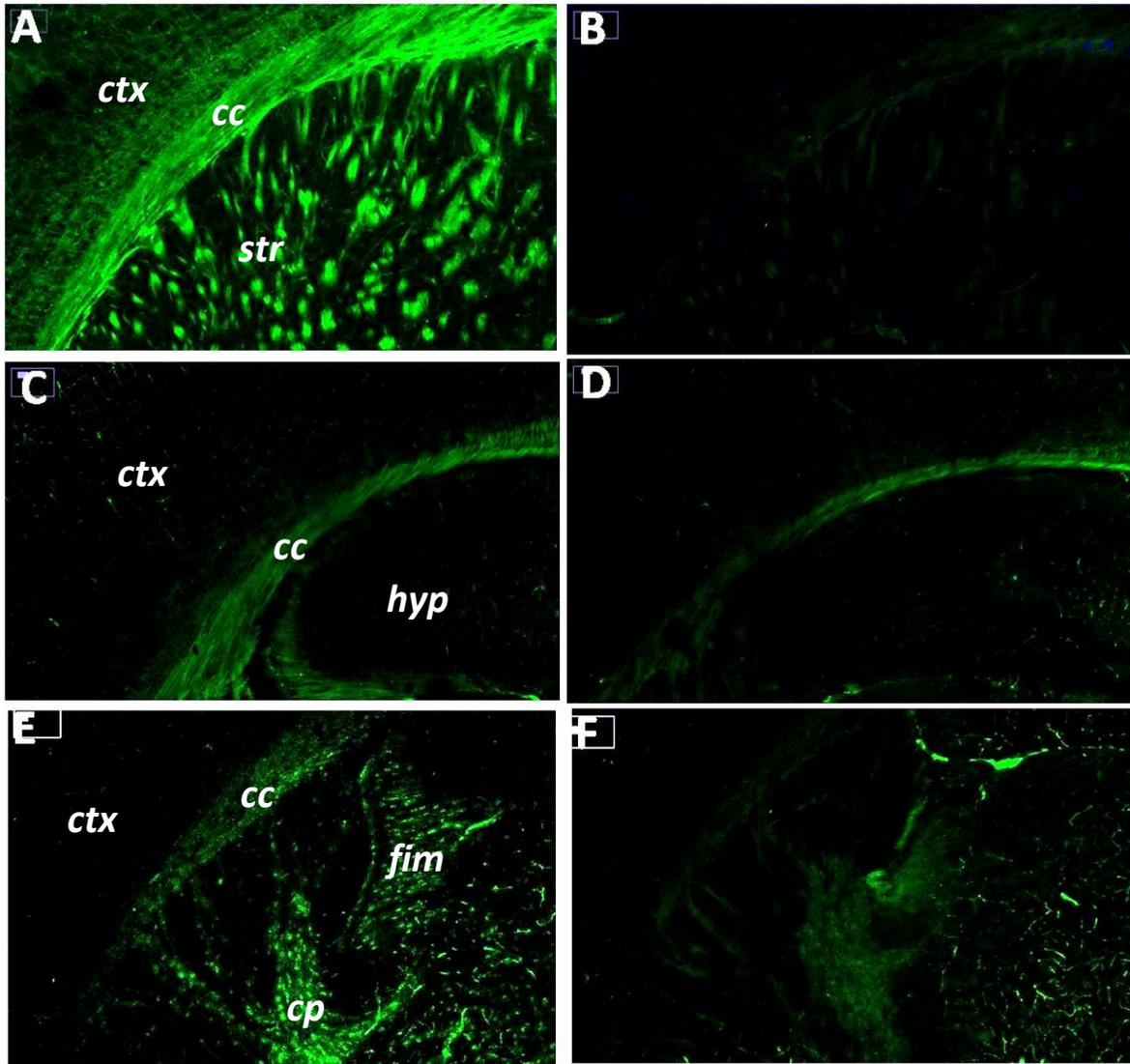


Figura 18. Inmunohistoquímica contra MBP en ratones p12 $PrIr^{-/-}$ y $PrIr^{+/+}$. En esta figura se muestran cortes coronales de tres regiones cerebrales distintas y en todas se observa que la cantidad de MBP (verde) es menor en los ratones $PrIr^{-/-}$. A, C y E, cortes representativos de

animales $Prnr^{+/+}$, donde se observan estructuras como el cuerpo calloso (**cc**), corteza cerebral (**ctx**), estriado (**str**), hipocampo (**hyp**), fimbria (**fim**) y el caudoputamen (**cp**). B, D y F, cortes representativos de animales $Prnr^{-/-}$, en la cual se muestran las mismas regiones y estructuras cerebrales, respectivamente.

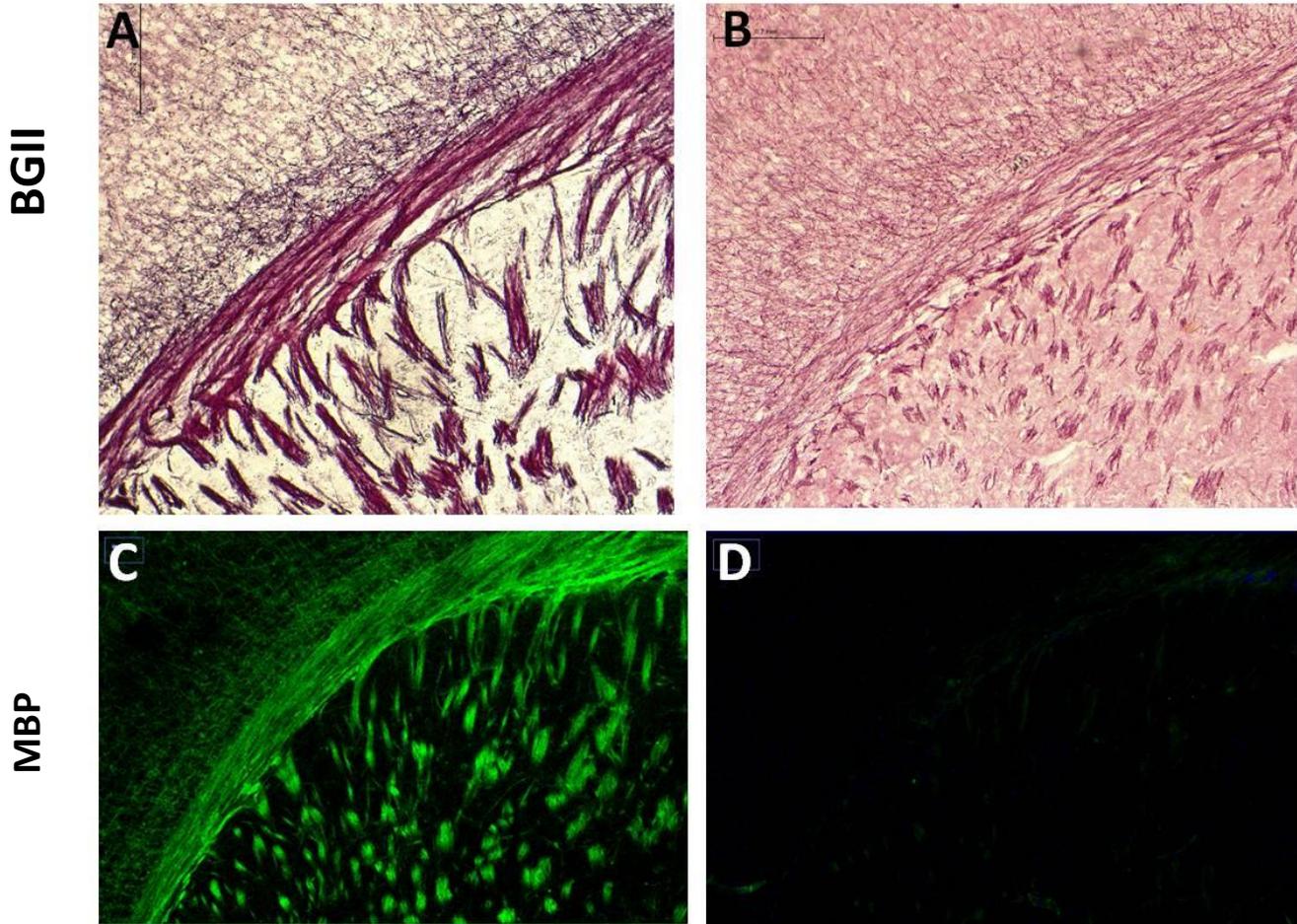


Figura 19. Los ratones $Prnr^{-/-}$ presentan menor cantidad de mielina. A, C, cortes representativos de animales $Prnr^{+/+}$; B, D cortes representativos de animales $Prnr^{-/-}$. Tanto con la técnica de BGII (la cual tiñe los lípidos de la mielina en rojo) y con la Inmunohistoquímica contra MBP (proteína presente en gran proporción en la mielina) es posible observar un patrón de hipomielinización en los ratones $Prnr^{-/-}$ con respecto a los $Prnr^{+/+}$ en P12.

1.6 Exploración motriz: la deficiencia de PRLR conduce a alteraciones en el equilibrio

Debido a los resultados obtenidos con las técnicas histológicas, y a las diferencias observadas en la cantidad de mielina que presentan los animales $\text{PrIr}^{-/-}$ en estructuras como el cuerpo caloso, decidimos explorar su coordinación motora en animales en P28. En este ensayo se contabilizó el tiempo que cada animal tarda en caerse después de ser colocado en el centro de la barra de equilibrio (ver metodología), se observó que los ratones $\text{PrIr}^{-/-}$ tardan 6 s aproximadamente (figura 20). Además, se contabilizó el número de caídas durante el tiempo que duró el experimento (1.5 min), se observó que los ratones $\text{PrIr}^{-/-}$ se caen 5 veces en promedio mientras que los animales $\text{PrIr}^{+/+}$ no se caen durante este intervalo de tiempo (figura 20 C). Estos resultados preliminares sugieren que los ratones $\text{PrIr}^{-/-}$ no son capaces de coordinar sus movimientos y se sospecha que aún presentan problemas en la mielinización como los observados en P12.

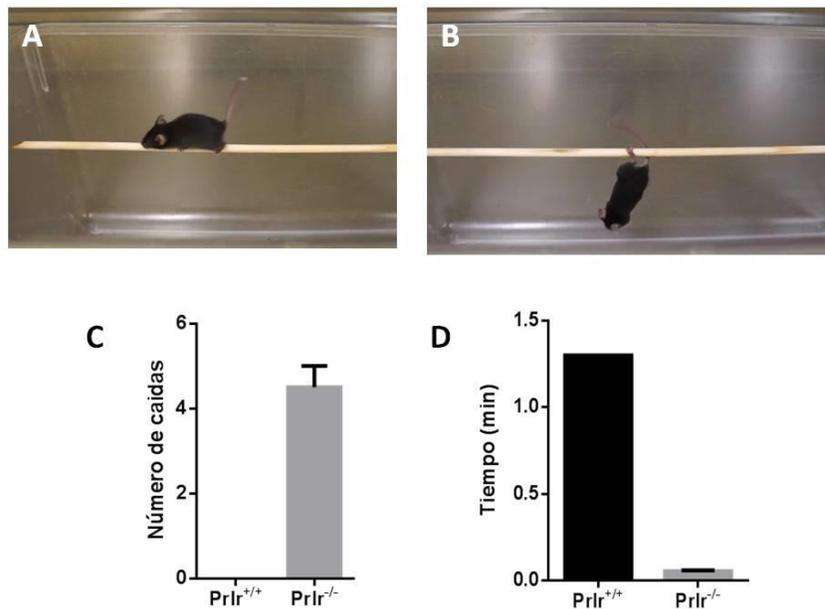


Figura 20. Ensayo de coordinación de los movimientos motores en la barra de equilibrio.

A) Ratón $\text{PrIr}^{+/+}$ coordinando todas sus extremidades para mantener el equilibrio. B) Ratón $\text{PrIr}^{-/-}$ sostenido con una sola extremidad a punto de caerse. C) Número de caídas durante un minuto y medio. D) Tiempo en que tardan en caerse por primera vez, $n=2$.

1.7 Exploración mediante RM: comparación entre $PrIr^{-/-}$ y $PrIr^{+/+}$

1.7.1 Difusión por Resonancia Magnética en muestras *ex vivo*

Otra manera de caracterizar el proceso de mielinización es por medio de imagenología por resonancia magnética (IRM) la cual permite visualizar diferentes regiones anatómico-estructurales. Por medio de imágenes sensibles a difusión es posible medir de manera indirecta la cantidad de mielina del SNC. De esta manera, a partir de las imágenes obtenidas por difusión, se obtuvo el mapa de la fracción de anisotropía (FA), además del mapa del vector principal de difusión y del coeficiente aparente de difusión (ADC). Con ésto, se escanearon cerebros de ratones P12 $PrIr^{+/+}$ y $PrIr^{-/-}$. Sin embargo, al realizar el análisis de las imágenes obtenidas, no se observó ninguna diferencia significativa en la FA y en el mapa de ADC en estructuras como el cuerpo caloso y el cíngulo (Figura 21).

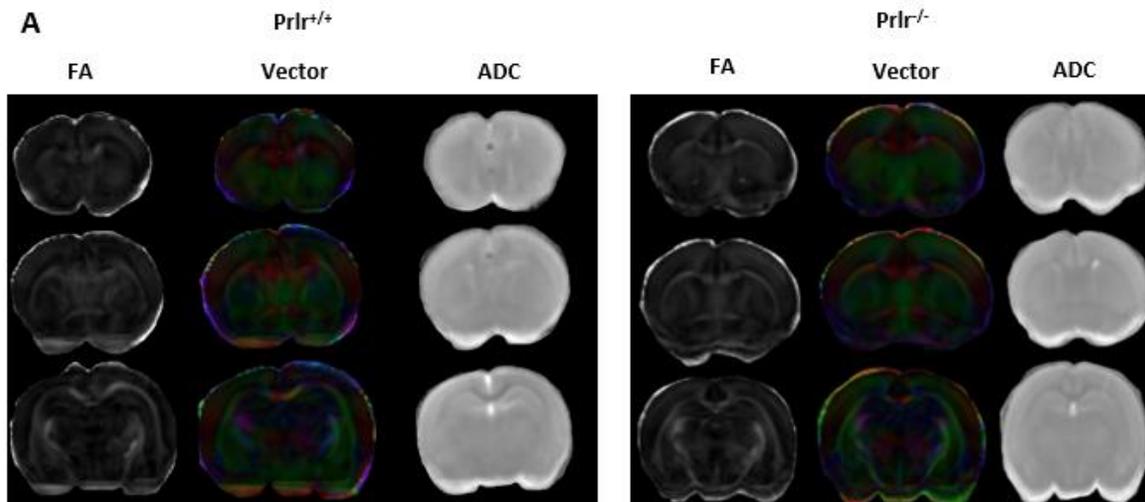


Figura 21. Análisis del mapa de la fracción de anisotropía (FA) y del coeficiente de difusión aparente (ADC) en animales P12 $PrIr^{+/+}$ y $PrIr^{-/-}$. A) En esta imagen se observan los mapas FA, del vector de movimiento (VECTOR) y de ADC tanto de animales $PrIr^{+/+}$ y $PrIr^{-/-}$. B y C muestran la cuantificación del índice de FA y ADC del cuerpo caloso, respectivamente. Exploración con $n=2$ en ambos grupos.

1.7.2 Difusión por Resonancia Magnética en modo in vivo

Mediante una exploración general con IRM, se tomó una pareja de ratones de edad p28 para cada grupo, PrI^{+/+} y PrI^{-/-}, y se obtuvieron imágenes de difusión. Además, el escaneo se hizo esta vez *in vivo*. De nuevo, a partir de la difusión se calculan los mapas cuantitativos de FA, PDV y ADC. En la figura 22 se muestran mapas representativos de FA y VPD, así como una cuantificación para estos grupos. Dado el tamaño muestral, no es posible medir diferencias entre grupos, sin embargo, existe ligera tendencia para todas las métricas calculadas; los valores de FA tienden a disminuir en los animales PrI^{-/-}, comparados con los PrI^{+/+} (Figura 22 E), mientras que los valores de ADC tienden a aumentar en los animales PrI^{-/-} (Figura 22 F). Por otro lado, teniendo en cuenta otros parámetros que también se han medido en contexto de mielinización, tales como las difusividades axial y radial, éstos también fueron medidos en ambos grupos. Los valores de ambas difusividades tienden a ser mayores en animales PrI^{-/-} que animales PrI^{+/+} (Figura 22 G, H). Más animales en edades avanzadas deben ser estudiados para apoyar este análisis y verificar si la tendencia es una diferencia significativa estadísticamente.

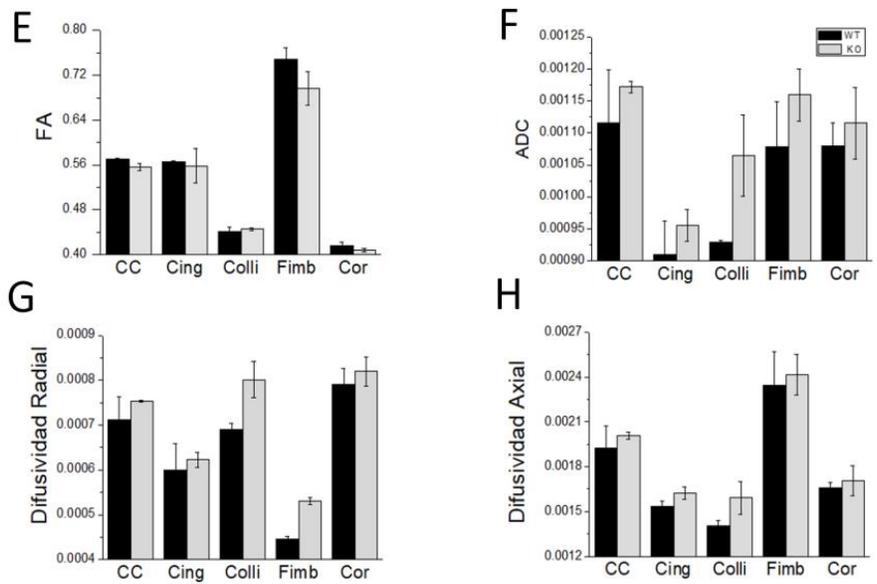
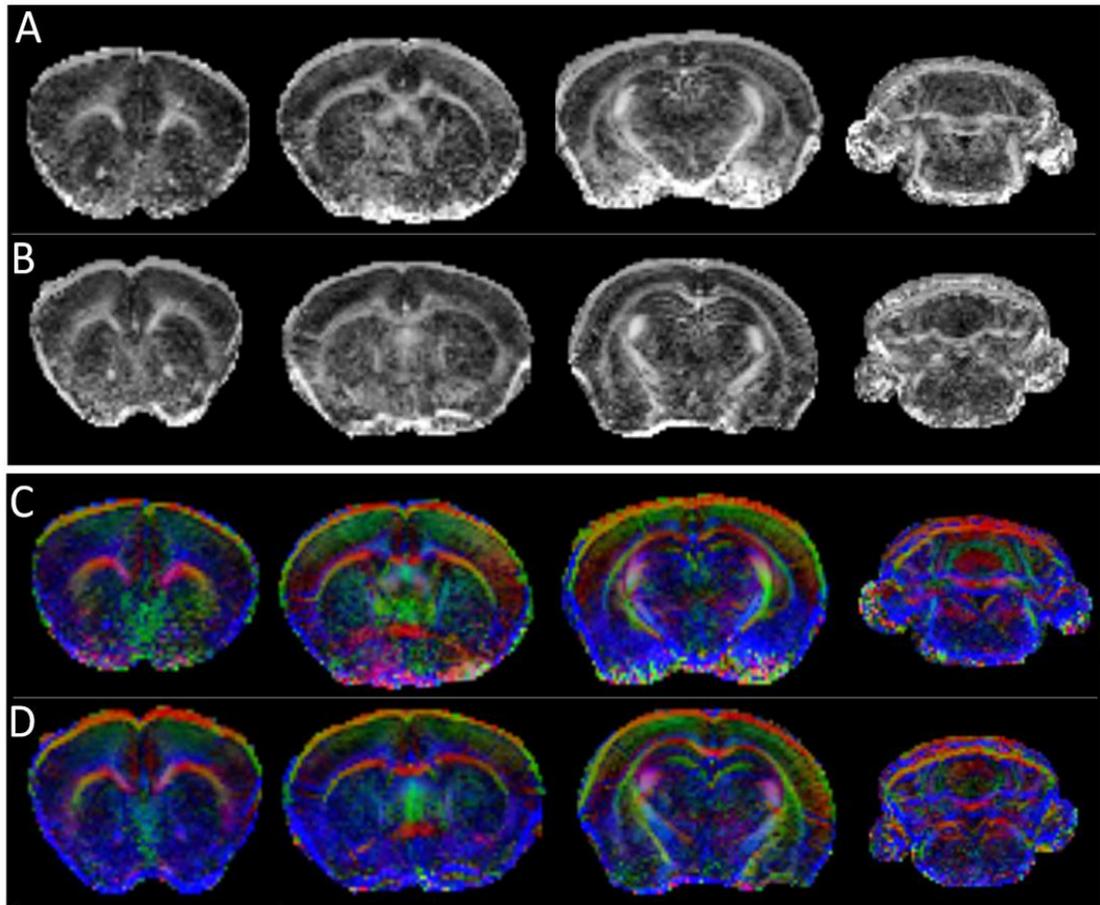


Figura 22. Análisis de imágenes sensibles a difusión en ratones por RM en ratones $Prlr^{-/-}$ y $Prlr^{+/+}$, p28. A) Mapas de la fracción de anisotropía de ratones $Prlr^{+/+}$, B) Mapas de la fracción de anisotropía de ratones $Prlr^{-/-}$. C) Mapa del vector de colores de ratones $Prlr^{+/+}$. D) Mapa del vector de colores de ratones $Prlr^{-/-}$. E) Cuantificación de la fracción de anisotropía (FA) en el

cuerpo calloso (CC), cíngulo (Cing), culiculo (Colli), fimbria (Fimb) y corteza (Cor). F) Cuantificación del coeficiente de difusión aparente (ADC). G) Cuantificación de la difusividad radial. H) Cuantificación de la difusividad axial, n=2.

Discusión

En el presente trabajo caracterizamos el papel que tiene la hormona prolactina en el proceso de mielinización durante la etapa postnatal en ratones. Esto por medio de la inhibición de la señalización molecular que desencadena esta hormona a través de sus receptores celulares, ya que se utilizó una línea transgénica de ratones de la cepa C57BL/6J que carecen del receptor de prolactina (Prlr^{-/-}). Nuestros resultados sugieren que PRL promueve el proceso de mielinización durante la etapa postnatal.

El proceso de mielinización del SNC de vertebrados es un evento determinante para la vida de los organismos mielinizados. Un defecto durante este proceso repercute en patologías desmielinizantes o hipomielinizantes, las cuales bajan la calidad de vida de quienes las padecen. Este tipo de patologías suele afectar la coordinación motriz, el equilibrio, la movilidad muscular, procesos cognitivos como memoria y aprendizaje, entre otros (McKenzie *et al.*, 2014). Por tal motivo en los últimos años se ha investigado los procesos celulares y moleculares que subyacen durante la mielinización, así como los factores necesarios para este proceso, como por ejemplo hormonas y neurotransmisores (Barateiro *et al.*, 2016).

La mielinización del SNC se da durante etapas específicas del desarrollo, en el caso de los mamíferos la etapa postnatal es crucial, ya que en esta etapa ocurre el primer y mayor pico de mielinización (Baumann & Pham-Dinh, 2001). Durante esta etapa ocurren distintos fenómenos del desarrollo relacionados con la lactancia. Como se conoce, una de las principales hormonas segregada a través de la leche materna es la prolactina, la cual está involucrada en diversos procesos fisiológicos, sobre todo de proliferación y diferenciación celular (Cabrera-Reyes *et al.*, 2017). En la leche materna la prolactina se encuentra en altas concentraciones, la cual se ha reportado que llega a la circulación de la crías, por lo que se sugiere que es la principal vía de obtención de esta hormona en las crías. También se ha visto que durante esta etapa las crías no son capaces de

producir prolactina endógena, ya que en el caso de los ratones no se ha podido medir concentraciones de esta hormona endógena hasta a partir de la tercer semana posterior al nacimiento.

Se ha demostrado que bajos niveles de prolactina en la leche materna, debido a una dieta alta en grasas, repercute de manera importante en las crías, causa obesidad, resistencia a la insulina y hiperinsulinemia (de los Ríos et al., 2018).

Existe evidencia de que la prolactina sistémica accede al líquido cefalorraquídeo, y desde ahí puede difundir a diferentes regiones cerebrales. En ratones, el proceso de transportación es independiente de sus receptores, por lo cual la prolactina sistémica puede llegar al SNC en ausencia de su receptor (Brown et al., 2016).

Hasta el momento solo se ha caracterizado el papel de esta hormona en el proceso de mielinización durante la etapa adulta, relacionado con la gestación y el comportamiento materno (C. Gregg et al., 2007). Por lo tanto, nos hemos enfocado en dilucidar el papel que tiene esta importante hormona de la lactancia en la etapa más crucial del proceso de mielinización.

Como primer objetivo evaluamos el volumen cerebral total y el volumen de una estructura con una densidad considerable de axones mielinizados, el cuerpo caloso, mediante histología con la técnica de tinción con violeta de cresilo. Como se conoce, la mielinización es uno de los principales factores del aumento del volumen cerebral posterior al nacimiento (Liu *et al.*, 2017). Encontramos que no hubo diferencias entre el volumen total cerebral pero si en la estructura del cuerpo caloso, los animales $PrIr^{-/-}$ presentaron menor volumen comparados con los animales silvestres indicando que este grupo de animales tenía menor cantidad de mielina.

Para determinar si la diferencia de volumen en el cuerpo caloso en los animales $PrIr^{-/-}$ era debido a una menor cantidad de mielina realizamos una tinción histológica específica para mielina llamada Black Gold II. De manera interesante observamos que había menor presencia de mielina en el SNC de los animales $PrIr^{-/-}$. Esto en diferentes cortes histológicos secuenciales representativos de distintas regiones cerebrales. Para saber si los resultados cualitativos correlacionaban con resultados cuantitativos medimos el área

de mielinización de estructuras como el cuerpo caloso y de la fimbria. Los resultados arrojaron que existe menor área de mielinización en los animales carentes del receptor de prolactina.

Estos resultados son conforme a lo esperado ya que se conoce que la prolactina promueve la proliferación de OPCs y la diferenciación a OLs mielinizantes durante la edad adulta, por lo que uno esperaría observar el mismo patrón durante la etapa postnatal, que en este caso sería una menor cantidad de mielina en los animales $\text{Prlr}^{-/-}$.

La mielina contiene alrededor de 70% de lípidos por peso seco, el porcentaje restante está conformado por conjunto de proteínas que residen dentro de la mielina compacta, de las cuales la proteína básica de la mielina (MBP) es una de las más abundantes. MBP es un buen indicador para observar la presencia o ausencia de mielina en el SNC. Como siguiente paso evaluamos la presencia de MBP por medio de inmunofluorescencia en nuestros grupos de animales experimentales. Observamos que en los animales $\text{Prlr}^{-/-}$ hay menor presencia de MPB comparado con los animales control. Con lo cual refuerza los hallazgos encontrados con la histología, que existe una menor cantidad de mielina en los animales carentes del receptor de prolactina.

Dados los antecedentes con los que se cuenta, de las evidencias que muestran que las células progenitoras de los oligodendrocitos (OPCs) presentan receptores a prolactina (C. Gregg et al., 2007) y con los resultados obtenidos en este trabajo, postulamos una serie de mecanismos que pudieran estar sucediendo. Primero, exista menor proliferación de OPCs y por tal motivo haya un menor número de OLs mielinizantes. Segundo, que no exista problemas en la proliferación de OPCs y que ambos grupos de animales cuenten con la misma cantidad de OPCs, pero que haya un problema en la diferenciación de estos a OLs mielinizantes y por tal motivo observemos menor cantidad de mielina. Tercero, Que ocurran ambos eventos, que existan problemas tanto en la proliferación y diferenciación de estas células, y por eso observemos un fenotipo hipomielinizante.

Otra manera de medir el grado de mielinización del SNC es por medio de la Resonancia Magnética, con la adquisición de imágenes sensibles a difusión. Por lo cual realizamos una exploración con nuestros grupos de animales en edad p12. Como se puede observar en los resultados no observábamos diferencias entre ambos grupos, aun utilizando

medios de contraste que potencian la señal adquirida. Dados los resultados mostrados anteriormente y los resultados obtenidos con esta misma técnica pero en edades posteriores (p28), en donde si bien no se muestran diferencias significativas se observa una tendencia esperada que los animales $\text{PrIr}^{-/-}$ tengan menor grado de mielinización, es posible que las secuencias de escaneo utilizadas no estén totalmente estandarizadas para detectar estos cambios en edades tempranas, ya que con las técnicas histológicas e inmunofluorescencia, las cuales son técnicas más finas, fue posible observar estos cambios en el grado de mielinización.

Si se observa una deficiencia en el proceso de mielinización, durante las etapas tempranas del desarrollo, como lo es la etapa postnatal, uno esperaría tener cambios conductuales. Ya que durante esta etapa se están reconfigurando y consolidando los circuitos neurales que se van a llevar durante toda la vida del animal. Por lo tanto nosotros hicimos estudios básicos de coordinación motora. El ensayo que realizamos fue el de la barra de equilibrio, que básicamente consiste en retar a los animales para que se mantengan en una superficie muy pequeña y sean capaces incluso de desplazarse sin caerse. En este ensayo los animales hacen uso de la coordinación de sus movimientos, y lo que se cuantificó fue el tiempo que tardan en la barra y el número de caídas. Este procedimiento lo hicimos de forma exploratoria ya que solo se contó con una $n=2$ por cada grupo. De manera interesante los resultados obtenidos muestran que los animales $\text{PrIr}^{-/-}$ presentan problemas para mantenerse en la barra, y por tal caso problemas en la coordinación de sus movimientos. Esto se ve reflejado en el número de caídas y el tiempo en el que duran en la barra. Este efecto sobre la hipomielinización observada en este grupo podría estar relacionado con cambios conductuales que tienen que ver con la coordinación de movimientos.

Conclusiones

La delección del receptor de PRL resulta en una menor área de mielinización en ratones de edad P12, comparada con ratones WT de la misma edad. Histológicamente fue posible determinar esta disminución, que representa un 50% de menor área mielinizada en los animales $\text{PrIr}^{-/-}$, principalmente en la zona del cuerpo caloso y fimbria.

Por otro lado, el inmunomarcaje para MBP establece que hay menor cantidad de MBP en los ratones $\text{PrIr}^{-/-}$ comparado con los $\text{PrIr}^{+/+}$. Lo cual sugiere que la cantidad de mielina en estos ratones es menor, en concordancia con lo observado con BGII, y esto apoya fuertemente nuestra hipótesis. Adicionalmente, la falta de mielina en los animales $\text{PrIr}^{-/-}$, promueve una reducción en el volumen del cuerpo caloso, comparado con los animales $\text{PrIr}^{+/+}$. Midiendo el volumen, los animales $\text{PrIr}^{-/-}$ tienen un volumen del cuerpo caloso hasta un 40% más pequeño que los animales $\text{PrIr}^{+/+}$.

La delección de PrIr sugiere daños que prevalecen hasta edades más avanzadas. Con la exploración conductual fue posible observar la conducta de ratones p28, que muestran deficiencias en el equilibrio y/o la coordinación de los movimientos en ratones $\text{PrIr}^{-/-}$. Sin embargo, más pruebas son necesarias para confirmar y validar cuantitativamente estas observaciones, al mismo tiempo que una correlación histológica es necesaria.

Finalmente, la técnica de imagenología de difusión por resonancia magnética puede ser utilizada para monitorear un fenotipo de hipomielinización. Mientras que en una evaluación *ex vivo* no se encontraron diferencias significativas en las métricas cuantificadas, se sugiere que en un estudio *in vivo* es más adecuado para determinar cambios inherentes de alteraciones en la mielina. De nueva cuenta, más estudios son necesarios para aumentar el tamaño muestral y correlacionar con los hallazgos histológicos.

En resumen, todos los datos juntos muestran o sugieren que la falta del PRLR promueve una disminución en la mielina en el SNC en etapas postnatales, cuyas repercusiones estructurales macroscópicas promueven una menor masa de tejido local. Además, esta hipomielinización se mantiene a edades posteriores, y podría repercutir en el comportamiento de los animales.

Bibliografía

- Arancibia-Carcamo, I. L., & Attwell, D. (2014). The node of Ranvier in CNS pathology. *Acta Neuropathologica*, 128(2), 161–175. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1305-z>
- Arellano, R. O., Sánchez-Gómez, M. V., Alberdi, E., Canedo-Antelo, M., Chara, J. C., Palomino, A., ... Matute, C. (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>
- Barateiro, A., Brites, D., & Fernandes, A. (2016). Oligodendrocyte Development and Myelination in Neurodevelopment: Molecular Mechanisms in Health and Disease. *Current Pharmaceutical Design*, 22(6), 656–679. <https://doi.org/10.2174/1381612822666151204000636>
- Barateiro, A., & Fernandes, A. (2014). Biochimica et Biophysica Acta Temporal oligodendrocyte lineage progression : In vitro models of proliferation , differentiation and myelination. *BBA - Molecular Cell Research*, 1843(9), 1917–1929. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.04.018>
- Baumann, N., & Pham-Dinh, D. (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>
- Bercury, K. K., & Macklin, W. B. (2015). Dynamics and mechanisms of CNS myelination. *Developmental Cell*, 32(4), 447–458. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.016>
- Bergles, D. E., & Richardson, W. D. (2016). Oligodendrocyte Development and Plasticity, 1–27.
- Binart, N., Ormandy, C. J., & Kelly, P. A. (2002). Mammary Gland Development and the Prolactin Receptor BT - Biology of the Mammary Gland. In J. A. Mol & R. A. Clegg (Eds.) (pp. 85–92). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/0-306-46832-8_10
- Bradl, M., & Lassmann, H. (2010). Oligodendrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1), 37–53. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0601-5>

- Brown, R. S. E., Wyatt, A. K., Herbison, R. E., Knowles, P. J., Ladyman, S. R., Binart, N., ... Grattan, D. R. (2016). Prolactin transport into mouse brain is independent of prolactin receptor. *FASEB Journal*, *30*(2), 1002–1010. <https://doi.org/10.1096/fj.15-276519>
- Cabrera-Reyes, E. A., Limón-Morales, O., Rivero-Segura, N. A., Camacho-Arroyo, I., & Cerbón, M. (2017). Prolactin function and putative expression in the brain. *Endocrine*, *57*(2), 199–213. <https://doi.org/10.1007/s12020-017-1346-x>
- Care, I. A., & Instruments, A. (2001). Motor Coordination and Balance in Rodents, 1–14. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0812s15>
- de los Ríos, E. A., Ruiz-Herrera, X., Tinoco-Pantoja, V., López-Barrera, F., Martínez de la Escalera, G., Clapp, C., & Macotela, Y. (2018). Impaired prolactin actions mediate altered offspring metabolism induced by maternal high-fat feeding during lactation. *The FASEB Journal*, *0*(0), fj.201701154R. <https://doi.org/10.1096/fj.201701154R>
- Emery, B. (2011). Regulation of Oligodendrocyte, *779*(2010). <https://doi.org/10.1126/science.1190927>
- Eric Kandel, James Schwartz, Thomas Jessell, Steven Siegelbaum, A. j. H. (2013). *Principles of Neural Science*.
- Graf, A. E., Lallier, S. W., Waidyaratne, G., Thompson, M. D., Tipple, E., Hester, M. E., ... States, U. (2017). HHS Public Access, 369–378. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.08.005.Maternal>
- Gregg, C., Shikar, V., Larsen, P., Mak, G., Chojnacki, A., Yong, V. W., & Weiss, S. (2007). White Matter Plasticity and Enhanced Remyelination in the Maternal CNS. *Journal of Neuroscience*, *27*(8), 1812–1823. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4441-06.2007>
- Gregg, Christopher. (2009). Pregnancy, prolactin and white matter regeneration. *Journal of the Neurological Sciences*, *285*(1–2), 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2009.06.040>
- Kanyicska, L. A., Lerant, A., Freeman, M. E., & Marc, E. (2000). Prolactin : Structure , Function , and Regulation of Secretion *MOLECULAR BIOLOGY*, *80*(4), 1523–1631.
- Lee, J. Y., & Petratos, S. (2016). Thyroid Hormone Signaling in Oligodendrocytes : from Extracellular Transport to Intracellular Signal. *Molecular Neurobiology*, 6568–6583. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0013-1>

- Lee, P. R., & Fields, R. D. (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>
- Li, H., & Richardson, W. D. (2008). The evolution of Olig genes and their roles in myelination. *Neuron Glia Biology*. <https://doi.org/10.1017/S1740925X09990251>
- Liu, H., Yang, Y., Xia, Y., Zhu, W., Leak, R. K., Wei, Z., ... Hu, X. (2017). Aging of cerebral white matter. *Ageing Research Reviews*, 34, 64–76. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.11.006>
- McKenzie, I. A., Ohayon, D., Li, H., Paes de Faria, J., Emery, B., Tohyama, K., & Richardson, W. D. (2014). Motor skill learning requires active central myelination. *Science*, 346(6207), 318–322. <https://doi.org/10.1126/science.1254960>
- Nave, K.-A., & Werner, H. B. (2014). Myelination of the Nervous System: Mechanisms and Functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30(1), 503–533. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013101>
- Norton, W. T., & Poduslo, S. E. (1973). MYELINATION IN RAT BRAIN: METHOD OF MYELIN ISOLATION. *Journal of Neurochemistry*, 21(4), 749–757. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1973.tb07519.x>
- Podbielska, M., Banik, N., Kurowska, E., & Hogan, E. (2013). Myelin Recovery in Multiple Sclerosis: The Challenge of Remyelination. *Brain Sciences*, 3(3), 1282–1324. <https://doi.org/10.3390/brainsci3031282>
- Radhakrishnan, A., Raju, R., & Tuladhar, N. (2012). A pathway map of prolactin signaling, 169–173. <https://doi.org/10.1007/s12079-012-0168-0>
- Schmued, L., Bowyer, J., Cozart, M., Heard, D., Binienda, Z., & Paule, M. (2008). Introducing Black-Gold II, a highly soluble gold phosphate complex with several unique advantages for the histochemical localization of myelin. *Brain Research*, 1229, 210–217. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2008.06.129>
- Watzlawik, J. O., Warrington, A. E., & Rodriguez, M. (2013). PDGF is Required for Remyelination-Promoting IgM Stimulation of Oligodendrocyte Progenitor Cell Proliferation, 8(2), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055149>

Zalc, B., Goujet, D., & Colman, D. (2008). The origin of the myelination program in vertebrates.
Current Biology. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.04.010>