



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM, CAMPUS JURQUILLA

**CARACTERIZACIÓN DE LA MIELINIZACIÓN EN EL SISTEMA
NERVIOSO CENTRAL DURANTE EL DESARROLLO POSTNATAL
EN RATONES CARENTES DEL RECEPTOR DE PROLACTINA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

ANA LUISA OCAMPO RUIZ

TUTORES:

DRA. YAZMÍN MACOTELA GUZMÁN
DR. ABRAHAM JOTSSEL 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 NEUROCIROLOGÍA

Juriquilla, Querétaro, junio de 2021



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.

*A mamá uno,
por siempre esperar mis regresos
con los brazos abiertos.*

MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN

Dra. Aurea Orozco Rivas	Presidente
Dr. Abraham Jotssel 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 Endocrinología Molecular y Neurofisiología Celular, 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 Ostoa. Además, contó con los financiamientos PAPIIT-DGAPA-UNAM IN203519 a ROA, IN209518 e IN207321 a YM y CONACYT 1771 a AC-M.

Agradecimientos académicos

La realización de esta tesis fue posible gracias al apoyo y la excelente disposición de cada uno de los encargados de las diversas áreas del Instituto de Neurobiología. Extiendo mi agradecimiento por la asistencia técnica en el bioterio al MVZ. José Martín García Servín y a las Dras. Alejandra Castilla León y María A. Carbajo Mata. De igual manera a la Dra. Deisy Gasca Martínez por el conocimiento compartido durante las sesiones en el departamento de conducta. Al Dr. Juan Ortiz Retana por la asistencia en el LANIREM. A la Ing. Elsa Nydia Hernández Ríos y a la Dra. Ericka Alejandra de los Ríos Arellano por el apoyo y asesoría en microscopía. Por último, por el acompañamiento teórico y experimental dentro de los laboratorios en donde se realizó este proyecto a las Dras. Xarubet Ruiz Herrera y Edith Garay Rojas y al Nut. Fernando López Barrera, así como a Daniel Mondragón y Antonio Prado por la asistencia técnica

Agradecimientos particulares

La adversidad mundial bajo la que se terminó de realizar esta tesis quedará marcada en la historia; por lo que en primer lugar agradezco al universo -o la entidad en la que quien lee esto crea- por haberme permitido cerrar este ciclo académico.

Agradezco infinitamente la tutoría y el acompañamiento tanto personal como académico de la Dra. Yazmín Macotela Guzmán y el Dr. Abraham J. Cisneros Mejorado, el trato humano y empático otorgado a lo largo de estos dos años facilitó mis labores curriculares y experimentales. Sin duda, el aprendizaje adquirido al estar cerca de ellos me llenó de herramientas muy valiosas para continuar en el camino científico. Al resto del comité tutor, las Dras. María Teresa Morales Guzmán y Penélope Aguilera Hernández por ayudarme a mejorar y consolidar el proyecto a través de sus observaciones y críticas constructivas.

Gracias también a mis compañeras de trinchera, Dina Vázquez y Areli Baez, por acogerme con cariño y paciencia desde el día uno de mi ingreso al laboratorio. Por formar una bonita comunidad de tres llena de empatía, complicidad, armonía, colaboración y sororidad. La relación formada entre nosotras va mucho más allá de lo académico. A mis amigos en la distancia y en la cercanía; a Gerson, Carolina y Julieta por seguir siendo parte de mí y permitirme crecer a lado de ellos, por no irse después de tantos años. A Alejandra, Rodrigo y Diego por formar esta microfamilia que permitió que los días académicos y pandémicos fueran más llevaderos y menos desolados.

El mayor agradecimiento es para mi familia; por el amor que me han brindado y la libertad que nunca me negaron para cumplir mis sueños, por motivarme a que cada uno de los días que paso lejos de ellos valga la pena, por seguir siendo mi muro de contención aún a kilómetros de distancia, por nunca soltarme. Por ser los amores de mi vida.

Índice

Resumen.....	1
Summary.....	2
Abreviaturas.....	3
1. Introducción.....	5
1.1. Mielinización en el sistema nervioso (SN)	5
1.1.1. Los oligodendrocitos durante el proceso de mielinización en el SNC.....	9
1.1.2. Reguladores de la mielinización.....	12
1.1.3. El papel de la prolactina durante la mielinización.....	17
2. Antecedentes.....	20
3. Justificación.....	21
4. Hipótesis.....	22
5. Objetivos.....	22
6. Metodología.....	23
6.1. Animales.....	23
6.2. Histologías, tinción con Black Gold II (BGII).....	23
6.3. Análisis de difusión por resonancia magnética	24
6.4. Pruebas conductuales	26
6.4.1. Campo abierto	26
6.4.2. Rotarrod	27
6.5. Análisis estadístico.....	27
7. Resultados.....	28
7.1. Histologías con tinción de Black Gold II(BGII).....	28
7.1.1. El cuerpo calloso de los ratones KO en P28 presenta hipomielinización.....	28
7.1.2. La fimbria de los ratones KO en P28 presenta hipomielinización.....	29
7.1.3. La cantidad de mielina en la corteza motora es la misma tanto en ratones WT como en KO en P28 y P56	31
7.2. Análisis de difusión por resonancia magnética	33
7.2.1. La ausencia del PRLR promueve una disminución en la fracción de	

anisotropía (FA) y en la difusividad axial (DA) medidas en la corteza motora de ratones en edad P56	33
7.3 Campo abierto	35
7.3.1 La distancia recorrida en campo abierto es menor en ratones KO en P28.....	35
7.3.2 La velocidad de movimiento en los episodios ambulatorios es menor en ratones KO en P28	36
7.3.3 El tiempo de exploración en el centro del campo abierto es menor en los ratones KO en P56.....	38
7.4 Rotarrod	39
7.4.1 Los ratones muestran el mismo desempeño durante la prueba en rotarrod tanto en P28 como en P56	39
8. Discusión	40
9. Conclusiones	44
10. Esquema del mecanismo propuesto de la acción de PRL en la Mielinización.....	45
11. Referencias bibliográficas	46

Resumen

En el Sistema Nervioso Central (SNC), la mielinización es la formación de capas concéntricas de la membrana de los oligodendrocitos alrededor de los axones neuronales; la mielina acelera la conducción de los potenciales de acción permitiendo el ensamble de los circuitos neuronales. La prolactina (PRL) regula la mielinización. En hembras de ratón gestantes, cuando los niveles de PRL son elevados, existe una alta tasa de proliferación de las células precursoras de oligodendrocitos (OPCs) así como en la producción de la mielina. De igual manera, el tratamiento con PRL estimula la reparación de la mielina en un modelo de desmielinización en médula espinal. Además, en un trabajo de nuestro grupo se demostró que ratones neonatales (P12) carentes del receptor de prolactina (PRLR-KO) presentan hipomielinización en cuerpo calloso (CC) y fimbria. Por lo que en este trabajo exploramos si este fenotipo de hipomielinización se extiende a edades del desarrollo posteriores y si se correlaciona con alteraciones conductuales. Para esto, evaluamos la mielinización en ratones PRLR-KO en P28 y P56, mediante tinciones con Black Gold II (BGII) e imágenes de difusión por resonancia magnética (dMRI), así como la conducta de los animales mediante prueba de campo abierto y rotarod. Las histologías mostraron que la condición hipomielinizante en CC y fimbria se mantiene en P28. Además de esto, el análisis mediante dMRI reveló cambios significativos en ratones PRLR-KO en P56, con disminución en el valor de la fracción de anisotropía y en la difusividad axial de la corteza motora comparada con los ratones silvestres, sugiriendo así alteraciones en la microestructura axonal. Por su parte, el análisis conductual mostró que los ratones PRLR-KO en P28 comparados con los silvestres (PRLR-WT), recorren menos distancia y presentan menor velocidad de movimiento, mientras que los de edad P56 gastan menos tiempo en el cuadrante del centro del campo abierto. En conjunto, todos estos resultados sugieren fuertemente que la hipomielinización temprana en ratones PRLR-KO tiene consecuencias a largo plazo en el desarrollo del sistema nervioso central.

Summary

Myelination is the formation of concentric sheets of oligodendrocyte cell membrane surrounding neuronal axons; myelin accelerates action potential conduction allowing the assembly of complex neural circuits. Evidence suggests that prolactin (PRL) has a regulatory role in myelination. In pregnant mice, when PRL levels are elevated, there is a higher rate of oligodendrocyte precursor cell proliferation and myelin production. Also, systemic PRL treatment fosters myelin repair in a model of spinal cord demyelination. Moreover, we have shown that neonatal mice (P12) with PRL receptor (PRLR) deficiency (knockout: PRLR-KO) present hypomyelination in the corpus callosum and fimbria areas. Here, we explored whether this phenotype extends to older ages and impacts behavioral outcomes. To this end, we evaluated PRLR-KO mice myelination, at P28 and P56, staining with Black Gold II (BGII), diffusion-weighted magnetic resonance imaging (dMRI), and explored possible behavioral alterations using open field and rotarod tests. BGII staining showed that the hypomyelinating condition in CC and fimbria is maintained in p28 animals. dMRI analysis revealed significant changes in PRLR-KO at P56, with decreased values of fractional anisotropy and axial diffusivity in the motor cortex area compared to WT mice, suggesting alterations in the axonal microstructure. Behavioral analysis showed that PRLR-KO mice at P28, compared to their WT pairs, traveled less distance and had a lower speed of movement, while at P56 explored less time at the center of the open field. Together, these results strongly suggest that early hypomyelination in PRLR-KO mice has long-term consequences in SNC development.

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

BGII: Black Gold II

BMP: proteínas morfogenéticas óseas

CC: cuerpo calloso

CRH: hormona liberadora de corticotropina

CM: corteza motora

CP: caudoputamen

CPN: células progenitoras neurales

CNPase: 2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa

CPZ: cuprizona

CXCL1: ligando astrocítico CXC tipo 1

dMRI: imágenes sensibles a difusión en resonancia magnética

DA: difusividad axial

DR: difusividad radial

DTI: tensor de difusión

E2: 17- β estradiol

EAE: encefalomiелitis aguda experimental

EM: esclerosis múltiple

FA: fracción de anisotropía

FCS- α : factor derivado de células estromales tipo alfa

FGF-2: factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2

GalC: galactocerebrósido

IFN- γ : interferón gamma

IGF-1: factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1

IL-17A: interleucina 17 A

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-8: interleucina 8

IO: intensidad óptica

IR: intensidad relativa

JAK2: janus cinasas 2

KO: knockout

KO-PRLR: knockout para el Receptor de Prolactina

KV: canales de K⁺ dependientes de voltaje

LANIREM: Laboratorio Nacional Enfocado en Imagenología por Resonancia Magnética

LIF: factor inhibitorio de la leucemia

MAG: glicoproteína asociada a la mielina

MAPK: proteínas cinasa activada por mitógeno

MBP: proteína básica de la mielina

MOG: glicoproteína de la mielina del oligodendrocito

NaCl: Cloruro de sodio

NaV: canales de Na⁺ dependientes de voltaje

NE: norepinefrina

NT-3: neurotrofina 3

OG-8: oncogén relacionado con el crecimiento tipo 8

OLs: oligodendrocitos

OPCs: células precursoras de oligodendrocitos

PACAP: péptido activador del adenilato ciclasa hipofisiaria

P0: proteína cero

PDGF- α : factor de crecimiento α derivado de plaquetas

PDGFR- α : receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa

PFA: paraformaldehído

PI3K: fosfoinositol 3-quinasa

PLP: proteína proteolipídica

Pre-OL: preoligodendrocitos

PRL: prolactina

PRLR: receptor de prolactina

RM: resonancia magnética

ROIs: regiones de interés

SN: sistema nervioso

SNC: sistema nervioso central

SNP: sistema nervioso periférico

STAT: transductor de señales y activador de la transcripción

TE: tiempo de eco

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

THs: hormonas tiroideas

TR: tiempo de repetición

VIP: péptido intestinal vasoactivo

WT: wild type

1. Introducción.

La evolución del sistema nervioso (SN) de los vertebrados dio lugar a dos estrategias que en conjunto propiciaron el aumento en la velocidad de conducción de los impulsos nerviosos. Estas estrategias son 1) el incremento en el tamaño del axón junto con la disminución en la resistencia interior y 2) la disminución de la capacitancia a través de la mielinización (Nave et al., 2014). Estas características aportaron una gran ventaja evolutiva a los organismos, permitiéndoles responder de manera rápida a los estímulos del ambiente.

De manera particular, la mielinización, además de maximizar la velocidad de la conducción axonal, es vista también como sustrato para el control de la sincronización en las entradas de señales durante el desarrollo postnatal y en los circuitos neuronales adultos, además de participar en los mecanismos de plasticidad cerebral, en donde sufre reorganización estructural en respuesta a la actividad y así, esta mielinización dependiente de la experiencia, contribuye a la función motora, el aprendizaje espacial y motor, el comportamiento social, y las emociones afectivas (Long et al., 2021; Salzer et al., 2016).

1.1. Mielinización en el sistema nervioso

La mielinización es la formación de una envoltura de capas concéntricas de membrana celular, que permite el recubrimiento y aislamiento eléctrico de los axones neuronales. Este proceso se lleva a cabo tanto en el Sistema Nervioso Central (SNC) como en el periférico (SNP). En el SNC, son los oligodendrocitos los encargados de la mielinización, recubriendo hasta 30 diferentes axones al mismo tiempo, mientras que en el SNP las células de Schwann cumplen esta función envolviendo solamente a un axón a la vez (Salzer et al., 2016).

Ambos tipos celulares mielinizan a los axones por segmentos, teniendo así regiones de la membrana plasmática expuestas al espacio extracelular conocidas como nódulos de Ranvier (figura 1). Este tipo de organización incrementa la velocidad con

la que son conducidos los impulsos nerviosos mediante el mecanismo de conducción saltatoria (Salzer et al., 2016).

Las células mielinizantes tienen un reacomodo específico; dentro de los nódulos de Ranvier están presentes uniones paranodales especializadas que funcionan como sitios de anclaje entre los axones y este tipo de células gliales. Estas uniones sirven como barrera de difusión en la membrana, lo que promueve la acumulación de canales de Na^+ dependientes de voltaje (NaV , los principales efectores del potencial de acción) en los nódulos y los separa de los canales de K^+ dependientes de voltaje en las uniones juxtapanodales (figura 2). Debido a esta disposición, la densidad de NaV es 50 veces más alta en esta zona que en las regiones mielinizadas (internodos) (Salzer et al., 2016).

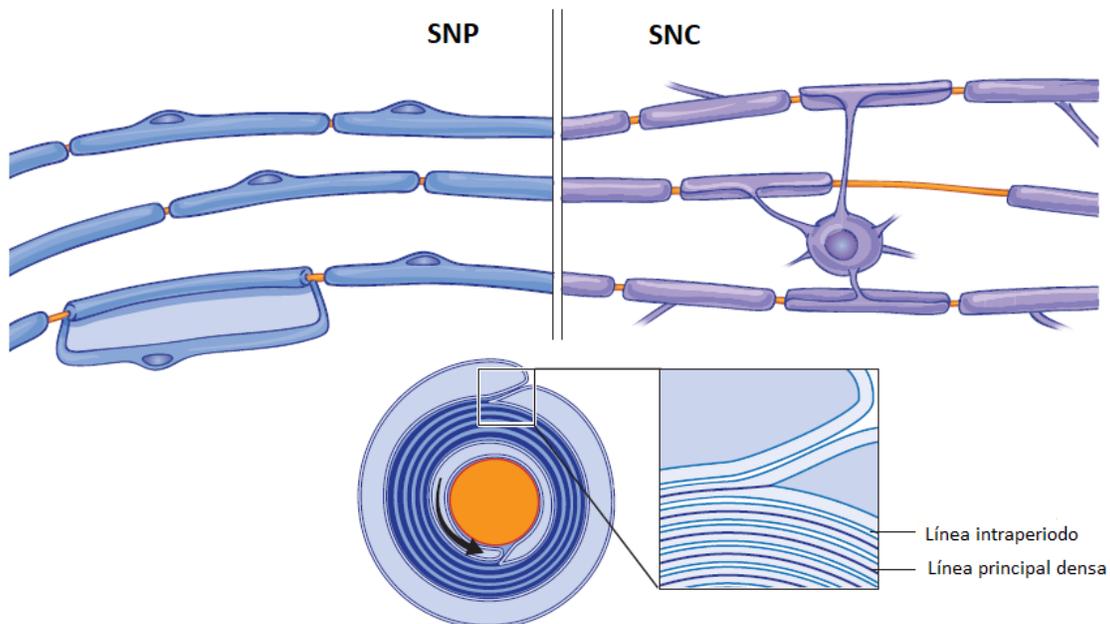


Figura 1. Comparación de la mielinización en el SNP y SNC. El esquema ejemplifica el proceso de mielinización en el sistema nervioso periférico (SNP) (lado izquierdo), el cual es realizado por las células de Schwann quienes son capaces de mielinizar a un segmento de un solo axón, mientras que en el sistema nervioso central (SNC) (lado derecho), el proceso es realizado por los oligodendrocitos que pueden recubrir segmentos de hasta 30 diferentes

axones al mismo tiempo. La compactación de las capas de mielina (abajo), forman estructuras entre las membranas conocidas como línea intraperiodo y línea principal densa (modificado de Salzer et al., 2016).

Las vainas de mielina están compuestas por aproximadamente 70% de lípidos, conteniendo altos niveles de ácidos grasos de cadena larga saturada, además de estar enriquecidas con glucoesfingolípidos (~20% de los lípidos totales) y colesterol (~40% de los lípidos totales). El 30% restante está integrado por proteínas (Salzer et al., 2016; Stadelmann et al., 2019). La composición protéica varía entre el SNC y el SNP, sin embargo, la proteína básica de la mielina (MBP), que se une a los fosfolípidos en el interior de la membrana plasmática neutralizando sus cargas, está presente en ambos (Salzer et al, 2016).

En el SNP se expresa, además, la P0 (proteína cero); una molécula de adhesión transmembranal que promueve la unión entre las capas de mielina, junto con la proteína hidrofóbica PMP22 (Salzer et al., 2015). Por otro lado, en el SNC está presente la proteína proteolipídica (PLP), que también actúa como proteína integral de membrana (Simons et al., 2016). La mielina formada por oligodendrocitos representa el 15% del peso total del cerebro de roedores y el 50% del de humanos (Salzer et al., 2016).

De manera interesante, tanto la MBP como la PLP, han sido implicadas como importantes autoantígenos contra los que puede reaccionar el sistema inmune y contribuir al desarrollo de la esclerosis múltiple; una enfermedad desmielinizante (Kandel et al., 2001).

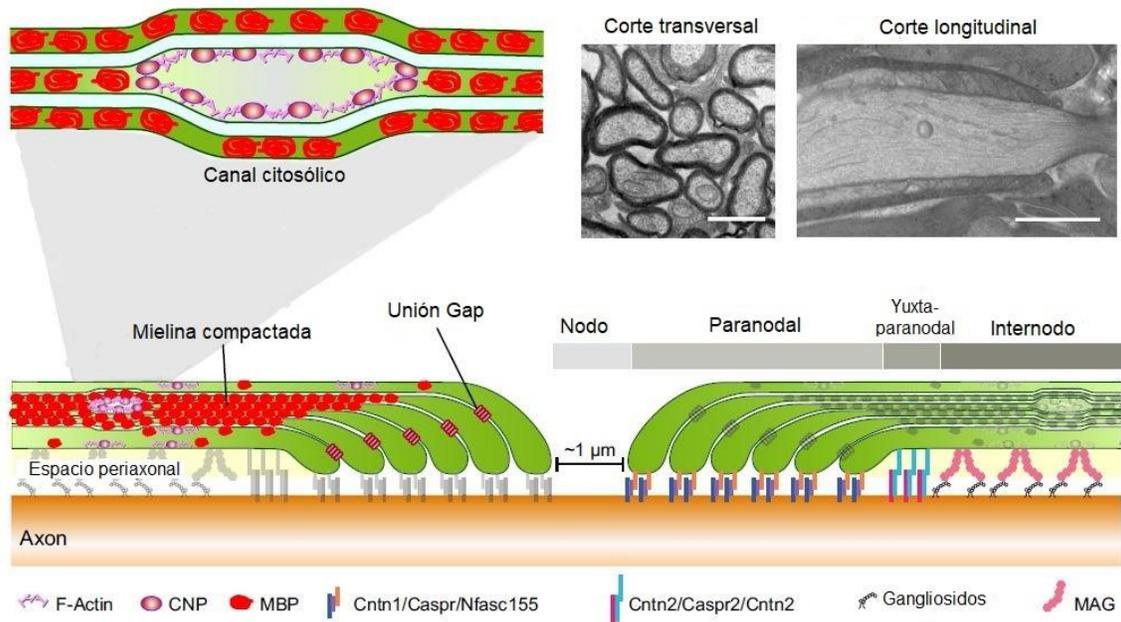


Figura 2. Organización de las zonas de mielinización en axones de SNC. En el esquema se presenta la estructura formada por las células mielinizantes del SNC, las cuales tienen zonas específicas dentro de las capas de mielina. Seguido a los nódulos de Ranvier (nodo), están presentes uniones paranodales que funcionan como sitios de anclaje entre los axones y las células gliales. Estas uniones sirven como barrera para la acumulación de NaV separándolos de los KV en las uniones yuxtaparanodales. La proteína básica de la mielina (MBP) es esencial en la formación de las capas de mielina al compactar superficies citoplasmáticas cercanas. 2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa (CNP) interactúa con la actina del citoesqueleto y contrarresta las fuerzas de unión de polimerización de MBP, generando así canales citoplasmáticos dentro de la vaina de mielina. Las uniones Gap conectan los bucles paranodales en los bordes laterales de la mielina. La glicoproteína asociada a la mielina (MAG) se encarga de comunicar y unir al axón y la capa de mielina más interna que recubre la zona del internodo (modificado de Stadelmann, 2019).

1.1.1. Los oligodendrocitos durante el proceso de mielinización en el SNC

Durante el desarrollo embrionario, las células progenitoras neurales (CPN) dan origen a las células precursoras de oligodendrocitos (OPCs), quienes migran desde la zona subventricular hacia el cerebro, en donde se diferencian a oligodendrocitos mielinizantes. Existen diferentes marcadores específicos que identifican a estas células a lo largo de su desarrollo y maduración. La figura 3 esquematiza la presencia de cada uno de estos durante el proceso de diferenciación (Kuhn et al., 2019). El papel del linaje oligodendroglial, además de ser fundamental para la formación y renovación de la mielina, es crítico para la regeneración de ésta cuando ocurre algún daño estructural, como por ejemplo en las lesiones que genera la esclerosis múltiple (EM) (Kuhn et al., 2019). Este proceso de mielinización ocurre durante un periodo de tiempo prolongado mismo que dependerá de la especie, por ejemplo, en humanos la proliferación y diferenciación de los OPCs sucede durante las semanas 10 y 41 de gestación, teniendo etapas con una alta tasa de mielinización durante el primer año de vida y posteriormente en la adolescencia, abarcando hasta dos décadas de vida con patrones de maduración específicos y siendo la corteza prefrontal la última en mielinizar (Mitew et al., 2014), mientras que por otra parte, en los ratones la proliferación de los OPCs inicia en el día embrionario 9 y la diferenciación a oligodendrocitos premielinizantes en el día postnatal 7, extendiéndose hasta los primeros dos meses de la vida postnatal (Barateiro et al., 2016; Baumann et al., 2001).

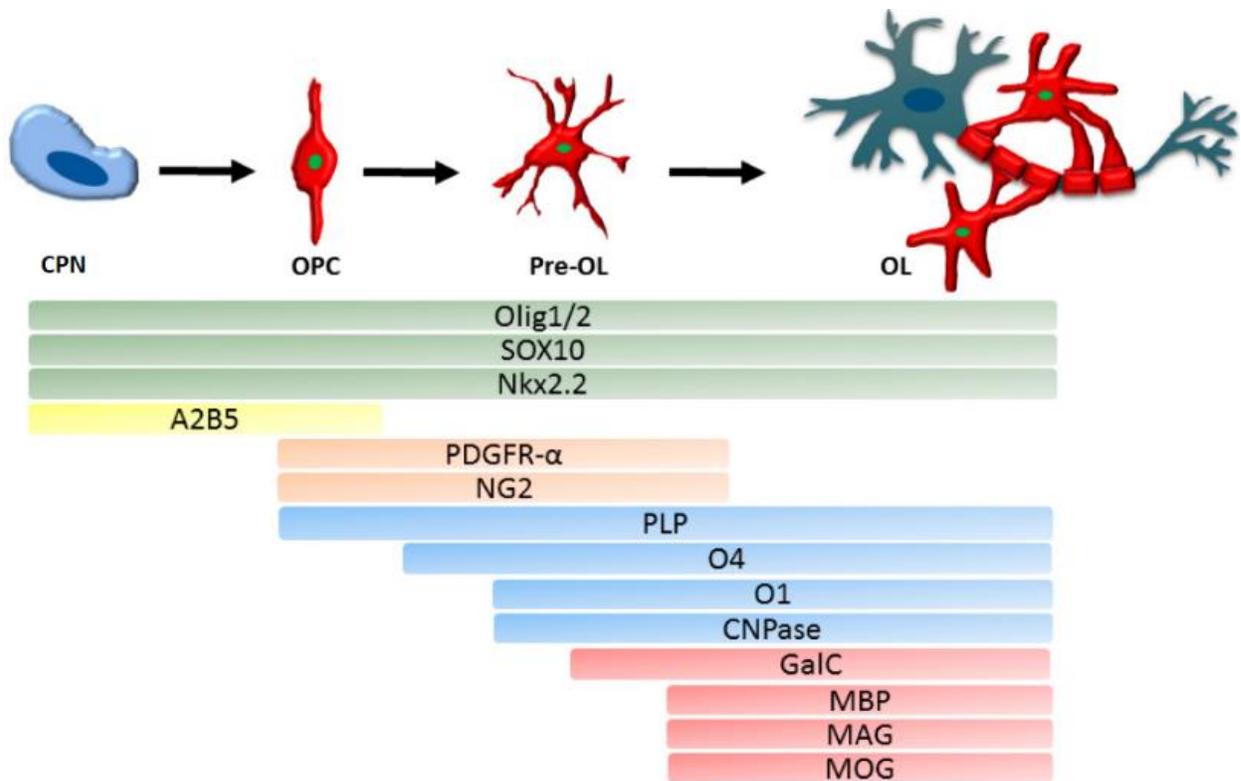


Figura 3. Marcadores del linaje oligodendroglial durante el proceso de maduración.

Esquema del desarrollo del linaje oligodendroglial a partir de células progenitoras neurales (CPN) hasta oligodendrocito mielinizante (OL). Los diferentes marcadores expresados en este linaje se indican con barras de colores según la etapa en la que inicia y termina su expresión. Todas las células expresan Olig1, Olig2, Sox10 y Nkx2.2, sin importar la etapa del desarrollo en la que se encuentren. Por su parte, A2B5 sólo está presente en las células progenitoras neurales (CPN) y células progenitoras de oligodendrocitos (OPCs), mientras que tanto en OPCs como en pre-oligodendrocitos (Pre-OL) se expresan PDGFR- α (receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa) y NG2. Por otro lado, durante la transición de progenitores a oligodendrocitos (OL) diferenciados se encuentran PLP (proteína proteolípida), O4, O1 y CNPase (2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa). Los oligodendrocitos maduros y mielinizantes se caracterizan por la expresión de proteínas de la mielina como MBP (proteína básica de la mielina), MAG (glicoproteína asociada a la mielina), MOG (glicoproteína de la mielina del oligodendrocito) y GalC (galactocerebrósido). La expresión de los genes que participan en la mielinización dependerá del contacto que establezcan con la membrana axonal (modificado de Kuhn et al., 2019).

Una vez que los oligodendrocitos (OLs) establecen contacto con los axones de las neuronas, en la membrana de estos ocurren recambios moleculares que aumentan el transporte de ARNm y la traducción de proteínas, generando una reorganización en el citoesqueleto. Junto con estos cambios se establece una polarización de las células mielinizantes hacia los axones, lo que conlleva a la expansión de la membrana (figura 4) (Barateiro et al., 2016; Nave et al., 2014). En el desarrollo postnatal, la membrana de mielina puede crecer $5000 \mu\text{m}^2$ por día y formar hasta 160 capas en un oligodendrocito maduro (Nave et al., 2014). La compactación de estas capas requiere de proteínas de adhesión especializadas y de la remoción de moléculas que previenen la compactación. Inicialmente, la superficie intracelular de los oligodendrocitos es inhibitoria para la agregación debido a la alta carga de fosfolípidos como PIP2. Sin embargo, la superficie cargada negativamente atrae proteínas básicas tales como MBP que muestra alta afinidad para PIP2, por lo que MBP neutraliza a la membrana y se encarga de unir a dos bicapas formando así la línea principal densa (figura 1), permitiendo el crecimiento de la mielina (Nave et al., 2014).

Como se ha mencionado, el proceso de mielinización es complejo por lo que necesita de reguladores tales como factores de crecimiento, neurotransmisores y hormonas, que permiten que los procesos de proliferación, diferenciación y maduración se lleven a cabo de manera adecuada (Long et al., 2021).

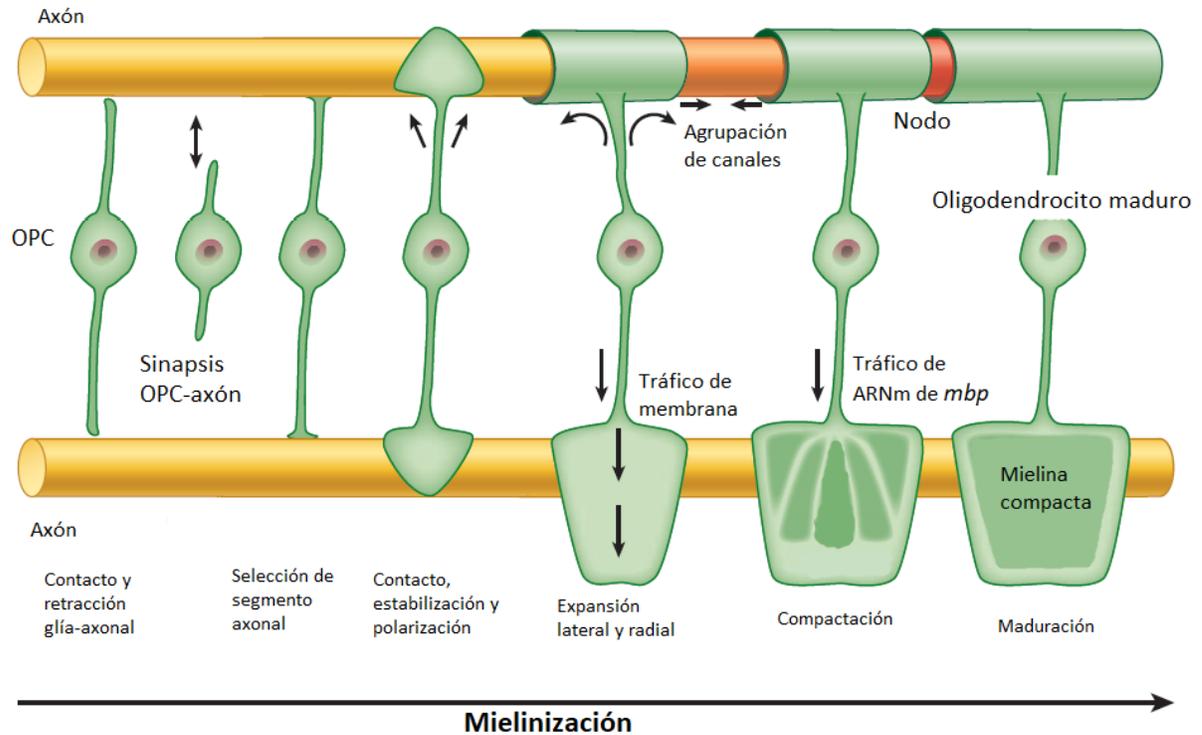


Figura 4. Modelo esquemático de la diferenciación de una célula progenitora de oligodendrocitos (OPCs) hacia oligodendrocito mielinizante. Al llegar al cerebro, los OPCs establecen contacto con las membranas axonales lo que provoca recambios moleculares convirtiéndolas en oligodendrocitos premielinizantes. La extensión de la membrana alrededor del axón inicia, se compacta y provoca la agrupación de los canales de NaV en los nódulos de Ranvier (modificado de Nave & Werner, 2014).

1.1.2. Reguladores de la mielinización

En los mamíferos, el proceso de mielinización inicia durante la embriogénesis y continúa a través de la infancia y la vida adulta. Las últimas semanas de gestación y los primeros meses postnatales son periodos cruciales para la maduración de la materia blanca, haciendo vulnerables a los organismos ante cualquier daño o alteración que se pudiera presentar durante estas etapas. Diferentes mecanismos de proliferación, diferenciación, supervivencia y maduración son coordinados tanto en OPCs como en OLs, además de los procesos necesarios para el reconocimiento apropiado hacia los axones neuronales que determinan la síntesis y transporte de los componentes de la mielina hacia la membrana externa de las células mielinizantes (Barateiro et al., 2016).

Existen señales moleculares tanto intrínsecas (intracelulares) como extrínsecas (extracelulares) que determinan los tiempos y momentos pertinentes en los que se llevarán a cabo cada una de las etapas del desarrollo oligodendroglial. Como parte de los moduladores intrínsecos se conocen factores de transcripción pertenecientes a la familia Sox (Sox8, Sox9 y Sox10) y los genes Olig (Olig1 y Olig2). De manera particular Sox9 está involucrado con la especificación de OLs, Sox8 participa en la parte final de la diferenciación y Sox10 estimula la maduración. En el caso de la familia Olig; Olig2 tiene papel importante en la estimulación de células progenitoras neurales multipotentes de embriones y adultos, además de ser regulado al alza durante el daño agudo cerebral, mientras que Olig1 está implicado en la maduración y en las etapas finales de la producción de mielina, así como en la remielinización (Barateiro et al., 2016).

Con lo que respecta a los moduladores extrínsecos, hasta ahora se conoce la participación de factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas y hormonas. Dentro de los factores de crecimiento que intervienen se encuentran el factor de crecimiento α derivado de plaquetas (PDGF- α) (Noble et al., 1988; Richardson et al., 1988), factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 (FGF-2), factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1) (Barateiro et al., 2016) y neurotrofina 3 (NT-3) (Barateiro et al., 2016; McTigue et al., 1998), los cuales se encargan de mantener la supervivencia de los OPCs y de inducir su diferenciación hacia OLs mielinizantes. Además de esto, se conocen algunos factores inhibitorios como las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) secretadas por los astrocitos que evitan la diferenciación de los OPCs (See et al., 2009; See et al., 2004). Se ha registrado la participación de diversas citocinas y quimiocinas tales como interferón γ (IFN- γ), interleucina 1 β (IL-1 β), factor de crecimiento transformante (TGF- β), factor inhibitorio de la leucemia (LIF), interleucina 17 A (IL-17A), oncogén relacionado con el crecimiento tipo 8 (OG-8), interleucina 8 (IL-8), factor derivado de células estromales tipo α (FCS- α) y el ligando astrocítico CXC tipo 1 (CXCL1), quienes también se encargan de estimular tanto la proliferación de OPCs como la inhibición dando paso a los procesos de diferenciación y producción de mielina (Barateiro et al., 2016).

Por otra parte, las hormonas también juegan un papel importante en el proceso de mielinización. Algunos de los neuropéptidos involucrados son la hormona liberadora de corticotropina (CRH) que eleva los niveles de AMPc en OPCs, molécula que regula la tasa de aceleración en la maduración hacia OLs en cultivo e induce la expresión de proteínas de la mielina (Wiemelt et al., 2001), norepinefrina (NE) quien mediante sus receptores β adrenérgicos inhibe la proliferación de OPCs e induce la diferenciación (Barateiro et al., 2016), el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y péptido activador del adenilato ciclasa hipofisiaria (PACAP), quienes se unen al receptor VPAC2 el cual mediante análisis transcriptómicos se ha visto enriquecido en OPCs. Además, el PACAP incrementa la proliferación de OPCs de ratas y participa en la reparación de mielina *in vivo e in vitro* (Barateiro et al., 2016). Las hormonas sexuales son otro de los grupos que participan en el desarrollo del Linaje oligodendroglial. Los estrógenos, específicamente el 17- β estradiol (E2) promueve la proliferación y la diferenciación tanto en CPN como en OPCs y la maduración de OLs (Okada et al., 2010). La progesterona también actúa estimulando la proliferación y maduración de los OPCs y promueve además la expresión de MBP (Long et al., 2021). Los andrógenos por su parte incrementan la proliferación de las CPN en cultivos y al mismo tiempo pueden actuar como activadores de muerte celular (Long et al., 2021). La melatonina tiene acción neuroprotectora contra el daño en la materia blanca además de participar en la diferenciación de CPN a OLs y estimular la maduración de estos (Long et al., 2021). De igual manera en ratas, la insulina promueve diferenciación de CPN hacia OLs, permitiendo también la supervivencia de estas células en cultivos (Long et al., 2021). Las hormonas tiroideas (T3 y T4) (THs) participan durante las etapas tempranas regulando la diferenciación y muerte celular, además de tener acción directa sobre el mantenimiento de las CPN estimulando la proliferación. Las THs promueven la maduración morfológica y funcional de OLs a través de interacciones con regiones promotoras y reguladoras de la transcripción de genes que participan en la formación de la mielina (Baas et al., 1997; Long et al., 2021; Younes-Rapozo et al., 2006).

De manera interesante, existen reportes de la acción de prolactina (PRL) en el desarrollo del linaje oligodendroglial. Se ha demostrado que estimula la proliferación y diferenciación de OPCs, incrementando el número y tamaño de neuroesferas y aumentando la proporción de OLs en cultivos celulares (Gregg et al., 2007). Aunado a esto, tanto la proliferación como la maduración de los OLs, la expresión de MBP y el número de axones mielinizados se ve incrementado en ratones gestantes, en donde los niveles de PRL son más elevados (Gregg et al., 2007). Además, la administración de PRL exógena en hembras vírgenes incrementa la proliferación de OPC y potencializa la remielinización (Gregg et al., 2007). La tabla 1 resume la participación de cada uno de estos reguladores en el proceso de mielinización.

Tabla 1. Reguladores de la mielinización.

Regulador		Actividad
Factores de transcripción	Sox 8	Diferenciación hacia OLs (Barateiro et al., 2016).
	Sox9	
	Sox10	Maduración de OLs (Barateiro et al., 2016)
	Olig1	
	Olig2	
Factores de crecimiento	PDGF- α	Estimula la proliferación de OPCs y previene diferenciación prematura (Noble et al., 1988; Richardson et al., 1988).
	FGF-2	Estimula la proliferación de progenitores, mantiene la expresión de PDGFR- α y bloquea la diferenciación (Barateiro et al., 2016).
	IGF-1	Promueve la síntesis de ADN en OPC y la proliferación <i>in vitro</i> (Barateiro et al., 2016).
	NT-3	Estimula proliferación de OPCs <i>in vivo</i> (Barateiro et al., 2016; McTigue et al., 1998).
	BMP	Inhibe diferenciación hacia OLs maduros (See et al., 2009; See et al., 2004).
Citocinas y quimiocinas	IL1- β TGF- β	Inhiben la proliferación de OPCs y potencializa su diferenciación a OLs (Barateiro et al., 2016).
	IFN- γ	Inhibe la diferenciación de OPCs a OLs (Barateiro et al., 2016).
	LIF	Estimula proliferación de OPCs, diferenciación y maduración de OLs (Barateiro et al., 2016).
	IL17-A	Estimula la diferenciación de OPCs e incrementa la expresión de PLP (Barateiro et al., 2016).
	OG-8 IL8	Estimula la producción de MBP (Barateiro et al., 2016).
	FCS- α	
	CXCL1	Potencia la respuesta proliferativa a PDGF- α (Barateiro et al., 2016).
Hormonas	CRH	Eleva niveles de AMPc en OPCs (Wiemelt et al., 2001).
	NE	Inhibe la proliferación de OPCs e induce su diferenciación a OLs (Barateiro et al., 2016).
	PACAP	Incrementa proliferación en OPCs y participa en la reparación de mielina (Barateiro et al., 2016).
	E2	Estimula proliferación de CPN y OPCs y maduración de OLs (Okada et al., 2010).
	Andrógenos	Incrementa proliferación de CPN (Long et al., 2021).
	Melatonina	Neuroprotector. Participa en la diferenciación de CPN y estimula la maduración de OLs (Long et al., 2021).
	Insulina	Promueve diferenciación de CPN hacia OLs (Long et al., 2021).
	THs	Estimulan la proliferación de CPN, promueven maduración morfológica y funcional de OLs (Baas et al., 1997; Long et al., 2021; Younes-Rapozo et al., 2006).
	PRL	Estimula proliferación de OPCs, maduración de OLs y remielinización (Gregg et al., 2007).
Progesterona	Promueve proliferación y maduración de OPCs además de la expresión de MBP (Long et al., 2021).	

1.1.3. El papel de la prolactina durante la mielinización

La prolactina (PRL) es una hormona pleiotrópica conocida principalmente por promover la lactancia, pero involucrada también en procesos de comportamiento sexual, cuidado parental, crecimiento, metabolismo, angiogénesis, inmunomodulación y osmorregulación (Clapp et al., 2009; Freeman et al., 2000; Macotella et al., 2020). La PRL circulante es secretada por las células lactotropas de la pituitaria anterior, sin embargo, algunos tejidos como glándulas mamarias, placenta y cerebro (corteza, amígdala, tálamo, e hipocampo) pueden producirla de manera local (Long et al., 2021)

La señalización de la prolactina inicia cuando esta es reconocida por su receptor (PRLR), miembro de la superfamilia de receptores de citocinas clase I. El PRLR está formado por un dominio de unión a ligando extracelular, un dominio transmembranal y uno más intracelular. Su activación involucra una dimerización inducida por la prolactina, que tiene dos sitios de unión que se acoplan a cada uno de los monómeros del receptor. La formación del primer complejo (PRL-PRLR) es requisito para la unión de la siguiente unidad (figura 5A) (Freeman et al., 2000; Radhakrishnan et al., 2012). El PRLR es expresado en múltiples isoformas, de manera particular en una forma larga y varias cortas, mismas que cuentan con un dominio extracelular idéntico a la isoforma larga pero con dominios citoplasmáticos cortos (Bridges et al., 2019).

La unión a ligando induce un cambio conformacional en el receptor y la activación de las Janus cinasas 2 (JAK2) asociadas al receptor, promoviendo la consecuente vía de señalización río abajo (Radhakrishnan et al., 2012). La activación completa de la señal de transducción de JAK2/STAT5 requiere de la isoforma larga del receptor, debido a que la isoforma corta carece de sitios de unión para las proteínas STAT. Una vez que se ha formado el complejo entre las dos unidades de receptor y la PRL, STAT5 es fosforilada por JAK2 desencadenando la formación de dímeros de STAT transcripcionalmente activos. Estos se translocan al núcleo, uniéndose a secuencias de ADN para activar la transcripción de genes blanco. Adicionalmente a la vía JAK/STAT, bajo algunas condiciones, la PRL puede activar la cascada de

transducción de señales de fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), así como la vía de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) (figura 5B) (Bridges et al., 2019).

Recientemente se ha reportado que la PRL tiene una participación importante dentro del SNC en procesos como neurogénesis, neurodesarrollo y neuroprotección (Cabrera-Reyes, et. al., 2017). Estos eventos han sido estudiados principalmente en roedores gestantes, en donde se ha observado que debido a los niveles elevados de PRL existe una alta tasa de proliferación de OPCs, mayor diferenciación de oligodendrocitos y un incremento en la producción de mielina en estructuras como el cuerpo calloso y la medula espinal (Gregg et al., 2007). Además, se ha visto que el tratamiento con esta hormona promueve la reparación de lesiones generadas en la médula espinal, en ratones hembra vírgenes (Gregg et al., 2007). De manera interesante, Confavreux y colaboradores reportaron que en mujeres con esclerosis múltiple (EM) los síntomas de la enfermedad se ven atenuados durante el embarazo, principalmente en el tercer trimestre de gestación, etapa en la que se ha observado que las recaídas de la enfermedad disminuyen, sugiriendo que los altos niveles de PRL durante el embarazo podrían participar en la remisión de los síntomas de la enfermedad (Confavreux et al., 1998). En concordancia, De Giglio y colaboradores reportaron que los niveles de PRL plasmática en las mujeres con EM correlaciona positivamente con el volumen de la materia blanca (De Giglio et al., 2015).

En conjunto, todos estos hallazgos sugieren a la prolactina como un blanco en el diseño de tratamientos terapéuticos para patologías desmielinizantes como la EM o la encefalomiелitis aguda diseminada. Sin embargo, a pesar de que se sabe sobre la importancia de la PRL en procesos de mielinización, no existen estudios que exploren sus efectos durante el desarrollo del sistema nervioso en etapas postnatales.

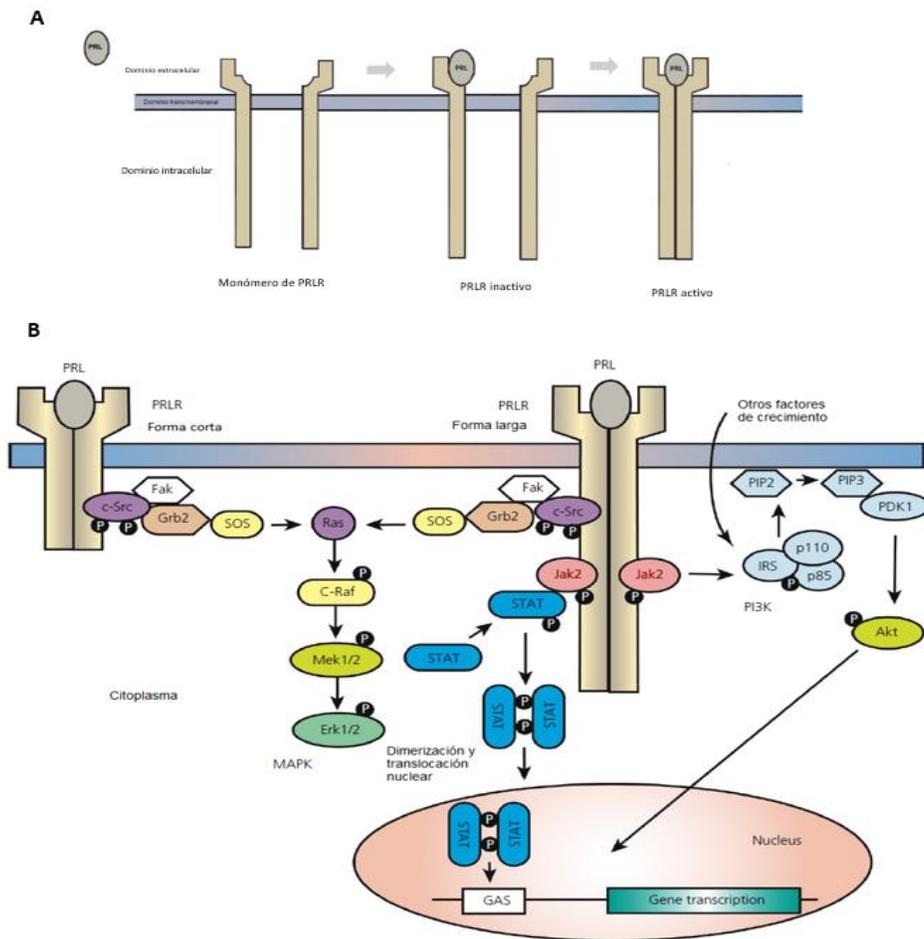


Figura 5. Representación esquemática de las vías de señalización mediadas por la acción de la prolactina. El receptor de prolactina está compuesto por dos subunidades conformadas por un dominio de unión a ligando extracelular, un dominio transmembranal y uno más intracelular. La molécula de prolactina tiene dos sitios de unión y al reconocer a la primera subunidad del receptor, induce la dimerización con la segunda subunidad generando así la forma activa del receptor e iniciando la cascada de señalización (A). La vía de señalización principal mediada por la acción de la prolactina es la vía Janus quinasa 2 (JAK2) /transductor de señales y activador de la transcripción (STAT), activada por la isoforma larga del receptor de prolactina (PRLR). La forma corta del receptor tiene dominios intracelulares cortos que carecen de sitios de unión a STAT, pero pueden activar la vía de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) de una manera independiente de JAK2. La forma larga puede también activar la vía de fosfoinositol 3-cinasa (PI3K) o al menos amplificar la respuesta a través de esta vía inducida por otros factores de crecimiento ((B) modificado de Bridges & Grattan, 2019).

2. Antecedentes

Estudios previos utilizando un modelo in vivo, han mostrado que, en hembras durante el período de gestación, existe una alta tasa de mielinización en el SNC en correlación con niveles elevados de PRL, mientras que, en hembras carentes de una copia del gen del PRLR (heterocigotas), se observó que los niveles de proliferación de los OPCs y las células mielinizantes maduras fueron inferiores a los registrados en las hembras silvestres. Al mismo tiempo, se ha observado que la PRL es capaz de promover la remielinización en un modelo de lesión desmielinizante, en ratones hembra vírgenes (Gregg et al., 2007). Por otra parte, en un estudio reciente de nuestro grupo, se observó que en una etapa temprana del desarrollo postnatal (P12), animales carentes del receptor de PRL (KO-PRLR), presentan una reducción del 50 % en el área de mielinización en estructuras como el cuerpo calloso (CC) y la fimbria, comparados con animales silvestres, evidencia que concuerda con observaciones de una disminución en la expresión de MBP en regiones del CC, estriado y caudoputamen (CP) (Dimas, 2019). Lo anterior deja claro el importante papel de PRL en la mielinización, por lo que son necesarias las investigaciones que detallen su participación en etapas posteriores del desarrollo, desde niveles celulares hasta de organismo completo.

3. Justificación

Tanto las enfermedades desmielinizantes (p.ej. esclerosis múltiple, encefalomiелitis aguda diseminada o leucoencefalopatías) como las dismielinizantes (p.ej. leucodistrofias, enfermedad de Krabbe y adrenoleucodistrofia) presentan cuadros clínicos relacionados con deterioro cognitivo y motriz, conduciendo a un declive en la calidad de vida -o incluso en la muerte- de quienes la padecen. Sin embargo, los tratamientos utilizados en este tipo de patologías, como los corticoesteroides o antiinflamatorios, no son específicos y atacan los síntomas más no la etiología, provocando efectos secundarios que potencian el deterioro en la salud. Además de esto, la mayoría de estas patologías comienzan a presentarse en la infancia, desde la etapa de lactancia hasta la adultez temprana.

Teniendo como antecedente que los niveles altos de PRL tanto en la etapa de gestación como durante el posparto, promueven la mielinización en el sistema nervioso (Gregg et al., 2007), y que en una etapa temprana del desarrollo postnatal (P12), en donde mediante la leche materna la PRL es transferida en grandes cantidades a los neonatos, favoreciendo la mielinización en algunas regiones del cerebro (Dimas, 2019), surge la pregunta de si la prolactina es esencial en el proceso de mielinización en el desarrollo postnatal (posterior a P12) de la progenie.

En este proyecto, se propuso caracterizar la participación de PRL en etapas posnatales posteriores a la lactancia y en la edad adulta temprana, lo cual contribuirá a la generación de conocimiento y a establecer las bases fisiológicas de la participación de PRL en este contexto de desarrollo neural, al mismo tiempo que proveerá de herramientas para que, a largo plazo, esta hormona pueda utilizarse en el diseño de agentes terapéuticos y/o coadyuve en el tratamiento de patologías de la sustancia blanca.

4. Hipótesis

Los ratones carentes (knockout) del receptor de prolactina presentan alteraciones en el proceso de mielinización en el sistema nervioso central durante el desarrollo postnatal posterior a la lactancia y en la vida adulta temprana.

5. Objetivo general

Evaluar el efecto de la ausencia del receptor de prolactina en la mielinización en el SNC de ratones en distintas etapas del desarrollo postnatal (jóvenes pre-púberes y adultos).

Objetivos particulares:

Evaluar en ratones WT y KO para el receptor de PRL de días postnatales 28 y 56:

1. La presencia de mielina en cortes histológicos de cerebros a través de la tinción con BGII.
2. La mielinización en el cerebro mediante un análisis de imágenes pesadas a difusión por resonancia magnética.
3. La capacidad motriz mediante pruebas conductuales.

6. Metodología

6.1. Animales

Los organismos experimentales utilizados fueron tratados de acuerdo con los lineamientos del Comité de Ética del Instituto de Neurobiología de la Universidad Autónoma de México. Se utilizaron machos y hembras de la cepa C57BL/6. Para su obtención se realizaron cruces entre ratones hembra heterocigotas para el receptor de prolactina (*Prlr+/-*) y ratones KO (*Prlr-/-*), heterocigotos (*Prlr+/-*), o WT (*Prlr+/+*). Las crías se genotipificaron mediante la obtención de muestras de ADN del tejido de la cola para posteriormente formar dos grupos experimentales; uno WT y otro KO. Los ratones fueron evaluados en el día postnatal 28 y 56 mediante las distintas estrategias metodológicas.

Las camadas experimentales fueron destetadas y separadas de acuerdo con el sexo en el día postnatal 23. Se formaron grupos de 5 ratones por caja y se mantuvieron en ciclo de luz oscuridad (6:00 a 18:00 luz; 18:00 a 6:00 oscuridad) hasta el día de experimentación.

6.2. Histología, tinción con Black Gold II (BGII)

BGII es una técnica utilizada para la tinción específica de mielina en el sistema nervioso. Se trata de un complejo de aurohalofosfatos que, al unirse con los fosfolípidos de la mielina, proyecta una coloración de rojo claro a rojo oscuro o negro, dependiendo de la densidad de fibras mielinizadas teñidas (Schmued et al., 2008). Este método se empleó para evaluar la presencia de mielina en algunas zonas del SNC en una región medial del encéfalo (-1.70 en Bregma). Cerebros de ratones en los días P28 y P56 fueron disecados para su procesamiento y análisis. La disección se hizo posterior a una fijación por perfusión con paraformaldehído (PFA) al 4%, misma que se llevó a cabo a partir del ventrículo izquierdo del corazón, introduciendo una aguja (23 G) por la que se perfundió primero solución tampón de fosfatos (PBS) durante 2 minutos y luego PFA durante 2 minutos más. Los cerebros disecados recibieron una post-fijación por inmersión en PFA 4% durante 24 horas.

Antes de la criosección, los tejidos fueron criopreservados por inmersión en gradiente de sacarosa: al 10% durante 1h, al 20% durante 1h y 30% durante 24-48 h, a 4°C. Enseguida se realizaron cortes de 50 µm de grosor, los cuales fueron colectados en portaobjetos electrocargados. Para la tinción, los tejidos fueron hidratados con PBS (pH 7.4, 2 min). Se incubaron en solución de BGII al 0.3% disuelto en NaCl (0.9%) a una temperatura de 60-65°C durante 15 minutos. Enseguida se realizó un lavado con PBS durante 2 minutos. Luego, a la misma temperatura, se incubaron los tejidos en tiosulfato de Na⁺ (1%), y posteriormente se realizaron lavados con PBS. Los cortes fueron inmersos en xilol durante 1 min y luego se montaron utilizando el medio de montaje DPX. Las tinciones fueron visualizadas bajo microscopio óptico (BX60) y micrografías fueron obtenidas (con una cámara Leica ICC50 HD). Para el análisis de las imágenes se empleó el software Fiji-ImageJ, mediante la cuantificación de la intensidad relativa (IR) de áreas de distintas estructuras cerebrales, como lo realizado en otros estudios (Hakkarainen et al., 2016; Cisneros-Mejorado et al., 2019). Las imágenes fueron convertidas a escala de grises (8 bits) y posteriormente se crearon regiones de interés (ROIs) a partir de las cuales fue obtenida la intensidad óptica (IO). Se obtuvo la IR normalizando los valores IO de cada ROI (IO_{ROI}) contra la IO del fondo de cada ROI (IO_f) (Ecuación 1).

$$IR=(IO_f - IO_{ROI})/IO_f$$

Ecuación 1. Intensidad relativa normalizada.

6.3. Análisis de difusión por resonancia magnética

La resonancia magnética (RM) permite obtener imágenes anatómico-estructurales de manera no invasiva, permitiendo así la aplicación de la técnica en organismos *in vivo*. De manera indirecta, se puede medir la presencia de mielina a través de imágenes sensibles a difusión en resonancia magnética (dMRI), por lo que, para complementar la información otorgada por las histologías, se obtuvieron este tipo de imágenes en el Laboratorio Nacional de Imagenología por Resonancia Magnética (LANIREM), utilizando un magneto de 7T (Bruker Pharmascan 70/16US). Los ratones fueron anestesiados con isoflurano (2%, en aire comprimido) en una

cámara anestésica y se colocaron dentro del magneto con anestesia continua (0.5-1 % en aire comprimido). La obtención de las imágenes se consiguió usando una secuencia 2D de imágenes eco-planares (EPI:Echo-Planar Image), con grosor de rebanada de 650 μm , sin inter espaciado, tiempo de repetición (TR) de 2.1s, tiempo de eco (TE) 23 ms, campo de visión (FOV: Field of view) de 20 x 20 mm^2 , tamaño de imagen de 150x150 mm, 40 direcciones de difusión, sensibilidad a la difusión $b=650\text{s}/\text{mm}^2$, 30 rebanadas (que cubren prácticamente todo el encéfalo) y con un tiempo total de escaneo de 17min. Las imágenes obtenidas fueron procesadas en el software MRtrix3 (<https://www.mrtrix.org/>). Enseguida se calculó el tensor de difusión (DTI), que modela las principales trayectorias de difusión del agua como un elipsoide cuya mayor excentricidad varía desde una esfera (igual difusión en todas direcciones) hasta una línea recta (difusión en una sola dirección). A partir de ésta elipsoide se pueden extraer diversos parámetros para caracterizar el perfil de difusión del agua en cada voxel o elemento de la imagen, generando mapas cuantitativos. Los parámetros que se caracterizaron en este trabajo son: el vector principal de difusión (VPD), la fracción de anisotropía (FA) y las difusividades radial (DR) y axial (DA). Éstos tres últimos permiten inferir cambios o alteraciones en la microestructura de las zonas analizadas. Se utilizó el VPD para la construcción manual de las regiones de interés (ROIs), y se delinearón zonas involucradas con actividad motriz como la corteza motora (CM) o en zonas con mayor incidencia en desmielinización o daño como el cuerpo calloso (CC) y la fimbria. La construcción de las ROIs se realizó con el apoyo del atlas Paxinos, mapa cerebral del ratón (<http://labs.gaidi.ca/mouse-brain-atlas/>), tomando las áreas en Bregma 1.54 mm a -1.70 mm, 1.18 mm a -2.54 mm y -1.06 mm a -2.06 mm para CM, CC y fimbria respectivamente.

6.4. Pruebas conductuales

Se sabe que una de las consecuencias de la falta de mielina en los organismos es la incapacidad o reducción en la motricidad, por lo que se realizaron dos pruebas conductuales para medir las deficiencias en el desempeño motriz: rotarrod y campo abierto en ambas edades experimentales (figura 6).

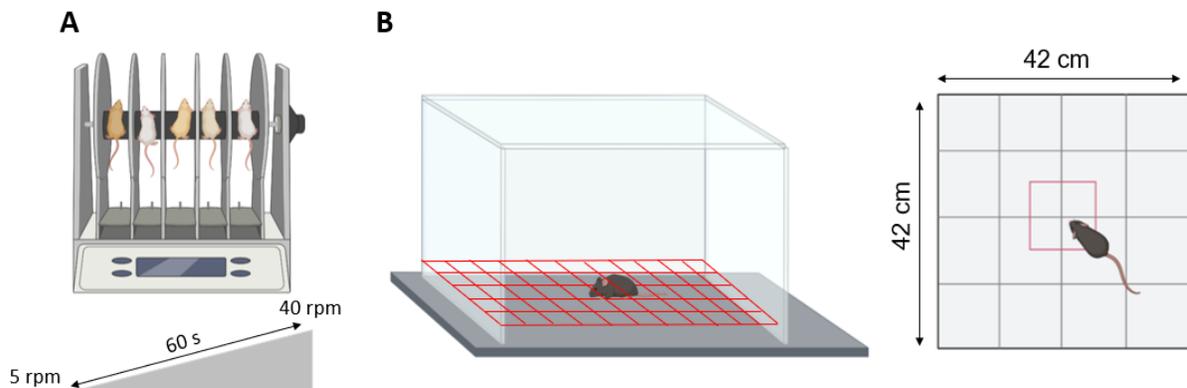


Figura 6. Esquema representativo de los equipos utilizados durante las pruebas conductuales; rotarrod (A) y campo abierto (B) (<https://biorender.com/>).

6.4.1. Campo abierto

El desarrollo de esta prueba se llevó a cabo en un campo de 42x42 cm², con sensores en las cuatro paredes del campo y un cuadrante en infrarrojo de 2x2 cm por cuadro (Superflex Open Field System). Se colocó una cama de aserrín en el campo antes de iniciar la prueba. Los ratones fueron colocados en el cuadrante del centro y se les permitió la libre exploración durante 20 minutos (1200 s). Se realizó un registro de la distancia recorrida, la velocidad de los episodios ambulatorios y el tiempo gastado en la exploración del cuadrante central con ayuda del software Fusion v5.5 superflesh (figura 6B).

6.4.2. Rotarrod

Se realizaron cuatro ensayos por día durante tres días consecutivos y en el día cuatro la evaluación final. Una hora antes de cada entrenamiento los ratones fueron colocados en el cuarto de experimentación para su habituación. Se colocó a los ratones sobre la varilla iniciando el movimiento a una velocidad de 10 rpm. El periodo máximo de prueba por ratón fue de 60 segundos y dentro de este rango se registró el tiempo que tardaron en caer.

Para la evaluación final se utilizaron diferentes velocidades en rampa, partiendo de 5 rpm hasta 40 rpm. Se aplicaron cinco ensayos con un periodo de 20 minutos de descanso entre ellos y se registró el tiempo y la velocidad en la que caían (figura 6A) (Carter, et. al., 2001).

6.5 Análisis estadístico

Los resultados se muestran como el promedio para cada grupo y el error estándar (SEM) como medida de dispersión. Se realizaron pruebas t-student de dos colas con un intervalo de confianza del 95% ($p < 0.05$) utilizando el programa GraphPad Prism versión 8 para Windows.

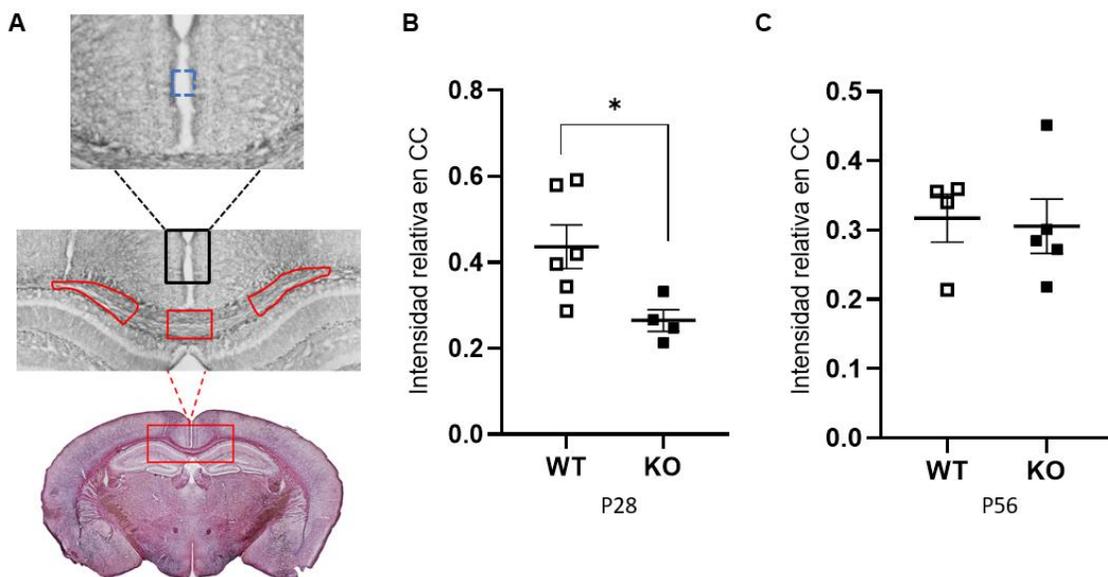
7. Resultados

7.1. Histología, tinción con Black Gold II (BGII)

7.1.1. El cuerpo calloso de los ratones KO en P28 presenta hipomielinización

Se generaron las regiones de interés (ROIs) para el análisis en CC de ambos hemisferios, así como de la zona media (figura 7A; las líneas rojas dibujan el área evaluada). Se obtuvieron imágenes de los tejidos de interés a 10X. Los valores de las intensidades relativas fueron normalizadas y posteriormente promediadas para obtener un valor final.

El resultado arrojado en los cortes en P28 (Figura 7D y E) dio un valor en la IR de 0.437 ± 0.051 en los ratones WT mientras que fue de 0.265 ± 0.025 en los KO, lo que representa una disminución del 39% en animales KO comparados con WT, indicando así menor cantidad de mielina en este grupo (figura 7B). En contraste, al evaluar a los ratones en edad P56 (figura 7F y G) no se muestran diferencias significativas (0.317 ± 0.03 en los WT y de 0.306 ± 0.03 para KO (figura 7C).



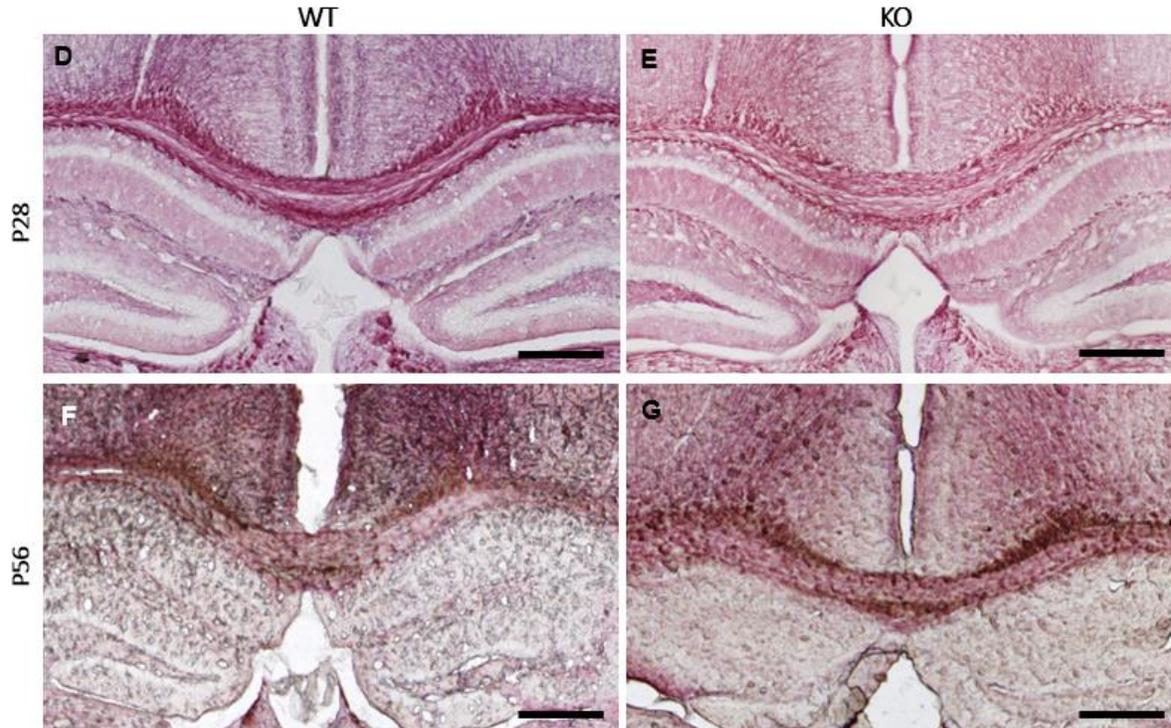


Figura 7. Cuantificación de la mielina en el Cuerpo Calloso (CC). (A) Se muestra un corte coronal de tejido teñido con BGII junto a una amplificación a escala de grises en donde se indica el trazado de ROIs en el CC (rojo) así como del fondo para la normalización de la intensidad relativa (IR) (azul). En B y C se puede observar la IR medida en CC tanto en P28 (B) (WT n = 6; KO n = 4) como en P56 (C) (WT n = 4; KO n = 5). D y E corresponden a micrografías de la zona del CC en ratones WT y KO para edad de P28, mientras que F y G a la edad P56 (fotografías al 10X). * $p < 0.05$. Barras = 50 μ m.

7.1.2. La fimbria de los ratones KO en P28 presenta hipomielinización

Las ROIs de esta estructura se generaron a partir de ambos hemisferios como se muestra en la figura 8A. La IR de cada una se normalizó y posteriormente se promediaron para obtener el valor final.

La evaluación en los tejidos en P28 (figura 8D y E) dio como valor 0.417 ± 0.029 en los ratones WT y 0.277 ± 0.018 en los KO ($p=0.015$), siendo el valor de lo KO 33% menor comparado con el de los ratones WT (figura 8B). Por lo otro lado, para el caso de los tejidos en edad P56 (figura 8F y G), las IR no muestran diferencias significativas, teniendo un valor de 0.354 ± 0.051 para el caso de los ratones WT y

de 0.350 ± 0.042 para los KO (figura 8C). Dichos resultados indican que existe menor cantidad de mielina en la fimbria de los ratones KO en P28, pero no en P56.

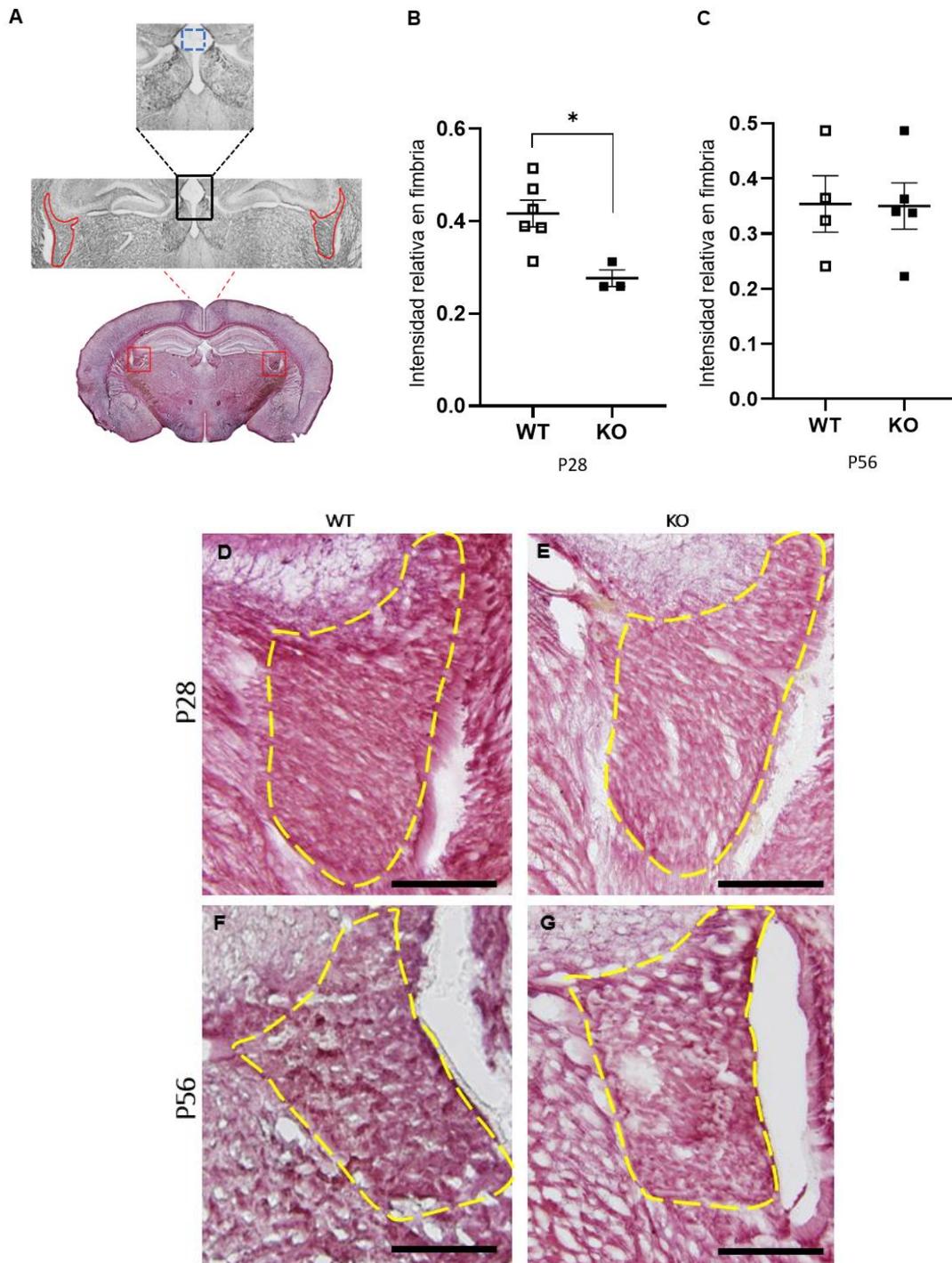


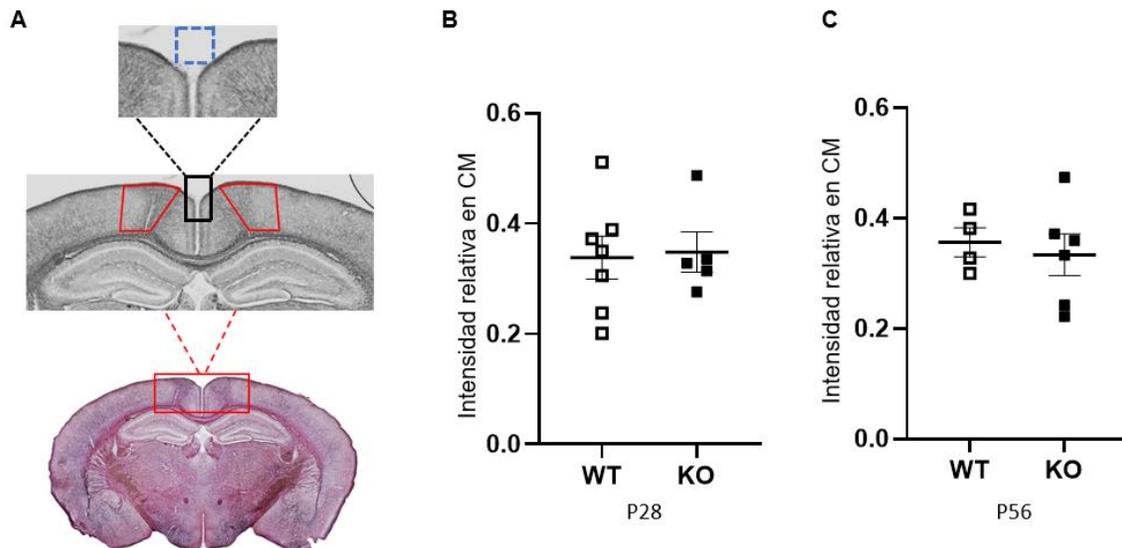
Figura 8. Cuantificación de la mielina en la fimbria. (A) Se muestra un corte coronal de tejido teñido con BGII junto a una ampliificación a escala de grises en donde se indica el

trazado de ROIs en la fimbria (rojo) así como del fondo para la normalización de la intensidad relativa (IR) (azul). En B y C se puede observar la IR medida en la fimbria tanto en P28 (B) (WT n = 6; KO n = 3) como en P56 (C) (WT n = 4; KO n = 5). D y E corresponden a micrografías de la zona de la fimbria en ratones WT y KO para edad de P28, mientras que F y G a la edad P56 (fotografías al 10X). * $p < 0.05$. Barras = 25 μm .

7.1.3. La cantidad de mielina en la corteza motora es la misma tanto en ratones WT como en KO en P28 y P56.

Se evaluó la IR en la corteza motora (primaria y secundaria) de ambos hemisferios, obteniendo las ROIs como se indica en la figura 9A. Los valores se normalizaron y posteriormente se promediaron para obtener el valor final.

La IR en los cortes en P28 (figura 9D y E) fue de 0.338 ± 0.039 en el grupo WT y de 0.348 ± 0.036 para el KO (figura 9B). Por otro lado, los tejidos evaluados en P56 (figura 9F y G) arrojaron un valor de 0.356 ± 0.026 para los de condición WT, mientras que el valor para los KO fue de 0.333 ± 0.038 . Ninguno de los grupos presentó diferencias significativas, lo que sugiere que en esta zona la mielinización es similar sin importar la condición en las dos diferentes edades.



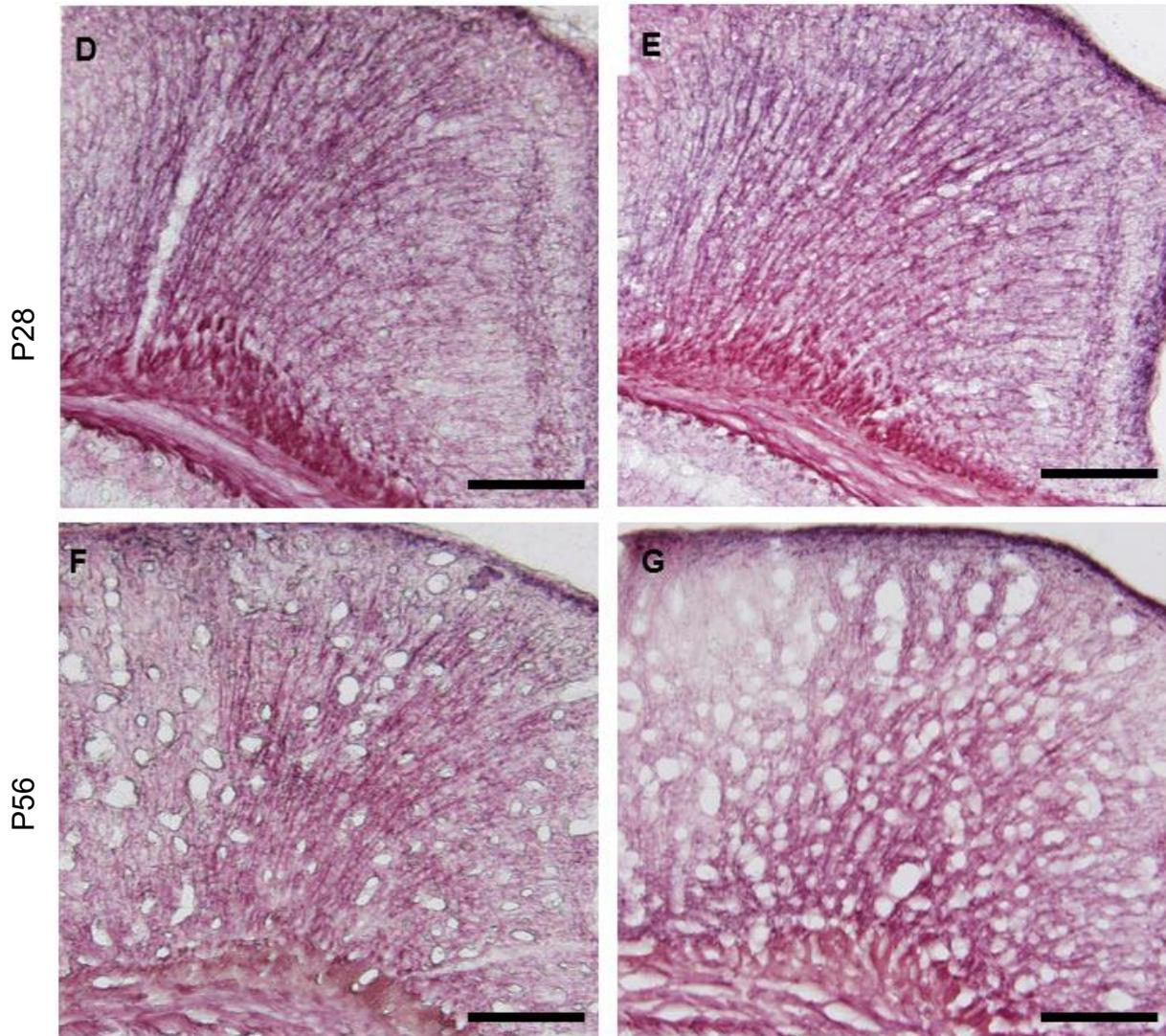


Figura 9. Cuantificación de la mielina en la corteza motora. (A) Se muestra un corte coronal de tejido teñido con BGII junto a una amplificación a escala de grises en donde se indica el trazado de ROIs en la CM (rojo) así como del fondo para la normalización de la intensidad relativa (IR) (azul). En B y C se puede observar la IR medida en CM tanto en P28 (B) (WT n = 7; KO n = 5) como en P56 (C) (WT n = 4; KO n = 6). D y E corresponden a micrografías de la zona de la CM en ratones WT y KO para edad de P28, mientras que F y G a la edad P56 (fotografías al 10X). Barras = 25 μ m.

7.2. Análisis de difusión por resonancia magnética

7.2.1. La ausencia del PRLR promueve una disminución en la fracción de anisotropía (FA) y en la difusividad axial (DA) medidas en la corteza motora de ratones en edad P56.

Las dMRI obtenidas fueron procesadas y analizadas utilizando como herramienta de apoyo la guía del Paxinos para la localización de las estructuras y la generación de las ROIs. Se cuantificó la difusividad axial (DA), la difusividad radial (DR) y la fracción de anisotropía (FA) tanto de la CM primaria y secundaria, como de CC y la fimbria en ratones en edad P56. Las áreas en Bregma de inicio y final para cada una de las estructuras se esquematizan en la figura 10.

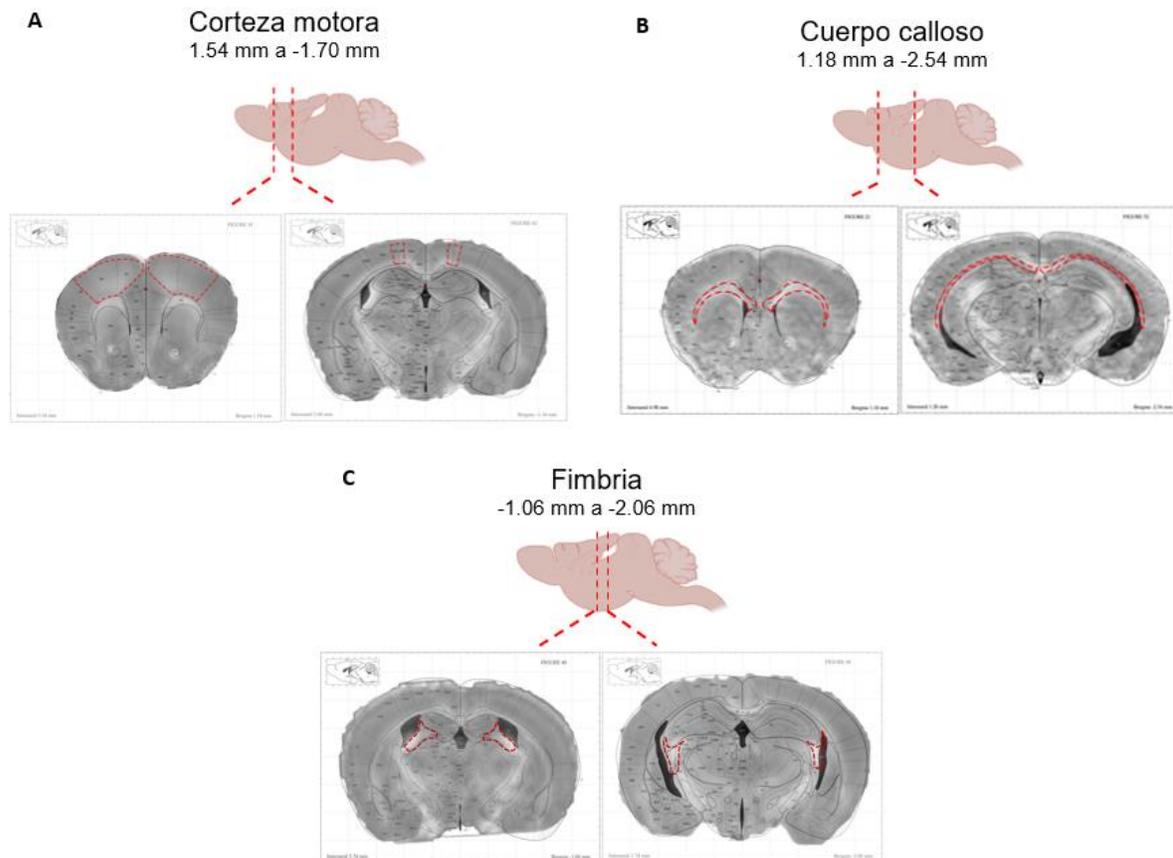


Figura 10. Esquema representativo de la colocación entre la dMRI y la imagen representativa en la guía del Paxinos. Las ROIs (líneas punteadas en color rojo sobre las dMRI) son delineadas a través de cada rebanada virtual, desde la parte inicial señalada (izquierda, tanto en A, B y C) y hasta el final (derecha, tanto en A, B y C) en donde es posible observar la estructura.

La FA, la DR y la DA son valores absolutos que funcionan como medidas indirectas del grado de arreglo en la microestructura de los tejidos. De manera importante se ha observado que los cambios en estos reflejan o correlacionan con alteraciones tanto en la sustancia blanca como en las neuronas de diversas zonas del SNC (Cisneros-Mejorado et al., 2019; Fatemi et al., 2009; Larvaron et al., 2007; Song et al., 2003, 2002). El grupo evaluado bajo esta metodología fue el de edad P56.

Los resultados arrojados de la CM no mostraron diferencias significativas en la DR (WT $7.8 \times 10^{-4} \pm 2.4 \times 10^{-5}$; KO $7.9 \times 10^{-4} \pm 1.5 \times 10^{-5}$) pero sí en la FA y la DA. El valor de FA fue 23% menor en los ratones KO (0.26 ± 0.007) comparado con los WT (0.34 ± 0.029), mientras que en la DA se mostró una disminución del 10.43% en los KO ($1.1 \times 10^{-3} \pm 3.3 \times 10^{-5}$), en comparación con el valor del grupo WT ($1.3 \times 10^{-3} \pm 3.4 \times 10^{-5}$) (figura 11A-D).

La evaluación en CC y fimbria no mostró diferencias significativas en ninguno de los parámetros, arrojando para el caso del CC valores en la FA de 0.55 ± 0.004 en el grupo WT y 0.55 ± 0.01 en el KO, mientras que para la DA fue de $1.7 \times 10^{-3} \pm 1 \times 10^{-4}$ en los controles y $1.7 \times 10^{-3} \pm 3 \times 10^{-5}$ en los KO y en la DR $7.1 \times 10^{-4} \pm 3 \times 10^{-5}$ en los ratones WT y $6.5 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-5}$ en los KO (figura 11 E-H). Por otra parte, los valores extraídos de la fimbria para el caso de la FA fueron de 0.67 ± 0.024 el grupo WT y 0.68 ± 0.02 el grupo KO, mientras que en la DA se registró $2.4 \times 10^{-3} \pm 1.3 \times 10^{-4}$ para el grupo control y $2.4 \times 10^{-3} \pm 9 \times 10^{-5}$ para el grupo KO, y de $6.8 \times 10^{-4} \pm 9 \times 10^{-5}$ para los WT y $5.8 \times 10^{-4} \pm 2 \times 10^{-5}$ para los KO en la DR (figura 11I-L).

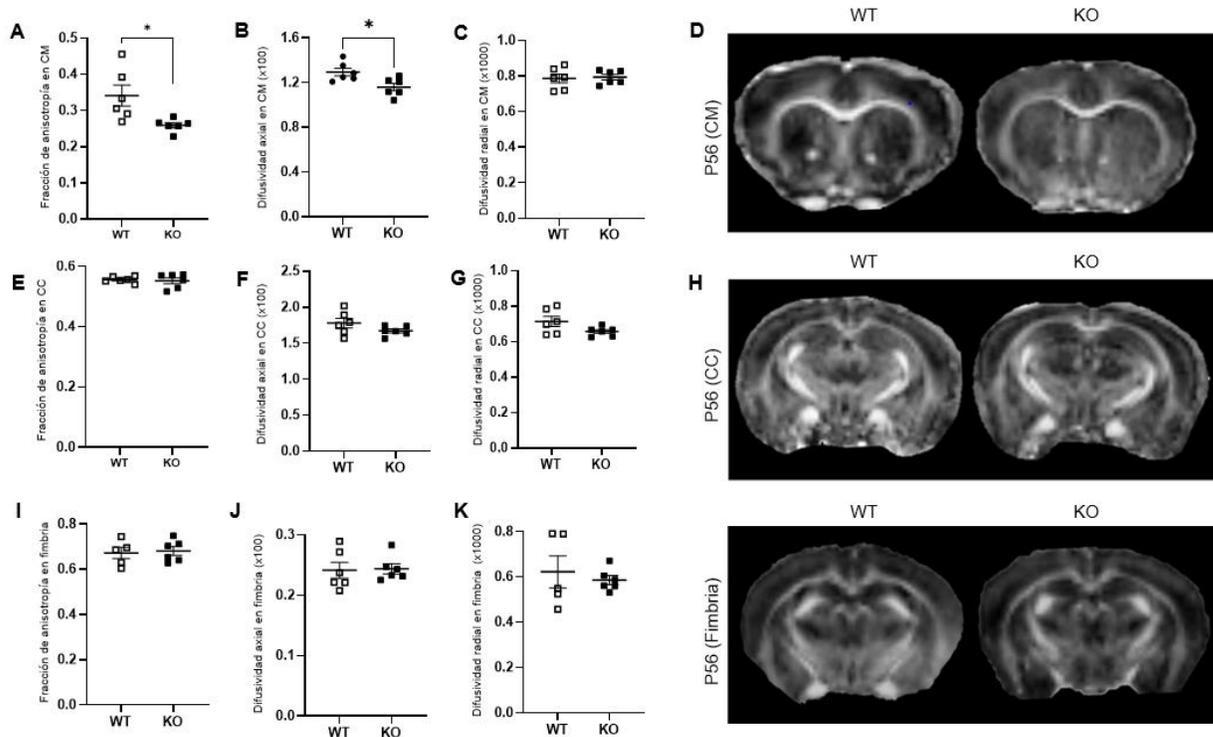


Figura 11. Análisis de imágenes sensibles a difusión por RM. Comparación en P56 de la cuantificación de la fracción de anisotropía (FA), la difusividad axial (DA) y la difusividad radial (DR) en la corteza motora (CM) (A-D), cuerpo calloso (CC) (E-H) y fimbria (I-L); en donde los valores muestran diferencia significativa en la CM entre los ratones silvestres (WT) y nulos para el receptor de PRL (KO). * $p < 0.05$. Imágenes de IRM representativas de los mapas de la fracción de anisotropía en las diferentes estructuras (D, H y L).

7.3. Campo abierto

7.3.1. La distancia recorrida en campo abierto es menor en ratones KO en P28

En estudios de modelos desmielinizantes como la encefalomiелitis aguda experimental (EAE) y el tratamiento con cuprizona (CPZ), se ha mostrado que la distancia que recorren los ratones dentro del cuadrante de campo abierto se ve disminuida cuando existen daños en la sustancia blanca (Takemiya et al., 2013;

Sanadgol et al., 2019), es por ello que en este trabajo se evaluó este parámetro tanto en edad P28 como en P56.

Los resultados mostraron diferencias significativas entre los ratones WT y KO en P28 (figura 12A) durante los veinte minutos de libre exploración. En esta prueba, el grupo WT registró un promedio de 29.98 ± 1.73 m, mientras que en el grupo KO fue de 23.98 ± 1.91 m, es decir, 20% menos que el grupo WT. Sin embargo, para el caso de los ratones evaluados en P56 (figura 12B), no se observaron diferencias significativas entre los grupos en la distancia registrada.

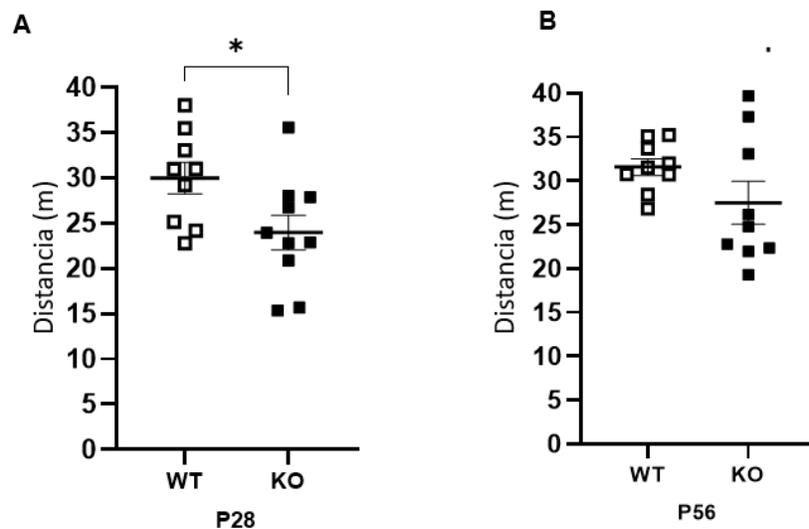


Figura 12. Distancia recorrida en campo abierto. Comparación de la distancia recorrida en el cuadrante, durante la prueba en campo abierto de ratones silvestres (WT) y nulos para el receptor de PRL (KO) de (A) 28 (P28) (WT n =9, KO n = 10) y (B) 56 (P56) días postnatales (WT n =9, KO n = 10). * $p < 0.05$.

7.3.2. La velocidad de movimiento en los episodios ambulatorios es menor en ratones KO en P28

Se ha reportado que la velocidad del movimiento durante la prueba de campo abierto se ve disminuida cuando hay daño en la mielina (Sanadgol et al., 2019). En ese sentido, es posible evaluar, por ejemplo, la velocidad de los movimientos ambulatorios y determinar si existen cambios en ésta en distintas condiciones. Un

movimiento ambulatorio se define como el periodo de tiempo en el que el ratón se mueve de un lugar a otro sin descansos mayores a 1 segundo.

La velocidad de los movimientos ambulatorios registrada en el grupo en P28 fue menor en los animales KO que en los WT. Siendo de 10.71 ± 0.77 cm/s para el grupo KO y de 12.97 ± 0.38 cm/s en los ratones WT (figura 13A) ($p=0.02$). En contraste, los ratones en P56 (figura 13B) no mostraron diferencia significativa entre las velocidades de cada grupo. En éstos, la velocidad registrada para los ratones WT fue de 12.47 ± 0.17 cm/s, mientras que para los KO fue de 12.10 ± 0.75 cm/s.

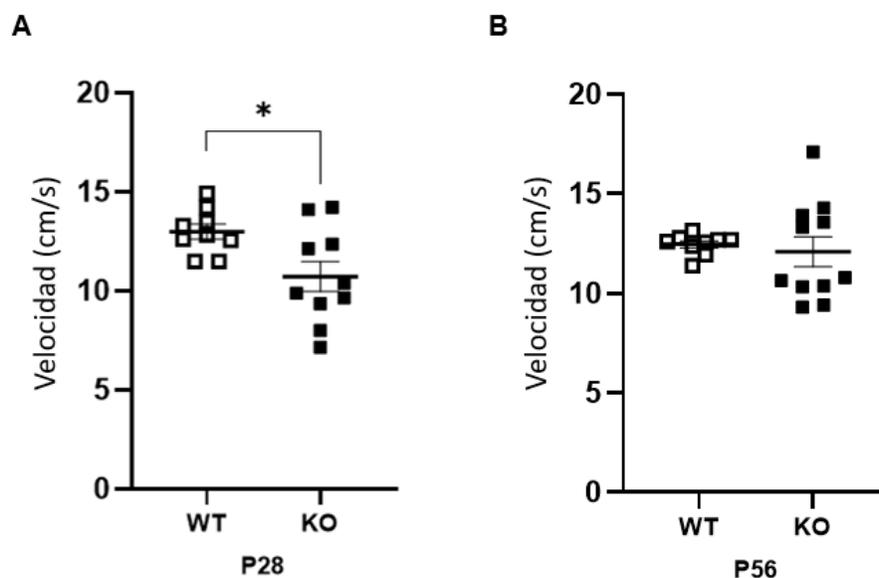


Figura 13. Velocidad promedio de los movimientos ambulatorios. Comparación de las velocidades promedio de los movimientos ambulatorios en el cuadrante durante la prueba de campo abierto en ratones silvestres (WT) y nulos para el receptor de PRL (KO) de (A) 28 (P28) y (B) 56 (P56) días postnatales. En los ratones en edad P28 (A) (WT n = 9; KO n = 10), el grupo KO presenta una disminución de la velocidad, comparado con el grupo WT, mientras que en edad P56 (WT n = 9; KO n = 11) no existe diferencia entre las velocidades de ambos grupos. * $p < 0.05$.

7.3.3. El tiempo de exploración en el centro del campo abierto es menor en los ratones KO en P56.

Otro de los parámetros que se ha evaluado en el campo abierto es la exploración en el centro del cuadrante de estudio. El registro del tiempo utilizado en la exploración en el centro del cuadrante durante la prueba de campo abierto no mostró diferencias significativas en los ratones evaluados en la edad P28, reportando un tiempo de exploración de 99.5 ± 16.27 s para los ratones WT y de 97.2 ± 14.74 s para los KO (figura 14A). Sin embargo, en P56 (figura 14B), los ratones KO permanecieron menos tiempo explorando el centro del campo (98.3 ± 16.30 s) comparado con el grupo WT (180.3 ± 20.97 s) teniendo así 45.5% menor actividad en el centro.

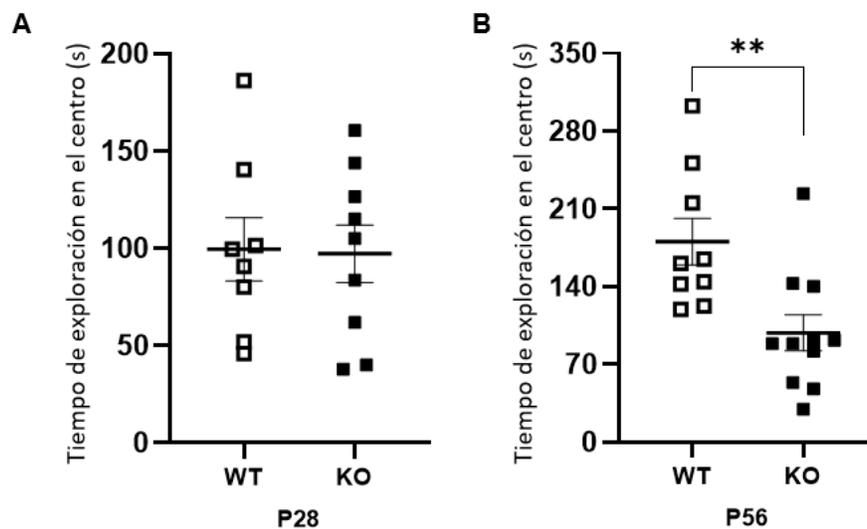


Figura 14. Tiempo de exploración en el centro del cuadrante. Comparación de los tiempos de exploración en el centro del cuadrante en la prueba de campo abierto en ratones silvestres (WT) y nulos para el receptor de PRL (KO) de (A) 28 (P28) (WT n = 8; KO n = 9) y (B) 56 (P56) (WT n = 9; KO n = 11) días postnatales. Los ratones en P56 muestran diferencia significativa entre el grupo WT y KO, en contraste con los ratones en P28 en donde no se presenta diferencia entre ellos. **p<0.01.

7.4. Rotarrod

7.4.1. Los ratones muestran el mismo desempeño durante la prueba en rotarrod tanto en P28 como en P56.

Rotarrod es una de las pruebas más usadas para evaluar la coordinación, el balance y el control motor en ratones (Brooks et al., 2009), por lo que se utilizó esta prueba con la finalidad de explorar si estas habilidades se ven afectadas en animales carentes del receptor de prolactina. Se encontró que no existe diferencia significativa entre los ratones WT y KO de las dos diferentes edades evaluadas (P28 y P56). Los ratones que realizaron la tarea en P28 (figura 15A) reportaron un tiempo promedio de 44.72 ± 2.27 s en el caso del grupo WT, mientras que en el grupo KO fue de 44.02 ± 1.36 s. De manera similar, los ratones en edad P56 (figura 15B) registraron un tiempo promedio de 40.55 ± 3.41 s para los WT y de 38.80 ± 3.33 s en los KO.

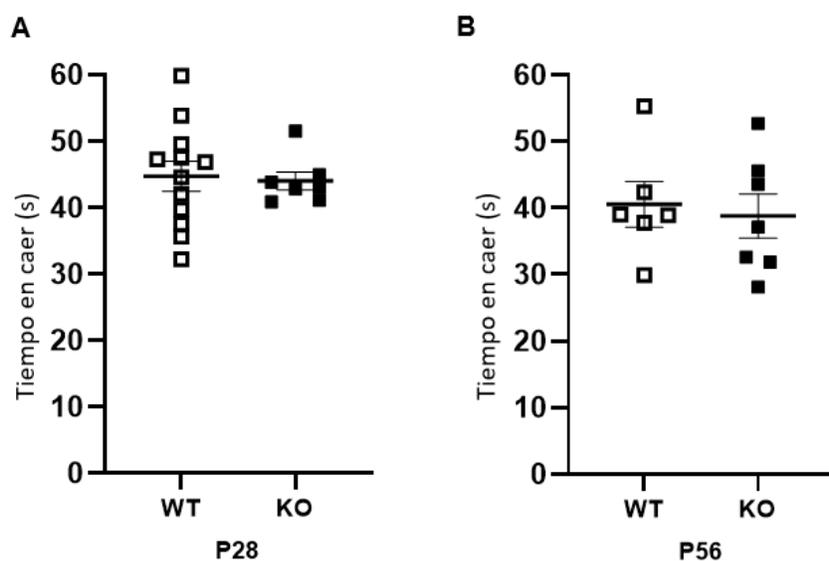


Figura 15. Desempeño en la prueba de rotarrod. Comparación del tiempo de caída de la varilla del rotarrod durante la prueba en animales silvestres (WT) y nulos para el receptor de PRL (KO) de (A) 28 (P28) (WT n = 12; KO n = 7) y (B) 56 (P56) días postnatales (WT n = 6; KO n = 7) y. Los resultados no muestran diferencias significativas entre los ratones WT y KO en ninguna de las edades.

8. Discusión

La hormona prolactina tiene un papel importante en procesos de neurogénesis y neurodesarrollo (Cabrera-Reyes et al., 2017), por lo que ha sido estudiada como factor estimulante durante la mielinización y remielinización en hembras gestantes (Gregg et al., 2007; Gregg, 2009). Además, se ha reportado como potenciador de la oligodendrogénesis, puesto que en neuroesferas de OPCs derivadas del CC de ratones hembra adultos, el tratamiento con PRL incrementó el número y tamaño de estas, además de aumentar la proporción de OL mielinizantes en cultivo, sugiriendo así que la PRL estimula tanto la proliferación como la diferenciación de los OPCs (Gregg et al., 2007).

En un trabajo previo de nuestro laboratorio se dio a conocer que los ratones carentes del receptor de prolactina (KO-PRLR) en el día posnatal 12 (P12) presentan un fenotipo hipomielinizante en estructuras como CC y fimbria (Dimas et al., 2019), elucidando la importancia de la acción de la PRL y su receptor en el proceso de mielinización durante esta etapa. Interesantemente, la fuente principal de PRL circulante durante las primeras dos semanas postnatales en roedores es la leche materna, puesto que las crías liberan su propia prolactina hipofisiaria hasta la segunda o tercera semana postnatales. Sin embargo, se desconoce el papel que tiene la PRL sobre el proceso de mielinización en etapas posteriores del desarrollo (fuera de la gestación) y las consecuencias conductuales que podrían resultar en los ratones KO-PRLR.

Es por ello que, en este trabajo utilizando un modelo KO o nulo para el receptor de PRL, se evaluó el papel de la PRL en el proceso de mielinización en etapas tempranas del desarrollo posteriores a la lactancia. Tomando como punto de partida los antecedentes de Dimas mencionados arriba, nos propusimos dilucidar si tanto en CC como en la fimbria esta condición hipomielinizante perdura en el día posnatal 28 (P28) y 56 (P56), en donde los ratones se encuentran en etapa pre-púber y adulta temprana, respectivamente. Además de estas estructuras y debido a resultados conductuales exploratorios reportados por el grupo de investigación en donde observaron que los ratones KO-PRLR presentaban pobre desempeño motor (datos

no mostrados), se decidió evaluar también a la corteza motora (primaria y secundaria), puesto que juega un papel importante en los procesos de control motor. Mediante la tinción de BGII la cual es específica para la mielina (Schmued et al., 2008), se evaluó la intensidad relativa en estas estructuras (CC, fimbria y CM). Los resultados mostraron que en P28 no se presentan diferencias significativas en los valores de la CM, pero se mantiene el fenotipo hipomielinizante en CC y fimbria, siendo hasta P56 en donde los niveles de mielina son equiparables entre ambos grupos. Estos resultados sugieren que en los ratones KO-PRLR existe un desarrollo tardío en la mielinización de estas estructuras durante las etapas tempranas postnatales (P12 y P28), pero que en cierta medida se recupera conforme avanza la edad (P56). De manera interesante se ha demostrado que el PRLR es expresado en OPCs PDGFR α ⁺ de CC proveniente de ratones hembra vírgenes (Gregg et al., 2007), ofreciendo un posible mecanismo mediante el cual estaría actuando la PRL en el CC de las crías en P12 y P28 siendo la delección del PRLR la causa del fenotipo hipomielinizante en esta estructura a estas edades. Sin embargo, no existen reportes de la presencia de PRLR en la corteza motora o la fimbria, por lo que se necesitan más estudios para saber si nuestra hipótesis es correcta.

Por otra parte, y desde una perspectiva funcional, si la ausencia del receptor de PRL promueve alteraciones en el desarrollo de la mielinización durante la etapa postnatal temprana, es probable que esas alteraciones generen consecuencias que permanecerán en etapas posteriores. Por ello, otro de los objetivos de este trabajo fue estudiar si existen deficiencias funcionales observables a través del comportamiento, para lo cual se realizaron pruebas conductuales finas relacionadas con el desempeño motriz tanto en edad P28 como el P56 en grupos evaluados de manera vertical. Una de las pruebas empleadas para esta evaluación fue la prueba de campo abierto, que ha sido utilizada y acoplada para obtener la medición de diversos parámetros que describen la locomoción de los organismos (Choleris et al., 2001; Takemiya et al., 2013; Xiu et al., 2017) mientras que otra de las pruebas, el rotarrod, es utilizado principalmente para evaluar la capacidad motriz (Brooks et al., 2009). La distancia recorrida junto con el promedio de las velocidades de los episodios ambulatorios, son parámetros que podrían estar relacionados con

deficiencia motora como consecuencia de hipomielinización en el SNC, mientras que el tiempo de exploración en el centro del campo abierto y en la periferia son criterios utilizados en la evaluación de condiciones similares a la ansiedad (Prut et al., 2003). Un menor tiempo gastado en el cuadrante del centro se traduce como una conducta similar a la ansiedad (Brooks et al., 2009). Por lo que, con base en lo observado en el registro en campo abierto, se sugiere que los ratones KO-PRLR en P28 presentan deficiencia motora debido a que la distancia que recorren en el cuadrante y la velocidad con la que se mueven es menor, mientras que en los KO-PRLR en P56 las alteraciones observadas son principalmente de tipo conductual presentando comportamiento similar a la ansiedad. Algunos estudios han dilucidado que la PRL tiene capacidad ansiolítica en ratas (Donner et al., 2007; Torner et al., 2001), sugiriendo así que la inactividad de esta hormona en los ratones pudiera ser la responsable de un comportamiento similar a la ansiedad. Sin embargo, deben realizarse más experimentos bajo este contexto.

Además, el desempeño mostrado en la prueba de rotarrod en donde se mide el tiempo en que los ratones tardan en caer de la varilla cuando esta gira aumentando la velocidad de manera gradual (de 5 a 40 rpm), es el mismo en los dos diferentes grupos sin importar la edad. Algunos estudios han demostrado que la mala ejecución en esta tarea está asociada directamente a procesos desmielinizantes en el cuerpo calloso (Franco-Pons, et. al., 2007) y que además puede ser afectada por el deterioro que conlleva la edad (Shoji, et. al., 2016). Sin embargo, pese a la menor cantidad de mielina en el CC de los ratones KO-PRLR en P28, la ejecución de esta tarea se realiza de manera similar a los ratones WT.

Una adición importante a este modelo de estudio sería combinar una estrategia de análisis longitudinal para evaluar in vivo el curso temporal de la mielinización. La naturaleza no invasiva de la resonancia magnética (MRI) permite este enfoque. Además, la resonancia magnética ponderada por difusión (dMRI) y su análisis mediante modelos matemáticos permiten una adecuada delimitación de las estructuras de la sustancia blanca y la evaluación de su mielinización en diferentes etapas. De este modo, en este proyecto se implementó la medida de difusión por

resonancia magnética en donde se evaluaron tres parámetros: la fracción de anisotropía (FA), la difusividad axial (DA) y la radial (DR) en edad P56. La FA permite evaluar cambios en la microestructura de los tejidos, aunque se sabe que no es específica para determinar si las alteraciones provienen de los axones o en la mielina, mientras que la DR y la DA reflejan la direccionalidad de la estructura analizada y están directamente relacionados con el daño de la mielina (DR) y alteraciones axonales (DA) (Budden et al., 2011; Song et al., 2003, 2002). Los resultados obtenidos no mostraron diferencia significativa entre los grupos al cuantificar los valores en el CC ni la fimbria, pero sí en la corteza motora tanto en el valor de FA como en la DA.

Esta diferencia en la DA en donde se observa menor valor en el grupo KO-PRLR podría reflejar alteraciones a nivel axonal (Song et al., 2003). Esta situación podría estar apoyada también por la similitud en los valores de las intensidades relativas medidas por BGII en la CM del grupo control y KO-PRLR en P56, sugiriendo que la posible alteración estructural sea en los axones, la cual podría ser dependiente o independiente de la deficiencia de mielina observada en etapas más tempranas del desarrollo. Sin embargo, más estudios que evalúen alteraciones a nivel axonal son necesarias para confirmar esto.

Junto con todo lo anterior, el hecho de que el comportamiento motriz en esta edad no se vea alterado podría sugerir que pese al aparente daño en la CM en P56, existe compensación por parte de otros sistemas mejorando así la locomoción al llegar a esta edad en el desarrollo. Sin embargo, futuras evaluaciones más detalladas serán necesarias para determinar en las diferentes edades cambios a nivel microestructural en el proceso de mielinización y correlacionarlos con los fenotipos conductuales observados en campo abierto al igual que con las histologías con BGII.

Todos estos resultados sugieren que la acción de PRL juega un papel importante en el desarrollo postnatal del SNC de los ratones, puesto que la delección de su receptor desencadena retardos en el proceso de mielinización en etapas tempranas posteriores a la lactancia (P28), además de sugerir posible daño neuronal según lo

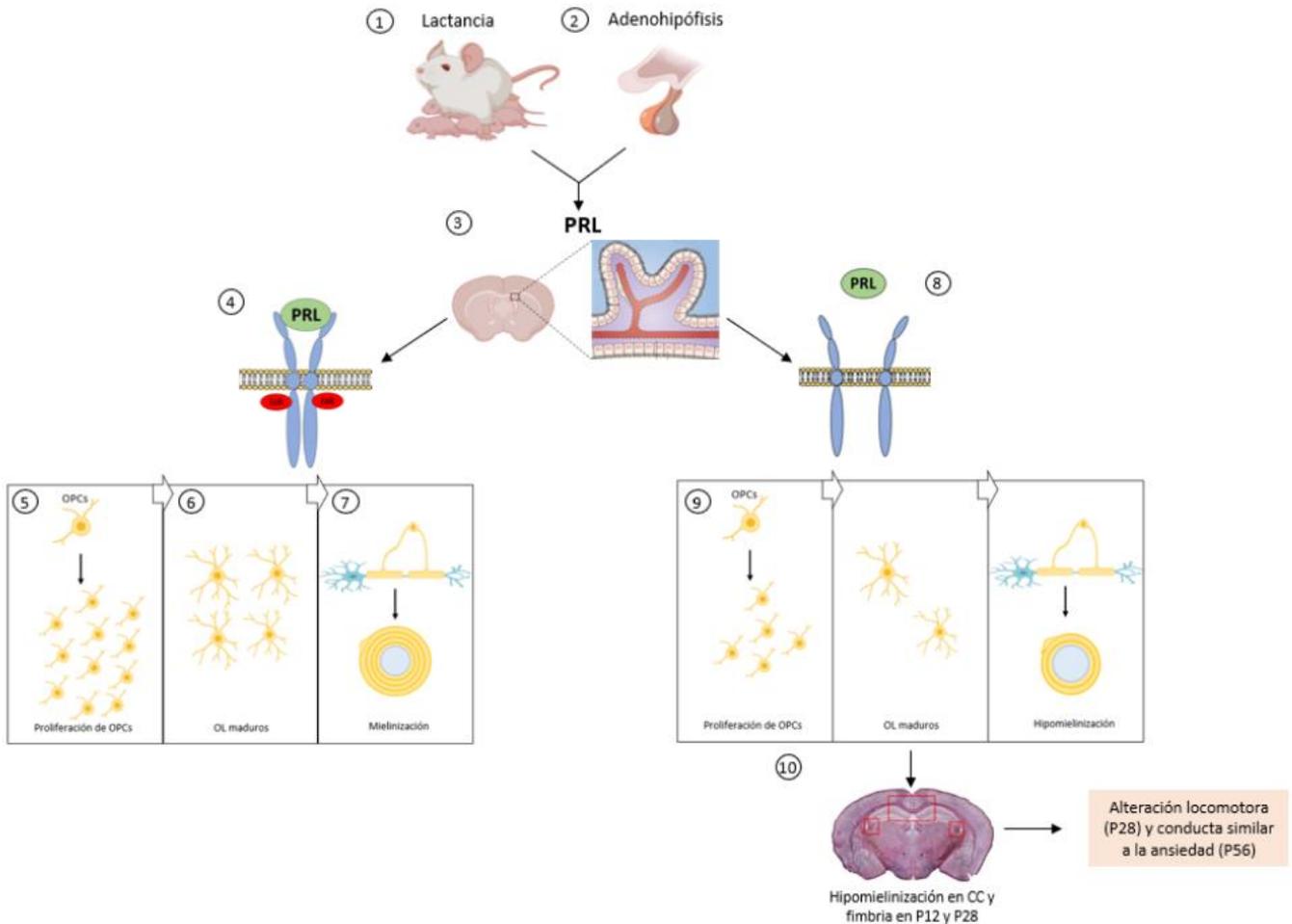
reportado en las imágenes de difusión por resonancia magnética (P56). Como consecuencia, estas deficiencias en la generación de mielina provocan complicaciones funcionales reflejadas en la motricidad y conducta en ambas edades. Por lo que, de manera global, los resultados obtenidos en este trabajo enriquecen lo descrito previamente respecto a las acciones de la PRL sobre el SNC contribuyendo a la generación de herramientas necesarias para postular a esta hormona como posible terapia contra las patologías de la sustancia blanca.

9. Conclusiones

En resumen, los resultados de este trabajo muestran que los ratones carentes del receptor de prolactina en edad P28 presentan fenotipo hipomielinizante en cuerpo calloso y fimbria además de mostrar pobre desempeño locomotor, mientras que a la edad p56 presentan alteraciones en la difusividad axial de la corteza motora y una conducta similar a la ansiedad.

En conclusión, el receptor de PRL es necesario para el proceso de mielinización en el SNC y su falta de acción tiene consecuencias adversas tanto en la mielinización, como en el desempeño locomotor y la conducta.

10. Esquema del mecanismo propuesto de la acción de la PRL en la mielinización.



La fuente principal de PRL durante las dos o tres primeras semanas posnatales es la leche materna (1). Es hasta después de este periodo que los niveles circulantes de esta hormona son originados de manera endógena por los lactótrofos de la adenohipófisis (2). La PRL ingresa al cerebro mediante los plexos coroideos (3) y activa a su receptor en los OPCs (4). La acción de su receptor desencadena la vía de señalización Jak/Stats conduciendo a mecanismos de proliferación (5), diferenciación y maduración (6), formando así las vainas de mielina (7). La falta de acción de la PRL de la leche (8) (como en el caso de una alimentación materna obesogénica o en ratones carentes del receptor de PRL) en el SNC de las crías, se ve reflejada en un menor número de OPCs proliferados y de OLs maduros, teniendo como consecuencia una hipomielinización en el CC y la fimbria durante las primeras semanas postnatales (p12 y p28) así como alteraciones conductuales en etapas posteriores (p28 y p56) (10).

11. Referencias bibliográficas

- Baas, D., Bourbeau, D., Sarlieve, L. L., Ittel, M., Dussault, J. H., & Puymirat, J. (1997). Oligodendrocyte Maturation and Progenitor Cell Proliferation Are Independently Regulated by Thyroid Hormone. *Glia*, *19*, 324–332. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199704\)19:4<324::AID-GLIA5>3.0.CO;2-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199704)19:4<324::AID-GLIA5>3.0.CO;2-X)
- 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). Temporal oligodendrocyte lineage progression: In vitro models of proliferation, differentiation and myelination. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. <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/10.1152/physrev.2001.81.2.871>
- Bridges, R. S., & Grattan, D. R. (2019). 30 years after: CNS actions of prolactin: Sources, mechanisms and physiological significance. *Journal of Neuroendocrinology*, *31*(3), 1–12. <https://doi.org/10.1111/jne.12669>
- Brooks, S. P., & Dunnett, S. B. (2009). Tests to assess motor phenotype in mice: A user's guide. *Nature Reviews Neuroscience*, *10*(7), 519–529. <https://doi.org/10.1038/nrn2652>
- Budde, M. D., Janes, L., Gold, E., Turtzo, L. C., & Frank, J. A. (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), 2248–2260. <https://doi.org/10.1093/brain/awr161>

- 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>
- Carter, R. J., Morton, J., & Dunnett, S. B. (2001). Motor Coordination and Balance in Rodents. *Current Protocols in Neuroscience*, *15*(1), 8.12.1-8.12.14. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0812s15>
- Choleris, E., Thomas, A. W., Kavaliers, M., & Prato, F. S. (2001). A detailed ethological analysis of the mouse open field test: Effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *25*(3), 235–260. [https://doi.org/10.1016/S0149-7634\(01\)00011-2](https://doi.org/10.1016/S0149-7634(01)00011-2)
- Cisneros-Mejorado, A. J., Garay, E., Ortiz-Retana, J., Concha, L., Moctezuma, J. P., Romero, S., & Arellano, R. O. (2020). Demyelination–Remyelination of the Rat Caudal Cerebellar Peduncle Evaluated with Magnetic Resonance Imaging. *Neuroscience*, *439*(July), 255–267. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.06.042>
- Clapp, C., Thebault, S., Jeziorski, M. C., & Martínez De La Escalera, G. (2009). Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiological Reviews*, *89*(4), 1177–1215. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2009>
- Confavreux, C., Hutchinson, M., Hours, M. M., Cortinovic-Tourniaire, P., & Moreau, T. (1998). Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*, *339*(5), 285–291. <https://doi.org/10.1056/NEJM199807303390501>
- De Giglio, L., Marinelli, F., Prosperini, L., Contessa, G. M., Gurreri, F., Piattella, M. C., ... Pozzilli, C. (2015). Relationship between Prolactin Plasma Levels and White Matter Volume in Women with Multiple Sclerosis. *Mediators of Inflammation*, *2015*. <https://doi.org/10.1155/2015/732539>
- Dimas Rufino, M. A. (2019). *Alteraciones en el proceso de mielinización en la etapa postnatal en ratones knockout del receptor a prolactina*. Universidad

Nacional Autónoma de México.

- Donner, N., Bredewold, R., Maloumy, R., & Neumann, I. D. (2007). Chronic intracerebral prolactin attenuates neuronal stress circuitries in virgin rats. *European Journal of Neuroscience*, *25*(6), 1804–1814. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2007.05416.x>
- Fatemi, S. H., Folsom, T. D., Reutiman, T. J., Abu-Odeh, D., Mori, S., Huang, H., & Oishi, K. (2009). Abnormal expression of myelination genes and alterations in white matter fractional anisotropy following prenatal viral influenza infection at E16 in mice. *Schizophrenia Research*, *112*(1–3), 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.schres.2009.04.014>
- Franco-Pons, N., Torrente, M., Colomina, M. T., & Vilella, E. (2007). Behavioral deficits in the cuprizone-induced murine model of demyelination/remyelination. *Toxicology Letters*, *169*(3), 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.01.010>
- Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., & Nagy, G. (2000). Prolactin: Structure, function, and regulation of secretion. *Physiological Reviews*, *80*(4), 1523–1631. <https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50037-3>
- Gregg, C. (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>
- 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>
- Hakkarainen, H., Sierra, A., Mangia, S., Garwood, M., Michaeli, S., Gröhn, O., & Liimatainen, T. (2016). MRI relaxation in the presence of fictitious fields correlates with myelin content in normal rat brain. *Magnetic Resonance in Medicine*, *75*(1), 161–168. <https://doi.org/10.1002/mrm.25590>

- Kuhn, S., Gritti, L., Crooks, D., & Dombrowski, Y. (2019). Oligodendrocytes in Development, Myelin Generation and Beyond. *Cells*, 8, 1–23. <https://doi.org/doi:10.3390/cells8111424>
- Larvaron, P., Boespflug-Tanguy, O., Renou, J.-P., & Bonny, J.-M. (2007). in vivo analysis of the post-natal development of normal mouse brain by DTI. *NMR in Biomedicine*, 20(3), 413–421. <https://doi.org/DOI:10.1002/nbm.1082>
- Long, K. L. P., Breton, J. M., Barraza, M. K., Litvin, O. S., & Kaufer, D. (2021). *Hormonal regulation of oligodendrogenesis I : effects across the lifespan*. (January), 1–37.
- Long, K. L. P., Breton, J. M., Barraza, M. K., Perloff, O. S., & Kaufer, D. (2021). Hormonal Regulation of Oligodendrogenesis I: Effects Across the Lifespan. *Biomolecules*, 11, 283. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/biom11020283>
- Macotela, Y., Triebel, J., & Clapp, C. (2020). Time for a New Perspective on Prolactin in Metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 31(4), 276–286. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2020.01.004>
- McTigue, D. M., Horner, P. J., Stokes, B. T., & Gage, F. H. (1998). Neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor induce oligodendrocyte proliferation and myelination of regenerating axons in the contused adult rat spinal cord. *Journal of Neuroscience*, 18(14), 5354–5365. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-14-05354.1998>
- Mitew, S., Hay, C. M., Peckham, H., Xiao, J., Koening, M., & Emery, B. (2014). Mechanisms regulating the development of oligodendrocytes and central nervous system myelin. *Neuroscience*, 276, 29–47. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.11.029>
- 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>

- Noble, M., Murray, K., Stroobant, P., Waterfield, M. D., & Riddle, P. (1988). Platelet-derived growth factor promotes division and motility and inhibits premature differentiation of the oligodendrocyte/type-2 astrocyte progenitor cell. *Nature*, 333(6173), 560–562. <https://doi.org/10.1038/333560a0>
- Okada, M., Makino, A., Nakajima, M., Okuyama, S., Furukawa, S., & Furukawa, Y. (2010). Estrogen stimulates proliferation and differentiation of neural stem/progenitor cells through different signal transduction pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(10), 4114–4123. <https://doi.org/10.3390/ijms11104114>
- Prut, L., & Belzung, C. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: A review. *European Journal of Pharmacology*, 463(1–3), 3–33. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01272-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01272-X)
- Radhakrishnan, A., Raju, R., Tuladhar, N., Subbannayya, T., Thomas, J. K., Goel, R., ... Chatterjee, A. (2012). A pathway map of prolactin signaling. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 6(3), 169–173. <https://doi.org/10.1007/s12079-012-0168-0>
- Richardson, W. D., Pringle, N., Mosley, M. J., Westermarck, B., & Dubois-Dalcq, M. (1988). A role for platelet-derived growth factor in normal gliogenesis in the central nervous system. *Cell*, 53(2), 309–319. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90392-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90392-3)
- Salzer, J. L., & Zalc, B. (2016, October 24). Myelination. *Current Biology*, Vol. 26, pp. R971–R975. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.07.074>
- Salzer, James L. (2015). Schwann cell myelination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(8), 1–26. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020529>
- Sanadgol, N., Barati, M., Houshmand, F., Hassani, S., Clarner, T., shahlaei, M., & Golab, F. (2019). Metformin accelerates myelin recovery and ameliorates behavioral deficits in the animal model of multiple sclerosis via adjustment of

AMPK/Nrf2/mTOR signaling and maintenance of endogenous oligodendrogenesis during brain self-repairing period. *Pharmacological Reports*, (0123456789). <https://doi.org/10.1007/s43440-019-00019-8>

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>

See, J. M., & Grinspan, J. B. (2009). Sending mixed signals: Bone morphogenetic protein in myelination and demyelination. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 68(6), 595–604. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e3181a66ad9>

See, J., Zhang, X., Eraydin, N., Mun, S. Bin, Mamontov, P., Golden, J. A., & Grinspan, J. B. (2004). Oligodendrocyte maturation is inhibited by bone morphogenetic protein. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 26(4), 481–492. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.04.004>

Shoji, H., Takao, K., Hattori, S., & Miyakawa, T. (2016). Age-related changes in behavior in C57BL/6J mice from young adulthood to middle age. *Molecular Brain*, 9(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13041-016-0191-9>

Simons, M., & Nave, K. A. (2016, January 1). Oligodendrocytes: Myelination and axonal support. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, Vol. 8. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020479>

Song, S. K., Sun, S. W., Ju, W. K., Lin, S. J., Cross, A. H., & Neufeld, A. H. (2003). Diffusion tensor imaging detects and differentiates axon and myelin degeneration in mouse optic nerve after retinal ischemia. *NeuroImage*, 20(3), 1714–1722. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2003.07.005>

Song, S. K., Sun, S. W., Ramsbottom, M. J., Chang, C., Russell, J., & Cross, A. H. (2002). Dysmyelination revealed through MRI as increased radial (but unchanged axial) diffusion of water. *NeuroImage*, 17(3), 1429–1436. <https://doi.org/10.1006/nimg.2002.1267>

- Stadelmann, C., Timmler, S., Barrantes-Freer, A., & Simons, M. (2019). Myelin in the central nervous system: Structure, function, and pathology. *Physiological Reviews*, 99(3), 1381–1431. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2018>
- Takemiya, T., & Takeuchi, C. (2013). Traveled Distance Is a Sensitive and Accurate Marker of Motor Dysfunction in a Mouse Model of Multiple Sclerosis. *ISRN Neuroscience*, 2013, 1–4. <https://doi.org/10.1155/2013/170316>
- Torner, L., Toschi, N., Pohlinger, A., Landgraf, R., & Neumann, I. D. (2001). Anxiolytic and anti-stress effects of brain prolactin: Improved efficacy of antisense targeting of the prolactin receptor by molecular modeling. *Journal of Neuroscience*, 21(9), 3207–3214. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.21-09-03207.2001>
- Wiemelt, A. P., Lehtinen, M., & Arthur McMorris, F. (2001). Agonists calcitonin, corticotropin-releasing hormone, and vasoactive intestinal peptide, but not prostaglandins or β -adrenergic agonists, elevate cyclic adenosine monophosphate levels in oligodendroglial cells. *Journal of Neuroscience Research*, 65(2), 165–172. <https://doi.org/10.1002/jnr.1139>
- Xiu, Y., Cheng, G. H., Peng, C., Wang, Y., Li, Y. De, Chao, F. L., & Tang, Y. (2017). Ultrastructural abnormalities and loss of myelinated fibers in the corpus callosum of demyelinated mice induced by cuprizone. *Journal of Neuroscience Research*, 95(8), 1677–1689. <https://doi.org/10.1002/jnr.23997>
- Younes-Rapozo, V., Berendonk, J., Savignon, T., Manhães, A. C., & Barradas, P. C. (2006). Thyroid hormone deficiency changes the distribution of oligodendrocyte/myelin markers during oligodendroglial differentiation in vitro. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 24(7), 445–453. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2006.08.004>