

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE  
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

INFORME FINAL DE SERVICIO SOCIAL

**Análisis del efecto de la melatonina sobre la  
oligodendrogénesis y la mielinización *in vitro***

QUE PRESENTA EL ALUMNO

Jesús Fernando Reyes Ibañez

Matrícula  
2163025921

ASESORA INTERNA

Dra. María Judith Castellanos Moguel  
Laboratorio de Micología  
Departamento El Hombre y su Ambiente  
UAM-X  
No. Económico: 28248



ASESORA EXTERNA

Dra. Marcela Valdés Tovar  
Departamento de Farmacogenética, Subdirección de Investigaciones Clínicas  
Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz



México, CDMX. a 21 de julio de 2023

## RESUMEN

La formación de mielina en el sistema nervioso central (SNC) permite la regulación fina de la velocidad de conducción de los impulsos nerviosos y con ello la sincronización de los circuitos neuronales. En padecimientos neuropsiquiátricos como la esquizofrenia y el trastorno bipolar, existe una disfunción generalizada de la mielina, desde los niveles subcelular y celular, hasta el nivel del conectoma. En el SNC, sólo los oligodendrocitos maduros tienen capacidad mielinizante, por lo tanto, es necesario que ocurra un proceso de diferenciación y maduración a partir de las células precursoras de oligodendrocitos (OPCs), lo que se conoce como oligodendrogénesis. Tanto este proceso como el de mielinización son regulados mediante múltiples señales mediadas por contacto celular y por factores solubles. Una de las moléculas endógenas que puede modular estos procesos es la melatonina, ya que se ha documentado su efecto protector y reparador en modelos animales de daño a la materia blanca. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la melatonina en la oligodendrogénesis y en la mielinización, en modelos *in vitro*. Para ello, se aislaron OPCs de corteza cerebral de ratas Wistar neonatas y se cultivaron con concentraciones fisiológicas de melatonina (1 y 100 nM) o el vehículo (etanol 0.0004%) durante 72h. Las células se fijaron y se inmunodetectó la proteína básica de mielina (MBP) como marcador de diferenciación. Se realizó una contratinción nuclear fluorescente. Para evaluar la mielinización, se realizó un cocultivo a partir de precursores neuronales y gliales de acuerdo con el método de Pang et al., (2012). Se adquirieron imágenes de microscopía de fluorescencia y de microscopía confocal, respectivamente. Se analizaron mediante el programa FIJI-ImageJ v1.53t y el macro MyelinJ. El análisis estadístico de los datos (ANOVA de una vía, Tukey post hoc) se realizó con JASP v0.16.4.0 y GraphPad Prism v9.5.1. En comparación con los cultivos incubados con el vehículo, la cantidad de células inmunopositivas a MBP fue significativamente mayor en presencia de melatonina 1nM ( $p < 0.05$ ). De manera similar, en presencia de melatonina 100 nM, el porcentaje de mielinización fue significativamente mayor ( $p < 0.01$ ). Los resultados indican que la melatonina estimula los procesos de diferenciación oligodendroglial y de mielinización en modelos *in vitro*. Esto es consistente con resultados previos que sugieren que la melatonina modula la reorganización del citoesqueleto oligodendroglial para favorecer una mayor complejidad morfológica, indispensable para su maduración. En conclusión, la melatonina en concentraciones fisiológicas induce la oligodendrogénesis y la mielinización, dos procesos clave en el desarrollo y la plasticidad del sistema nervioso central.

**Palabras clave:** Melatonina, Oligodendrogénesis, Mielinización, OPCs.

## INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
Planteamiento del problema.....	16
OBJETIVOS .....	17
Objetivo general .....	17
Objetivos particulares.....	17
METODOLOGÍA.....	17
Evaluación del efecto de la melatonina en la oligodendrogénesis .....	17
Evaluación de la mielinización <i>in vitro</i> .....	18
RESULTADOS .....	21
Efecto de la melatonina sobre la diferenciación de las células precursoras de oligodendrocitos (oligodendrogénesis).....	21
Efecto de la melatonina sobre la mielinización <i>in vitro</i> .....	26
DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIONES .....	35
REFERENCIAS .....	35

## INTRODUCCIÓN

Los oligodendrocitos, células gliales del sistema nervioso central (SNC), juegan un papel fundamental en la homeostasis de los circuitos neuronales. Su principal función es la producción de la vaina de mielina, una estructura formada por varias capas de membrana oligodendroglial envueltas alrededor de segmentos de los axones neuronales. Entre cada segmento mielinizado se forman los nodos de Ranvier, que son dominios axonales enriquecidos en canales iónicos específicamente distribuidos de manera que permiten la conducción saltatoria de los potenciales de acción (impulsos nerviosos). De esta manera, la conducción de los impulsos nerviosos se lleva a cabo a una mayor velocidad y con una mejor eficiencia con respecto a un axón no mielinizado. Los principales factores que influyen en la velocidad de transmisión de los impulsos nerviosos son: el diámetro de los axones, la longitud, el espesor y la compactación de la vaina de mielina, así como el número y la longitud de los nodos de Ranvier. Así, la mielinización permite regular finamente la velocidad de conducción de los impulsos nerviosos, y con ello se logra la sincronización de señales en los circuitos neuronales.

Un oligodendrocito maduro es capaz de enrollar múltiples axones, esto se debe en gran parte a la dinámica del citoesqueleto oligodendroglial, en particular el citoesqueleto de actina, que es fundamental para llevar a cabo el proceso de mielinización, el cual es regulado de manera intrínseca por diversos factores celulares, y de manera extrínseca mediante factores solubles. Existe evidencia de que la mielina sufre modificaciones de forma continua en respuesta a demandas fisiológicas, sin embargo, es importante que el proceso mielinizante se lleve a cabo de forma correcta, ya que alrededor de la mitad del cerebro humano está compuesto por la materia blanca, formada principalmente por axones mielinizados y células gliales como los oligodendrocitos. El deterioro o daño a esta región está estrechamente relacionado con enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple, lesiones en la medula espinal y leucoencefalopatía, e incluso trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia y la depresión, entre otros.

Uno de los factores solubles que podría modular el proceso de mielinización es la melatonina. Esta indolamina endógena tiene una fisiología muy versátil; entre las propiedades descritas para esta molécula destaca su capacidad antioxidante y moduladora

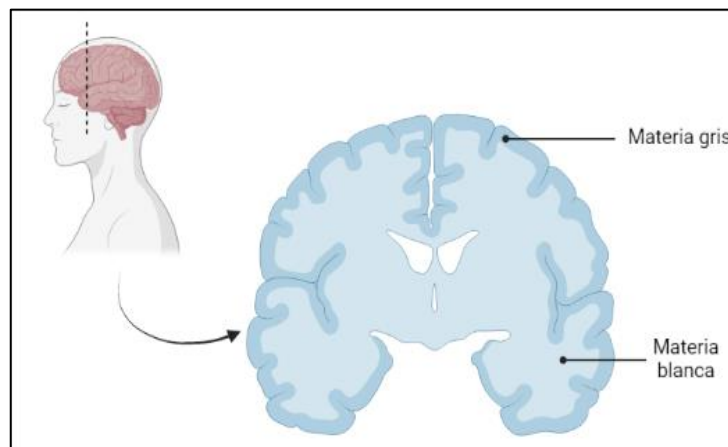
del citoesqueleto, del sistema inmune, y de diversos procesos de diferenciación celular. La melatonina también tiene un efecto neuroprotector, y en modelos de hipoxia/isquemia perinatal se ha observado que la administración de melatonina contrarresta el daño en la materia blanca.

Antecedentes del grupo de trabajo sugieren fuertemente que la melatonina puede inducir el proceso de diferenciación oligodendroglial mediante su efecto sobre el citoesqueleto. En el presente estudio se evaluó el efecto de la melatonina en los procesos de oligodendrogénesis y mielinización *in vitro*, a través del análisis de imágenes de microscopía de fluorescencia de preparaciones que fueron realizadas con anterioridad. Para la evaluación del efecto sobre la oligodendrogénesis, se analizaron imágenes obtenidas de cultivos de células precursoras de oligodendrocitos (OPCs) de corteza cerebral de la rata, que se incubaron con diferentes concentraciones de melatonina y posteriormente se realizó una inmunodetección del marcador de diferenciación oligodendroglial MBP (proteína básica de mielina) y una contratinción nuclear. Para la evaluación de la mielinización *in vitro*, se analizaron imágenes provenientes de cultivos mixtos de precursores neuronales y gliales, que se estimularon con factores de crecimiento y los suplementos necesarios para inducir primero el desarrollo axonal y posteriormente la mielinización. En esta segunda fase se incubó con melatonina para evaluar su efecto, posteriormente se realizó una inmunodetección de MBP como marcador de los fragmentos mielinizados, de los neurofilamentos como marcador axonal y del factor de transcripción OLIG2 como marcador nuclear del linaje oligodendroglial.

## REVISIÓN DE LITERATURA

El sistema nervioso permite al organismo responder a estímulos externos, además tiene la capacidad de controlar e integrar diversas funciones de los demás órganos y sistemas. En general, puede dividirse en sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP). El SNC está compuesto por el encéfalo y la médula espinal, los cuales están protegidos por el cráneo y las vértebras; rodeados además por tres membranas de tejido conjuntivo llamadas meninges. El encéfalo se divide en cerebro, cerebelo y tronco encefálico. La corteza cerebral forma la capa más externa del encéfalo, contiene la llamada “sustancia o materia gris” (debido al color gris de la corteza en un cerebro disecado en fresco) compuesta por somas neuronales, axones, dendritas y algunas células gliales (como astrocitos, oligodendrocitos, microglía y ependimocitos). En la parte interna del encéfalo se encuentra la “sustancia o materia blanca” formada principalmente por axones mielinizados (que en preparados frescos tienen un aspecto blanquecino), células gliales como oligodendrocitos, astrocitos y microglía, y vasos sanguíneos asociados (Figura 1). La médula espinal es una estructura cilíndrica que está en continuidad directa con el tronco encefálico y está organizada de forma inversa: en la parte interna se encuentra la sustancia gris y en la parte externa la sustancia blanca (Ross & Pawlina, 2015).

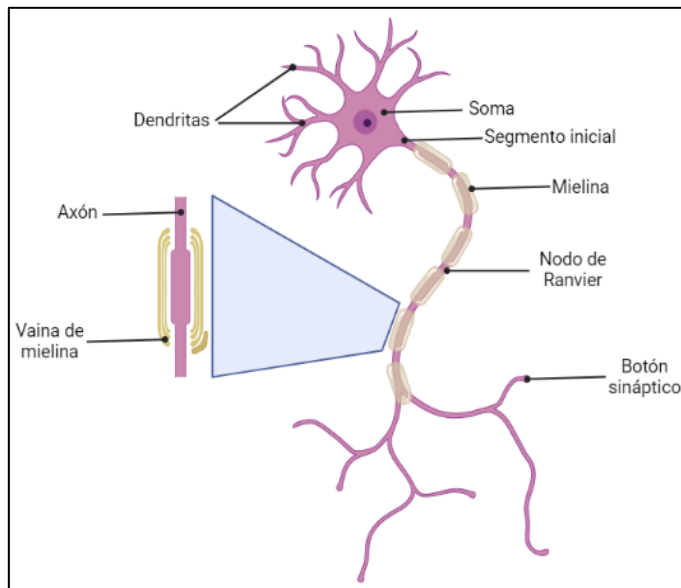
**Figura 1. Materia gris y blanca en el SNC.** Corte coronal del cerebro humano en donde se muestra de forma general como está distribuida la materia gris (parte externa) y blanca (parte interna). Elaboración propia.



Como ya se mencionó, el tejido nervioso está formado por neuronas y células gliales. Los componentes principales de una neurona son: el soma, las dendritas, el axón y las uniones sinápticas (Figura 2). El soma es la parte de la célula donde se encuentra el núcleo y varios otros organelos y tiene un alto nivel de actividad metabólica. Del soma parten dos tipos de prolongaciones o proyecciones especializadas: las dendritas, cuya principal función es

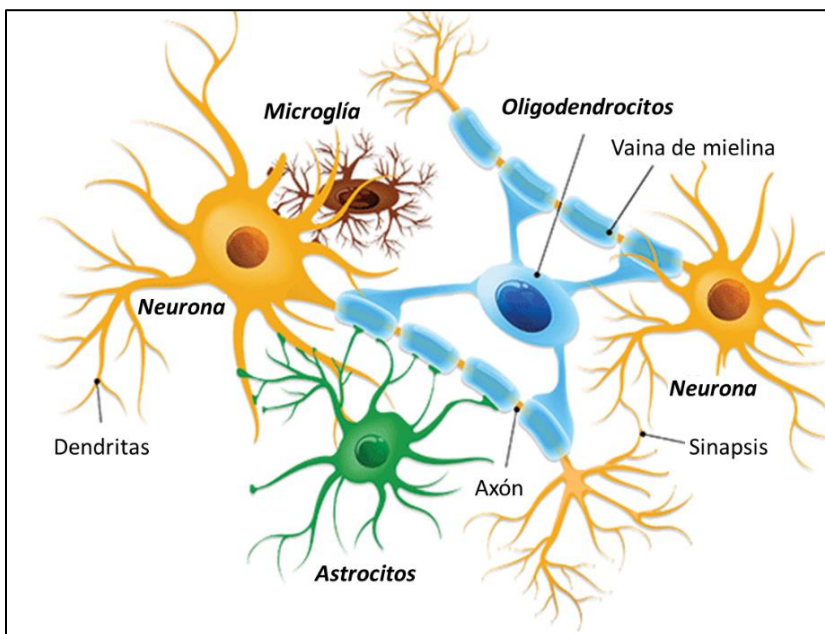
recibir los estímulos provenientes de otras neuronas, no están mielinizadas y forman múltiples arborizaciones que incrementan el área de superficie receptora. Por otra parte, el axón es una prolongación larga, que puede estar o no envuelta por una vaina de mielina producida por oligodendrocitos en el SNC y las células de Schwann en el SNP. Cada neurona tiene un solo axón, cuya principal función es transmitir estímulos a otra neurona o célula efectora (ej. célula muscular) en forma de impulsos nerviosos, los cuales constituyen la propagación de una señal electroquímica llamada “potencial de acción”. Este proceso implica una onda de despolarización de membrana en el segmento inicial del axón, en respuesta, se abren los canales de  $\text{Na}^+$  activados por voltaje. El ingreso de  $\text{Na}^+$  invierte o despolariza brevemente el potencial de membrana en reposo (-70 mV) a uno positivo (+30 mV). Posteriormente, se cierran los canales de  $\text{Na}^+$  y se abren los canales de  $\text{K}^+$ , una vez que los iones de potasio abandonan el axón la membrana vuelve a su potencial de reposo. Esta corriente local estimula las porciones adyacentes de la membrana del axón y repite la despolarización a lo largo de la membrana de éste (Bauer et al., 2009; Ross & Pawlina, 2015).

**Figura 2. Esquema de la neurona y sus partes.** La neurona es la unidad estructural y funcional del SNC. Del soma parten dos tipos de prolongaciones: dendritas y el axón. La mielina cubre de forma discontinua al axón, lo que genera los nodos de Ranvier. Elaboración propia.



Los oligodendrocitos son células gliales. Su principal función es generar la vaina de mielina en el SNC, la cual está formada por capas concéntricas de membrana plasmática oligodendrocítica. Cada oligodendrocito emite varias prolongaciones que en sus extremos distales forman una especie de lengüetas que llegan hasta los axones y los envuelven por segmentos. Un oligodendrocito puede mielinizar a uno o varios axones. La vaina de mielina no cubre de forma continua a los axones, sino que existen espacios entre cada segmento

mielinizado, llamados “nodos de Ranvier”. Los nodos de Ranvier son dominios especializados del axón en los que se redistribuyen los canales iónicos de manera particular y la despolarización de la membrana puede ocurrir sólo en ellos. Así, el ensamblaje de los nodos de Ranvier es fundamental, ya que da origen al proceso denominado “conducción saltatoria o discontinua”, el cual incrementa la velocidad de transmisión del impulso nervioso y con ello la función del sistema. Los principales factores que influyen en modular la velocidad de transmisión de los impulsos nerviosos son el diámetro de los axones, la longitud, el espesor y la compactación de la vaina de mielina y el número y la longitud de los nodos de Ranvier (Fields, 2005, 2008; Ross & Pawlina, 2015). De esta manera, la mielinización permite la regulación fina de la velocidad de conducción del impulso nervioso y la sincronización de los circuitos neuronales.



**Figura 3. Principales células gliales del SNC.**

Las células gliales se diferencian por su forma, función y origen embrionario. Los astrocitos, en general, tienen forma de estrella y regulan la composición del medio que rodea a las neuronas. Los oligodendrocitos cumplen un papel fundamental en la síntesis y mantenimiento de la capa de mielina que cubre al axón. La

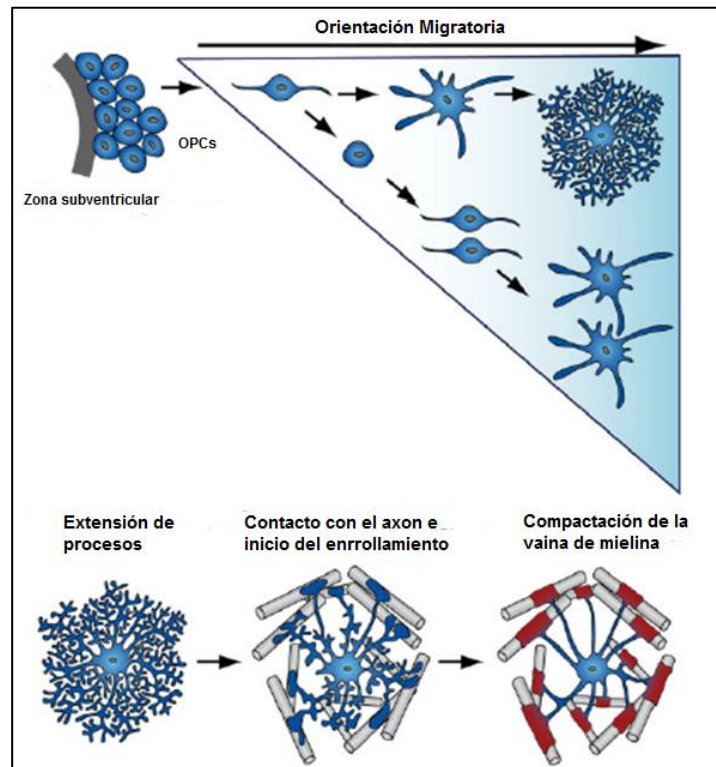
microglía, células pequeñas que tienen funciones inmunitarias, son de origen embrionario diferente al de las neuronas, oligodendrocitos y astrocitos, y semejante al de las células del sistema inmune (González & Toro, 2007; Rela, 2016).

La formación de la vaina de mielina, precedida por la migración de células precursoras de oligodendrocitos (OPCs, por sus siglas en inglés: *oligodendrocyte precursor cells*) desde la zona subventricular a diferentes regiones del cerebro y médula espinal, puede dividirse en tres partes: la primera comienza con la propagación celular, la cual también incluye una etapa de diferenciación caracterizada por la formación de prolongaciones celulares (procesos) y su ramificación, la segunda parte consiste en una mayor organización y

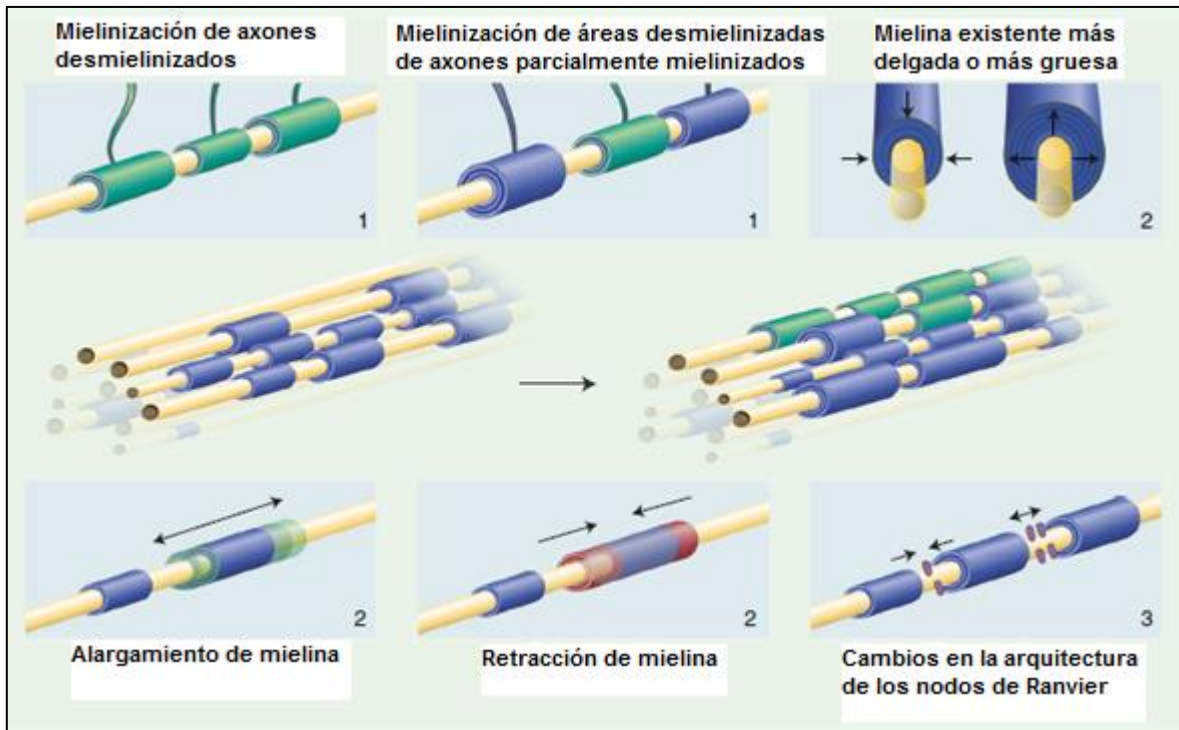
estabilización de las interacciones oligodendrocito-axón, así como la elaboración de las primeras láminas de membrana y las primeras envolturas y, finalmente, en la tercera parte comienza la compactación de las capas de mielina para formar una vaina madura (Figura 4) (Bauer et al., 2009; Tomassy et al., 2016).

**Figura 4. Mielinización intrínseca (del neurodesarrollo).**

Las OPCs migran desde la zona subventricular hacia distintas regiones del cerebro y la medula espinal, sin embargo, las células migratorias pueden diferenciarse en oligodendrocitos maduros o solo proliferar. Imagen tomada de Bauer et al., 2009.



La mielinización durante la edad adulta es un proceso dinámico que continuamente adapta y refina los circuitos del SNC en respuesta a demandas fisiológicas, además, es sensible a la experiencia social, así como a un ambiente enriquecido. La mielina puede sufrir modificaciones de tres formas (Figura 5); (1) se pueden agregar nuevos internodos, esto impulsado principalmente por la diferenciación de OPCs, sobre axones desmielinizados o áreas desmielinizadas de algunos axones, (2) puede haber modificaciones en internodos individuales, tanto en el grosor como en la longitud, además, (3) se puede modificar la arquitectura de los nodos de Ranvier e incrementar la densidad de los canales iónicos en el nodo (Bergles & Richardson, 2016; de Faria et al., 2021).

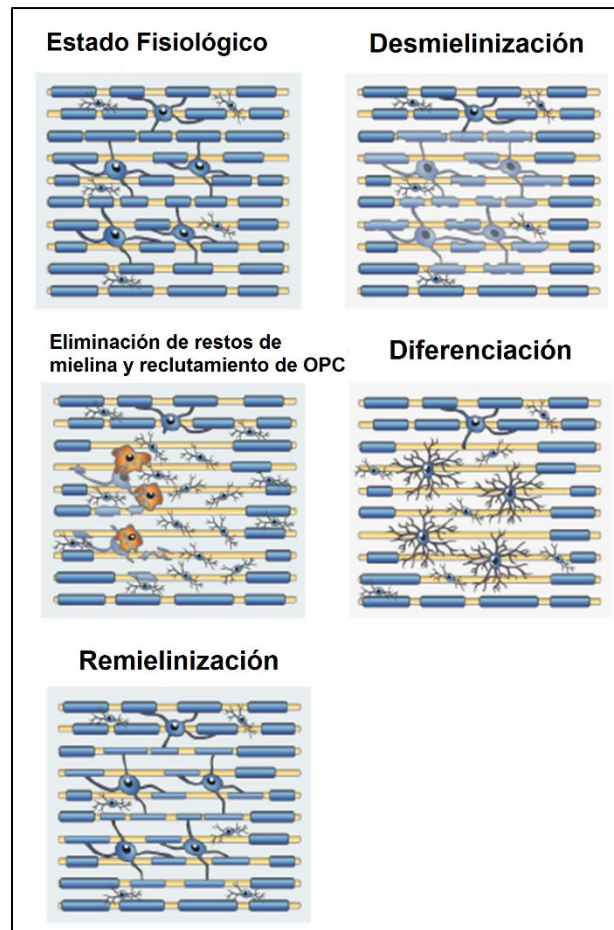


**Figura 5. Mielinización adaptativa (remodelación).** La mielina sufre modificaciones en su estructura (plasticidad) de acuerdo con las demandas fisiológicas y del ambiente. (1) Adición de nuevos internodos, mediado principalmente por OPCs que se diferencian y maduran; (2) remodelación de la mielina existente (alargamiento o retracción de internodos) mediado principalmente por oligodendrocitos maduros y (3) remodelación estructural de los nodos de Ranvier. Estos cambios pueden ocurrir en respuesta a la actividad neuronal y a la experiencia. Imagen modificada de Faria et al., 2021.

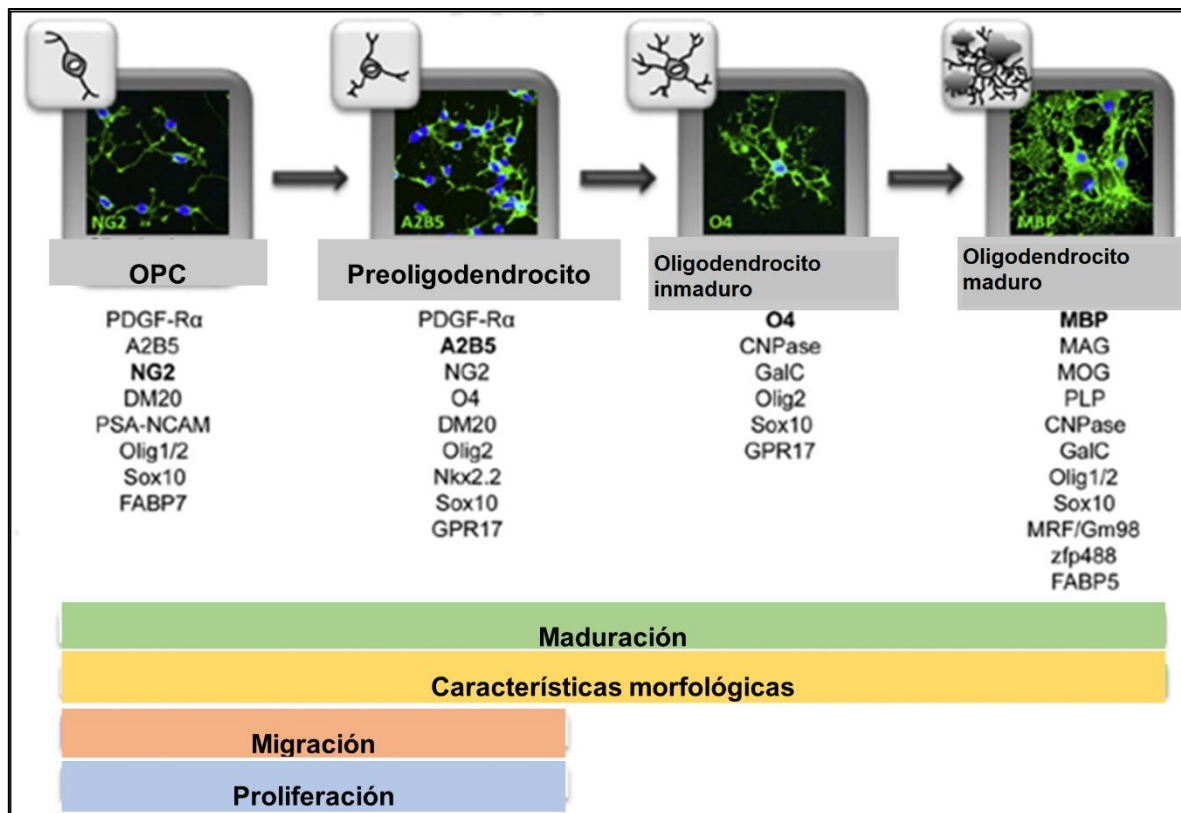
Alrededor de la mitad del cerebro humano está compuesto por materia blanca, axones mielinizados y células gliales. Los daños o lesiones a esta región cerebral están asociados con enfermedades neurodegenerativas como esclerosis múltiple, lesiones en la médula espinal, leucoencefalopatía, incluso trastornos neurológicos caracterizados por afectar principalmente la materia gris como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington, muestran cambios claros en la materia blanca subcortical. Además, en diversos trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia, el trastorno bipolar y la depresión se han reportado alteraciones estructurales y funcionales en la materia blanca (Fields, 2008; Valdés-Tovar et al., 2022). Es importante que el proceso de mielinización se lleve a cabo de una forma adecuada para un buen funcionamiento cerebral, ya que los defectos en la formación y el mantenimiento de la mielina conllevan a resultados clínicos devastadores. Los daños a la mielina, en general, se pueden ordenar dentro de tres categorías: pérdida

de mielina (desmielinización), producción anormal de mielina (dismielinización) y producción reducida de mielina (hipomielinización). Sin embargo, la hipermielinización también se ha descrito en ratones que sobreexpresan el gen de susceptibilidad a la esquizofrenia *Nrg1* (Brinkmann et al., 2008). Además del proceso de remodelación o plasticidad de la mielina, existe un proceso endógeno de regeneración que se denomina remielinización. Este proceso a menudo resulta ineficiente en enfermedades como la esclerosis múltiple, en la cual la edad es uno de los factores importantes a considerar (envejecimiento), así como la entrada de los OPCs a un estado de inactividad (de Faria et al., 2021). Por otro lado, la remielinización parece ser efectiva en la adolescencia y la etapa adulta debido a que los OPCs son capaces de responder a los daños en la mielina (Figura 6). Similarmente al proceso de remodelación, la remielinización también aumenta con el aprendizaje de tareas complejas como estudiar un segundo idioma, hacer malabares, aprender a tocar el piano; actividades que no solo abarcan habilidades motoras, si no también sensoriales y cognitivas (Saab & Nave, 2017; Tomassy et al., 2016).

**Figura 6. Remielinización.** Los axones son mielinizados por oligodendrocitos maduros, sin embargo, si ocurre un daño, el oligodendrocito muere y la mielina se desintegra. Posteriormente, inicia una etapa de reclutamiento de OPCs y eliminación de los restos de mielina por parte de la microglía. Los OPCs que migran y los que ya están en el área dañada empiezan a proliferar y a continuación inicia la etapa de diferenciación y maduración oligodendroglial. Finalmente, en la etapa de remielinización, los oligodendrocitos maduros generan la mielina faltante. Imagen modificada de Faria et al., 2021.



La diferenciación y maduración oligodendroglial, también llamada **oligodendrogénesis**, es indispensable para los procesos de mielinización y de remielinización, ya que sólo los oligodendrocitos maduros tienen capacidad mielinizante. Durante dicho proceso, existen varios estadios de diferenciación, de acuerdo con la capacidad migratoria, de proliferación y de cambios en la complejidad morfológica y la expresión de marcadores moleculares específicos. La oligodendrogénesis se puede dividir en cuatro estadios: desde OPCs, los preoligodendrocitos, los oligodendrocitos inmaduros y los oligodendrocitos maduros (Figura 7) (Barateiro et al., 2016; Barateiro & Fernandes, 2014).



**Figura 7. Estadios de la oligodendrogénesis.** Los cambios en cada estadio se definen de acuerdo con el aumento en la complejidad morfológica, la expresión de marcadores moleculares, la habilidad para migrar, proliferar y diferenciarse. Imagen modificada de Barateiro & Fernandes, 2014.

Como se mencionó, el aumento en la complejidad morfológica es clave en el proceso de maduración oligodendroglial. Estos cambios morfológicos son regulados por el citoesqueleto, en particular, por dos de sus componentes primordiales: los microtúbulos (MT) y los microfilamentos (MF) (Figura 8), que, además, funcionan como vías de transporte

de organelos, vesículas y proteínas. Los MT están formados por heterodímeros de las subunidades proteicas de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina, las cuales al unirse generan una estructura cilíndrica. En el cuerpo celular se organizan para formar un patrón en forma de malla, mientras que en la periferia forman filamentos paralelos al eje principal de una prolongación. Los oligodendrocitos expresan  $\beta_{IV}$ -tubulina, una forma específica de  $\beta$ -tubulina encontrada sólo en estas células. Esta proteína se localiza en la región proximal de las prolongaciones de oligodendrocitos premielinizantes, así como en las regiones distales de las prolongaciones en células mielinizantes. La presencia de una isoforma específica de tubulina denota la importancia del citoesqueleto oligodendroglial durante los diferentes estadios de diferenciación (Bauer et al., 2009; Lunn et al., 1997; Terada et al., 2005).

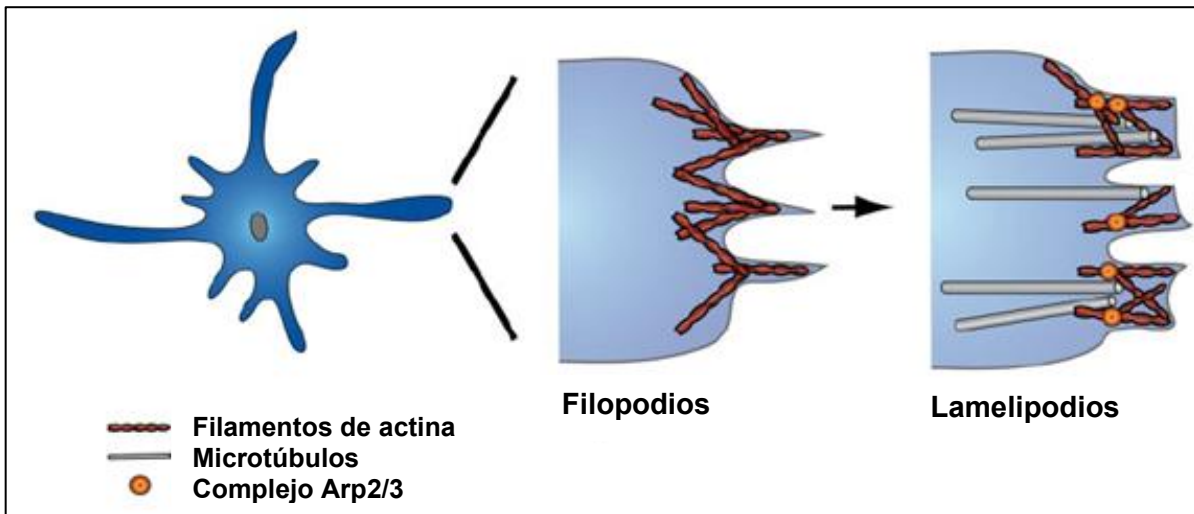
La tubulina puede tener diversas modificaciones postraduccionales, tales como acetilación y tirosinación en la subunidad alfa y fosforilación, poliglutamilación y poliglicilación en ambas subunidades. Los oligodendrocitos contienen  $\alpha$ -tubulina acetilada y tirosinada tanto en el cuerpo celular como en sus prolongaciones, la única diferencia es la ausencia de  $\alpha$ -tubulina en los extremos más distales de las prolongaciones. Además, la acetilación de  $\alpha$ -tubulina se relaciona con la estabilidad de las prolongaciones en oligodendrocitos maduros, por ello, durante la etapa de diferenciación en donde se requiere mayor dinámica microtubular, es necesario que la tubulina sea desacetilada, dicho proceso es llevado a cabo por la enzima reguladora de información silenciosa tipo 2 (SIRT2). La expresión de dicha enzima se relaciona con cambios morfológicos, procesos de ramificación y un incremento en la expresión de la 2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa (CNP), lo que ocurre cuando las células se encuentran en un estado de premielinización. La tirosinación de la  $\alpha$ -tubulina en su extremo C-terminal conduce a la asociación de los microtúbulos con proteínas conectoras citoplasmáticas (CLIP), esta unión podría servir como un puente entre microtúbulos y microfilamentos para la formación de filopodios y lamelipodios. Los MT se propagan y extienden dentro de los dominios ricos en MF, sin embargo, cercanos a la parte más distal de una prolongación comienzan a disminuir. De manera similar, los cambios en la conformación de la membrana plasmática que acompañan a la ramificación de una prolongación dependen de la disposición de los MF (Akhmanova & Hoogenraad, 2005; Bauer et al., 2009; Li et al., 2007; Lunn et al., 1997; Song et al., 2001). Existen varias proteínas asociadas que se unen y estabilizan a los microtúbulos polimerizados y cambian la dinámica de polimerización/despolimerización. Las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs, por sus siglas en inglés: *microtubule-associated protein*), están implicadas en los procesos de transducción de señales y participan en la interacción de los microtúbulos con

otros componentes del citoesqueleto, además, son importantes en el anclaje de cinasas y fosfatasas, así como en el transporte vesicular. En oligodendrocitos se expresan principalmente la MAP1B, MAP2C y MAP4 (Bauer et al., 2009; Black et al., 1994; Vouyiouklis & Brophy, 1995).

Los MF se localizan debajo de la membrana plasmática, tanto en el cuerpo celular como en las prolongaciones de los oligodendrocitos, particularmente en el área donde se forman nuevas prolongaciones. La actina, como proteína de unión a ATP, está presente en dos estados: como monómeros globulares (G-actina) o como polímeros filamentosos (F-actina), esta última se concentra principalmente en las puntas de nuevas prolongaciones, así como en filopodios delgados. En los oligodendrocitos, los MF desempeñan un papel importante en el proceso de extensión de las prolongaciones o procesos, ya que las primeras protrusiones son formadas por la polimerización de filamentos individuales que posteriormente resultan en la aparición de filopodios y lamelipodios. Los filopodios son estructuras estrechas de actina dispuesta en haces paralelos, mientras que los lamelipodios son estructuras más amplias que contienen mallas de actina organizadas de forma ortogonal. En general, la formación de estas estructuras es catalizada por proteínas de unión a actina, tales como la proteína relacionada con actina 2/3 (Arp2/3), la proteína Spire y la proteína Cobl (Cordon-Bleu) (Qualmann & Kessels, 2008; Rumsby et al., 2003; Simpson & Armstrong, 1999; Song et al., 2001).

Las proteínas asociadas a actina en general comparten la habilidad de interactuar con los MF, sin embargo, los mecanismos de unión son diferentes. En oligodendrocitos, la miosina-IIB interactúa con los MF, la cual permite a los MF formar lamelipodios. Las proteínas Mayven (KLHL2) y MRP2 son proteínas que presentan una distribución y función similar, además, se expresan en todos los estadios de desarrollo y están distribuidas a lo largo de las prolongaciones de los oligodendrocitos (Jiang et al., 2005, 2007). Ermin es otra proteína que se expresa relativamente tarde en el proceso de mielinización, se localiza en zonas específicas que emanan del cuerpo celular y participa en el entrecruzamiento de proteínas de membrana y del citoesqueleto. En oligodendrocitos cultivados, Ermin se presenta en los bucles paranodales no compactados y en la capa externa de la vaina de mielina *in vivo*, lo que podría sugerir que dicha proteína participa en el reordenamiento al final del proceso de

envoltura o durante la compactación de la vaina de mielina (Bauer et al., 2009; Brockschneider, 2006).

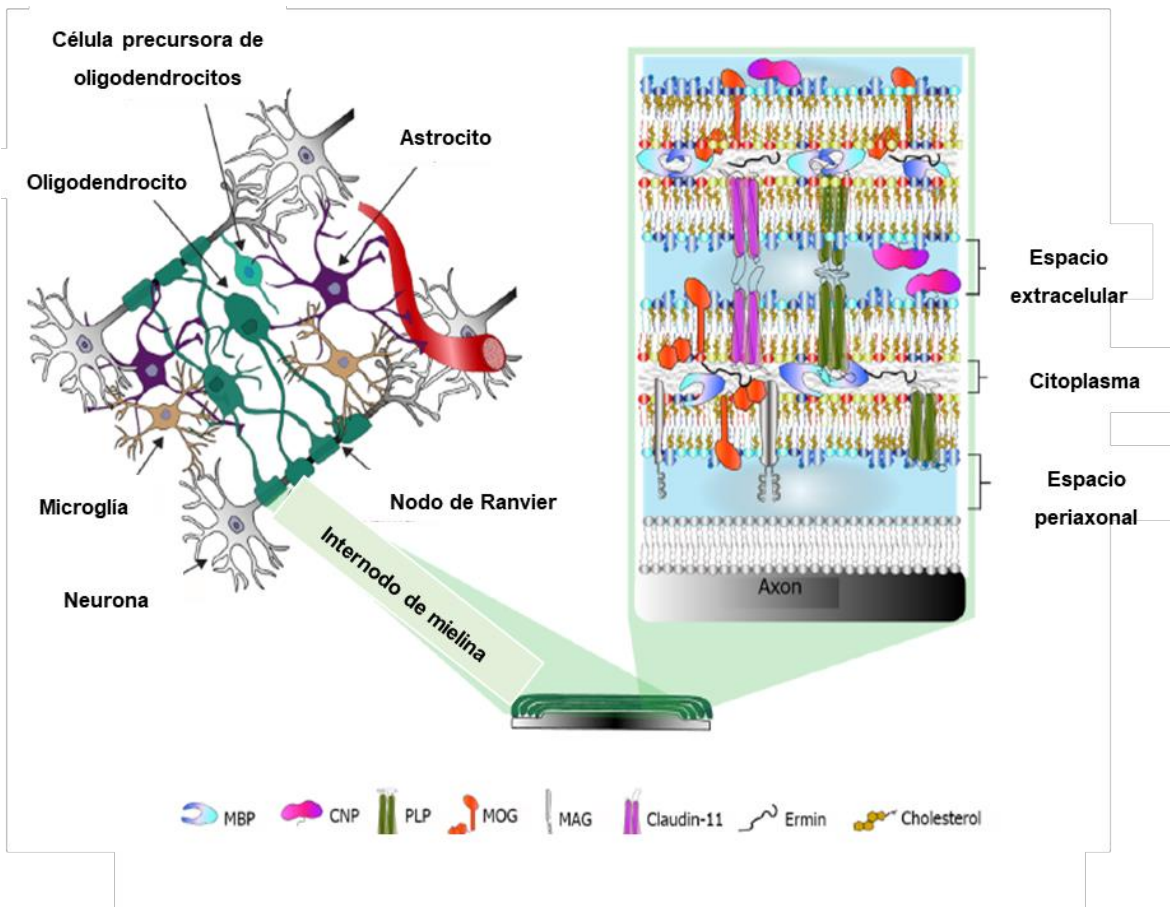


**Figura 8. Citoesqueleto oligodendroglial.** Formación de los procesos regulada por la polimerización de MF, lo que conduce a la formación de filopodios, los cuales son mediados por el complejo Arp2/3 para ensancharse y extenderse y formar lamelipodios. Imagen modificada de Bauer et al., 2009.

En el SNC, existen proteínas específicas que forman parte de la estructura de la mielina, algunas de ellas están asociadas con el citoesqueleto oligodendroglial y regulan su función. La proteína básica de mielina (MBP, por sus siglas en inglés: *myelin basic protein*) es la segunda proteína más abundante, después de la proteína proteolipídica (PLP). En el SNC, induce la polimerización de F-actina, así como el agrupamiento de MF. La fosforilación de la MBP determina su ubicación, ya que puede encontrarse tanto en el cuerpo celular como en la vaina de mielina. En etapas posteriores del proceso de mielinización, la MBP se encuentra desfosforilada, lo que permite su interacción con lípidos de membrana y su papel como proteína de anclaje para actina, sin embargo, la función principal de dicha proteína es la compactación de la vaina de mielina, ya que permite interconectar las membranas de las capas de mielina sobre su superficie intracelular (Bates et al., 2003; Boggs, 2006).

La CNP en oligodendrocitos promueve el proceso de extensión de sus prolongaciones. Esta proteína aumenta su expresión en la etapa de premielinización y se mantiene en niveles elevados durante y después de la mielinización, además, se une a MT y MF. La CNP induce la reorganización del citoesqueleto para formar protrusiones de membrana ricas en F-actina que después son invadidas por MT (Bauer et al., 2009; Lee et al., 2005). Otra proteína

específica de mielina es la glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG, por sus siglas en inglés: *Myelin oligodendrocyte glycoprotein*). Es una proteína integral de la membrana de los oligodendrocitos, con un dominio tipo inmunoglobulina (Ig) extracelular, lo que sugiere una función de adhesión celular. Está localizada en las láminas externas de la vaina de mielina. La expresión de MOG comienza en una etapa tardía en comparación con otras proteínas de mielina, debido a esto MOG es un marcador para identificar a un oligodendrocito maduro. Esta proteína no interactúa de forma directa con el citoesqueleto, sin embargo, regula la estabilidad de MT a través de la MBP (Bauer et al., 2009; Pham-Dinh et al., 1993; Reindl & Waters, 2019). Por último, la glicoproteína asociada a mielina (MAG, por sus siglas en inglés: *Myelin-associated glycoprotein*) constituye entre el 0.1 y el 1% de todas las proteínas de mielina en el SNC. Se expresa en dos isoformas, las cuales difieren en su dominio extracelular; L-MAG y S-MAG. Esta proteína desempeña un papel importante en el mantenimiento de la integridad de la mielina en el SNC y participan en el anclaje de los internodos al axón (Schachner & Bartsch, 2000).



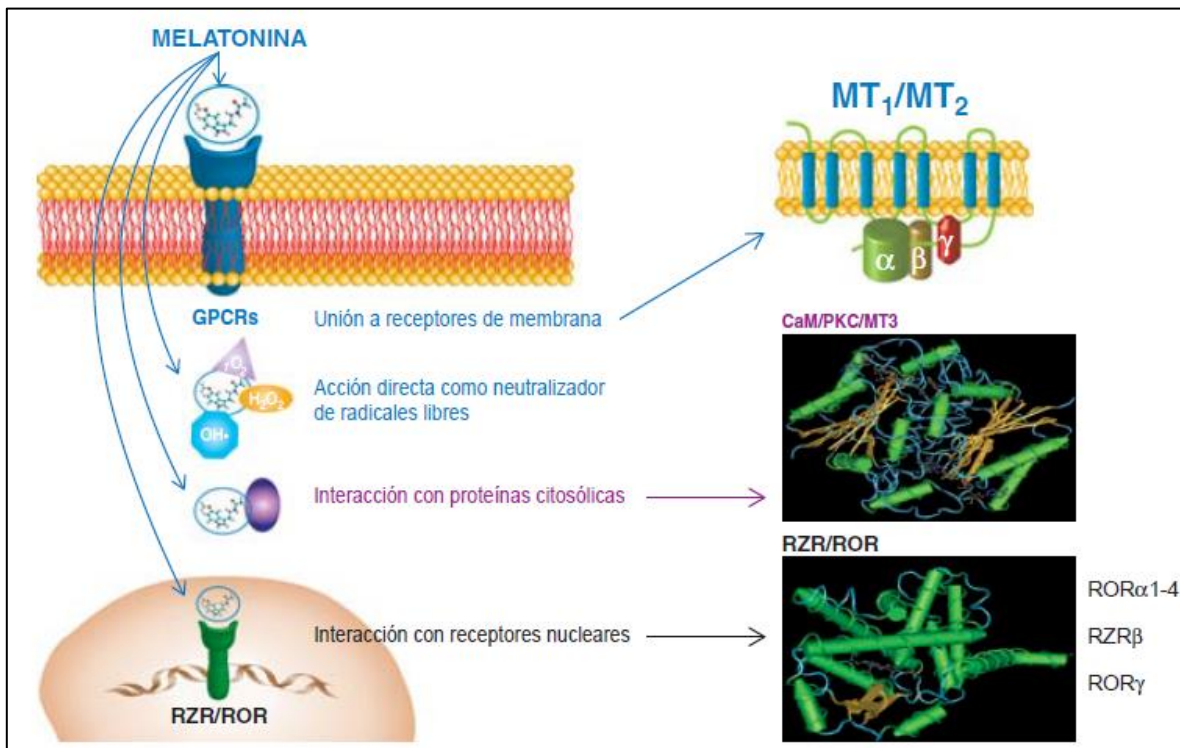
**Figura 9. Proteínas de la mielina.** En el SNC, existen proteínas específicas de mielina asociadas al citoesqueleto oligodendroglial; la proteína básica de mielina (MBP), 2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa (CNP), la proteína proteolipídica (PLP), la glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG), la glicoproteína asociada a mielina (MAG), y Ermin. Imagen modificada de Valdés-Tovar et al., 2022.

Tanto la oligodendrogénesis como la mielinización son procesos cuyas diferentes etapas son reguladas mediante diversos factores celulares, entre ellos se han identificado factores de transcripción, proteínas remodeladoras de cromatina y ARN no codificante; sin embargo, además de estos factores intrínsecos, proteínas asociadas a la membrana, factores solubles y proteínas de la matriz extracelular están involucrados de manera positiva o negativa en la regulación de los diferentes estadios de proliferación, diferenciación y maduración oligodendroglial y la mielinización (Tomassy et al., 2016).

Entre las moléculas endógenas que podría modular los procesos de diferenciación de oligodendrocitos y la formación de mielina está la melatonina. Ésta es una indolamina endógena con una fisiología muy versátil. Entre sus funciones, datos experimentales obtenidos en varios modelos de animales recién nacidos con lesiones cerebrales respaldan la noción de un efecto neuroprotector (Biran et al., 2014) , además, la melatonina ha sido caracterizada como uno de los factores que modulan la neuroplasticidad (neurogénesis, dendritogénesis, axonogénesis, sinaptogénesis), así como el rol de los receptores de melatonina (MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub>) y las vías de señalización subyacentes a los efectos moduladores en la neuroplasticidad (Valdés-Tovar et al., 2018). Es capaz de actuar como un modulador de los cambios dinámicos y diferenciales en la organización del citoesqueleto de diversas estirpes celulares (Benitez-King, 2006).

La síntesis de melatonina en la glándula pineal ocurre durante la noche, es decir, durante la fase de oscuridad del ciclo de iluminación ambiental, y la sincronización del ritmo circadiano de su síntesis con respecto al ciclo luz/oscuridad ocurre a través del tracto retinohipotalámico. Durante la fase de oscuridad, la unión de la noradrenalina a sus receptores específicos situados en las membranas de los pinealocitos promueve la activación de la síntesis de melatonina; su formación comienza con la captación del aminoácido triptófano, procedente del torrente circulatorio. Este aminoácido es hidroxilado en la mitocondria por la triptófano-hidroxilasa. La mayor parte del 5-hidroxitriptofano resultante se convierte a serotonina en el citosol, posteriormente, la serotonina es N-acetilada y se convierte en N-acetilserotonina; precursor que es O-metilado por la

hidroxiindol-O-metiltransferasa, lo que da lugar a la melatonina. La melatonina puede unirse a receptores de la membrana plasmática, sin embargo, su carácter lipofílico le permite entrar fácilmente en la célula, e incluso, llegar hasta el núcleo. Se une a los receptores de membrana  $MT_1$  y  $MT_2$ , acoplados a proteínas G y en anfibios y aves se ha caracterizado un tercer sitio de unión llamado  $MT_3$  con actividad de quinona reductasa (Guerrero et al., 2007; Gunata et al., 2020).



**Figura 10.** Principales mecanismos de acción de la melatonina. La melatonina puede unirse a receptores de la membrana plasmática. El receptor  $MT_1$  ha sido identificado en el núcleo supraquiasmático, los vasos sanguíneos del corazón y cerebro. El  $MT_2$  se localiza principalmente en el hipotálamo, la retina, los riñones y el tejido cardíaco. El  $MT_3$  muestra similitudes con respecto al  $MT_2$  en términos de anclaje.  $ROR\alpha$ ,  $ROR\beta$  and  $ROR\gamma$  son sitios de unión nucleares (NRs, por sus siglas en inglés: nuclear receptors), dentro de sus funciones principales esta la regulación metabólica, reacción inmune y están involucrados en la respuesta ante el estrés (Guerrero et al., 2007; Gunata et al., 2020). Imagen tomada de Guerrero et al., 2007.

La melatonina puede contribuir a la sincronización de los ritmos circadianos, una característica importante para el tratamiento de trastornos del estado de ánimo, en donde el desacoplamiento en los ritmos circadianos prevalece. En pacientes con estos trastornos

los niveles de melatonina disminuyen. En parte, esta disminución puede deberse a la respuesta inflamatoria mediada por la infiltración de células inmunes a través de la barrera hematoencefálica y el aumento de proteínas proinflamatorias. Por otro lado, la disminución en los niveles de melatonina puede estar relacionado con una variación genética de la enzima N-acetilserotonina O-metiltransferasa. La melatonina puede incrementar la expresión de los genes Per1 y Per2, los cuales juegan un papel fundamental en el reinicio del reloj circadiano. Además, funge como un neutralizador directo de radicales libres y potencia el efecto de antioxidantes clásicos e induce la expresión de enzimas antioxidantes. En mamíferos, el control central de los ritmos circadianos es ejercido por el núcleo supraquiasmático, que está sincronizado por los niveles lumínicos ambientales percibidos por la retina y extiende su sincronización al resto del organismo mediante la síntesis rítmica de melatonina (Guerrero et al., 2007; Valdés-Tovar et al., 2018).

Como se mencionó previamente, los efectos como modulador del citoesqueleto y como un factor de diferenciación de diversas estirpes celulares, hacen de la melatonina una molécula idónea para modular la oligodendrogénesis y la mielinización. En este contexto, existen evidencias de modelos animales de hipoxia y/o isquemia perinatal en los que la administración de melatonina atenúa el daño de la materia blanca (Kaur et al., 2010; Miller et al., 2014; Olivier et al., 2009; Villapol et al., 2011). En estos estudios se observó que la melatonina no induce la proliferación de los precursores de oligodendrocitos, por lo que los autores sugieren que esta indolamina podría favorecer la maduración de éstos, y que su efecto podría estar mediado, al menos parcialmente, por sus receptores de membrana (Olivier et al., 2009). Además, se ha demostrado la habilidad de la melatonina para disminuir la desmielinización y mejorar la remielinización a través de sus efectos sobre la actividad locomotora de ratones con esclerosis múltiple (Abo Taleb & Alghamdi, 2020). En estos modelos, parte del efecto de la melatonina puede atribuirse a los mecanismos que reducen los moduladores de la inflamación, así como también sus efectos antioxidantes, los cuales reducen la formación de radicales libres (Kaur et al., 2010; Villapol et al., 2011).

### **Planteamiento del problema**

Si bien se sabe que la melatonina tiene efectos moduladores sobre el citoesqueleto y sobre procesos de diferenciación celular en diversas estirpes, y que puede tener un efecto de protección y/o revertir los efectos del daño en la materia blanca cerebral en varios modelos animales, no se sabe cuál es la participación de esta indolamina, en concentraciones fisiológicas, en la diferenciación oligodendroglial y en la mielinización en el SNC.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Evaluar el efecto de la melatonina en los procesos de oligodendrogénesis y mielinización del SNC, en modelos *in vitro*, mediante el análisis de imágenes de microscopía de fluorescencia.

### Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto de la melatonina en la oligodendrogénesis a partir de precursores celulares aislados.
2. Evaluar el efecto de la melatonina en la mielinización en un modelo *in vitro* de cocultivo.

## METODOLOGÍA

### Evaluación del efecto de la melatonina en la oligodendrogénesis

Previamente se desarrollaron cultivos de OPCs, aislados de corteza cerebral de ratas Wistar mediante el método de (McCarthy & de Vellis, 1980) (n=8), que se estimularon con melatonina 1 y 100 nM [concentraciones semejantes a las reportadas en el SNC (Reiter, 1993; Tan et al., 2016) durante tres días. Transcurrido el tiempo de incubación, las células fueron fijadas y se realizó una inmunodetección fluorescente del marcador de diferenciación oligodendroglial MBP y una contrateñición nuclear. Posteriormente, se obtuvieron imágenes de microscopía de fluorescencia de al menos 8 campos al azar. Se cuenta con al menos 27 imágenes por grupo experimental.

El análisis de las imágenes obtenidas se llevó a cabo mediante el software Image J. En total se analizaron 95 imágenes, divididas en dos canales: en el canal azul se contabilizaron los núcleos celulares contrateñidos con el compuesto DAPI y en el canal verde de cada imagen, se contaron las células inmuno-positivas a MBP. Los datos se concentraron en un archivo de Excel, organizados en columnas correspondientes al tratamiento, el número de núcleos y el número de células MBP (+). En esta base de datos el tratamiento 1 corresponde al vehículo o control (VEH), el tratamiento 2 a melatonina 1 nM (MEL 1 nM) y el tratamiento 3 a melatonina 100 nM (MEL 100 nM). El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó en JASP versión 0.16.4.0 mediante un ANOVA de una vía, y las diferencias entre los grupos

se establecieron mediante la prueba *post hoc* de Tukey. Se consideró diferencia significativa con una  $p < 0.05$ .

### **Evaluación de la mielinización *in vitro***

Por otra parte, para la evaluación de la mielinización *in vitro*, se desarrollaron cultivos mixtos de células de la corteza cerebral (n=8 ratas) que se estimularon con los factores de crecimiento y suplementos necesarios para el desarrollo axonal y posteriormente para inducir la mielinización (Pang et al., 2012). Los cultivos se estimularon durante 13 días con las concentraciones molares de melatonina mencionadas previamente para evaluar su efecto sobre la mielinización. Al cabo del tiempo de incubación los cultivos se fijaron y se realizó una inmunofluorescencia triple para detectar axones (neurofilamentos), proyecciones oligodendrogiales y tractos mielinizados (MBP) y núcleos positivos a OLIG2, un marcador de linaje oligodendroglial.

Se adquirieron al menos 42 imágenes de microscopía confocal de cada grupo experimental (4 cubreobjetos de cada grupo), mediante un microscopio ZEISS LSM900 con Airyscan2 y el software Zen versión 3.3 (*blue edition*). Cada imagen se compuso de 6 regiones contiguas (*tiles*) de 491.5 x 491.5  $\mu\text{m}$  y 7 secciones ópticas (*slices*) obtenidas con un intervalo de 0.38  $\mu\text{m}$ , para abarcar un total de 2.28  $\mu\text{m}$ . Mediante las funciones de procesamiento de imágenes del software Zen 3.3, se hizo el empalme de las regiones contiguas con la función *Stitching*, para lo que se tomó como referencia el canal azul correspondiente a los axones. Posteriormente, se hizo un empalme de las secciones ópticas mediante la función *Extended Depth of Focus* mediante el método de *Maximum projection*, y dichas imágenes se procesaron mediante el software Image J versión 1.53t de la siguiente manera:

File → Open: buscar el archivo correspondiente en las carpetas → Abrir

Series 1 → OK Esta función abre los 3 canales de la imagen [verde: MBP, azul: neurofilamentos (NF), rojo: núcleos]. El plugin de análisis MyelinJ sólo trabaja con los canales correspondientes a los axones y la mielina (azul y verde, respectivamente) por lo que se cerró el canal rojo en todos los casos.

Image → Type → 8-bit

Image → Adjust → Brightness-Contrast: para cada canal se aplicó la función Auto → Apply → OK

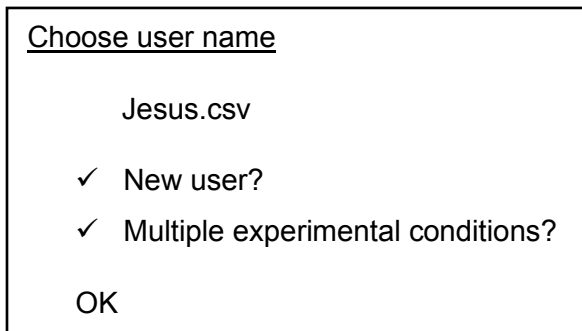
Image → Color → Merge Channels: C=0 green; C=1 blue → Create Composite → OK

Image → Type → RGB Color

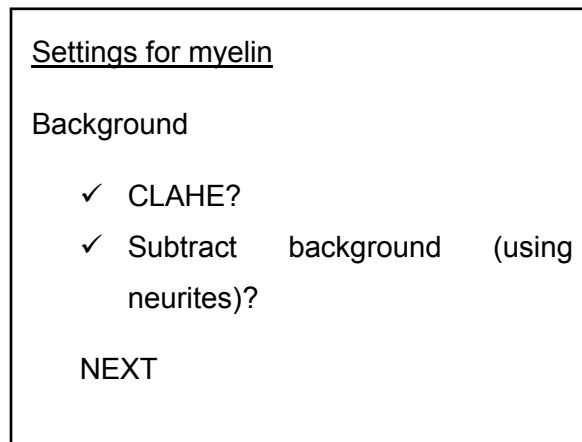
File → Save as → Tiff...

Los archivos de imagen se guardaron organizados en carpetas diferentes según el tratamiento y esas carpetas a su vez dentro de una carpeta general llamada Confocal cultivos.

A continuación, se utilizó el plugin denominado MyelinJ (desarrollado para uso con el software Fiji-ImageJ) (Whitehead et al., 2019); para el análisis de las imágenes. Para ello en ImageJ se elige la pestaña Plugins → MyelinJ-master → MyelinJ. En el primer cuadro de opciones se elige el nombre de un archivo con extensión .csv para que se guarden los datos, y se elige nuevo usuario y la opción de condiciones experimentales múltiples:



En el siguiente cuadro de opciones el programa solicita las condiciones en las que procesará las imágenes correspondientes al canal de mielina:



Posteriormente se definen las condiciones para el canal correspondiente a los axones:

Settings for dense neurites

Normalise local contrast

Standard deviation 0.5 → Sparse neurites

Settings sparse neurites

Background

✓ Subtract background?

Threshold method

Default

Min: 12 Max: 255 → Apply

Set for analysis

Start analysis

Una vez establecidas dichas condiciones de análisis, el plugin MyelinJ procesa todas las imágenes contenidas en las carpetas y arroja los datos correspondientes (% myelination, % neurite density) en archivos .csv, así como las imágenes resultantes de cada canal después del procesamiento realizado.

Los datos se concentraron en un solo archivo .csv de manera ordenada, en tres columnas correspondientes al tratamiento, el porcentaje de mielinización (% *myelination*) y el porcentaje de densidad axonal (% *neurite density*). Esta base de datos se analizó mediante el programa GraphPad Prism versión 9.5.1 y el programa JASP versión 0.16.4.0

En el programa GraphPad Prism se realizó un análisis de datos extremos, se retiraron dichos datos y se hizo una prueba de Kolmogorov Smirnov. Los datos tuvieron una distribución normal, por lo que se procedió a realizar un ANOVA de una vía y una prueba *post hoc* de Tukey. Se consideró diferencia significativa con una  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

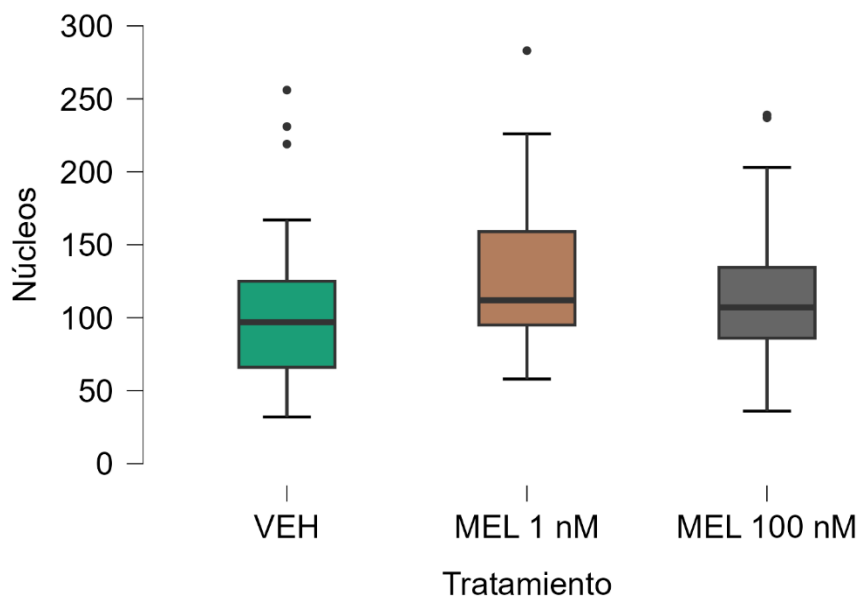
### Efecto de la melatonina sobre la diferenciación de las células precursoras de oligodendrocitos (oligodendrogénesis)

Los siguientes resultados corresponden al análisis de 95 imágenes mediante el software Image J. Se determinó el número de núcleos teñidos con el compuesto DAPI y el número de células inmuno-positivas a MBP: MBP(+). En la Tabla 1 se muestra la estadística descriptiva obtenida del análisis de los datos mediante el software Jasp.

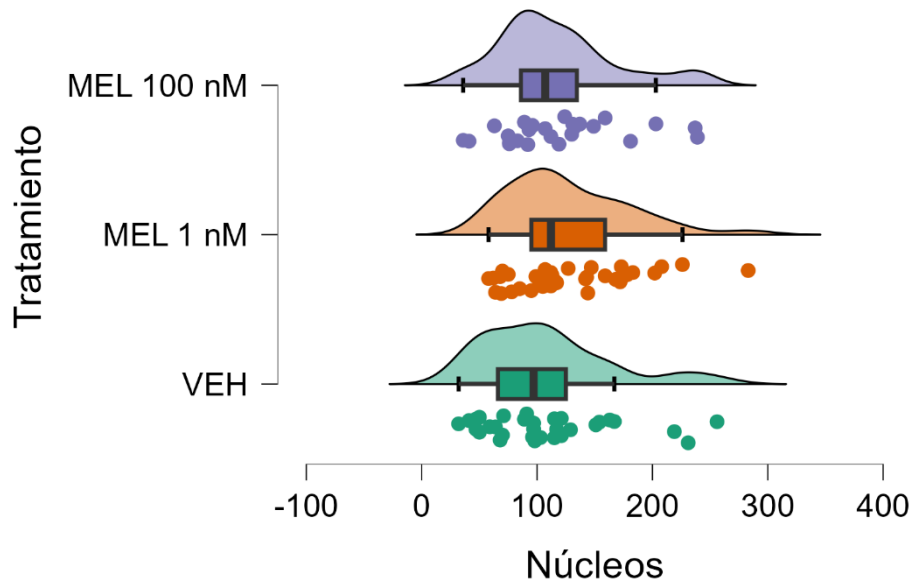
**Tabla 1. Número de núcleos y células inmunopositivas a MBP tras la incubación con MEL por 72h.**

Tratamiento	Núcleos			Células MBP (+)		
	VEH	MEL 1 nM	MEL 100 nM	VEH	MEL 1 nM	MEL 100 nM
n (imágenes)	31	37	27	31	37	27
Media	107	126	117	14	23	20
Mediana	97	112	107	13	21	19
Desviación estándar	56	51	52	9	13	9

**A**

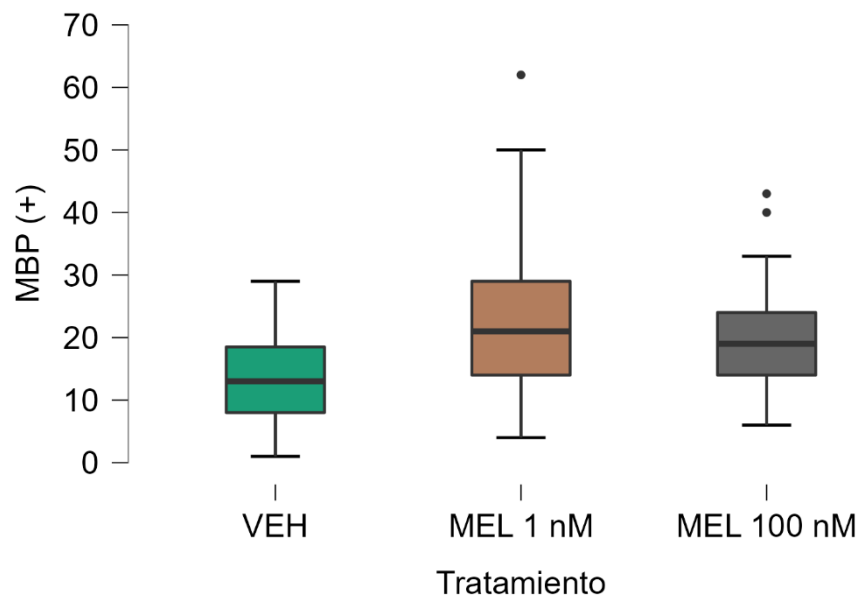


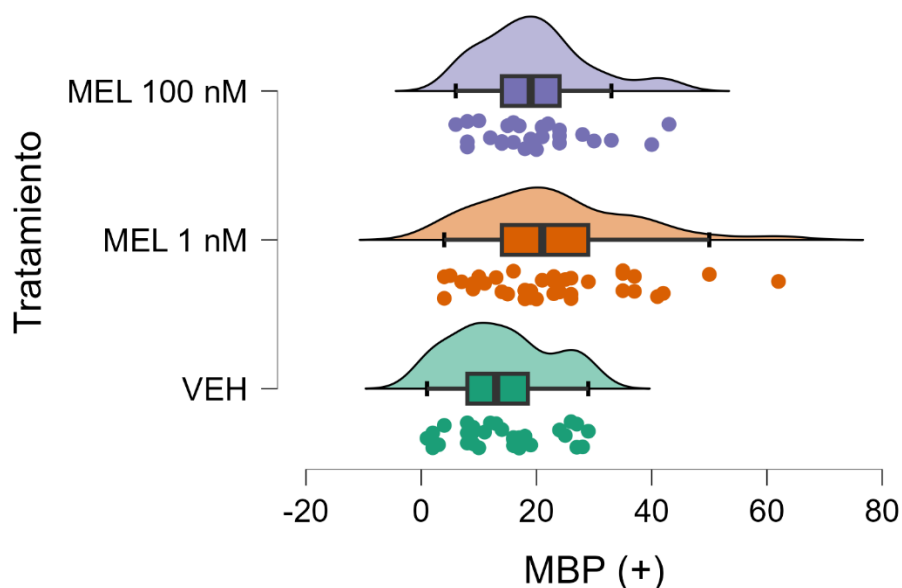
**B**



**Figura 1. Determinación del número de núcleos teñidos con DAPI para cada tratamiento.** En el panel A se muestra un gráfico de tipo caja y bigote y en el panel B un gráfico de tipo nube de lluvia (raincloud plot). Ambos gráficos permiten apreciar la dispersión y distribución de los datos.

**A**



**B**

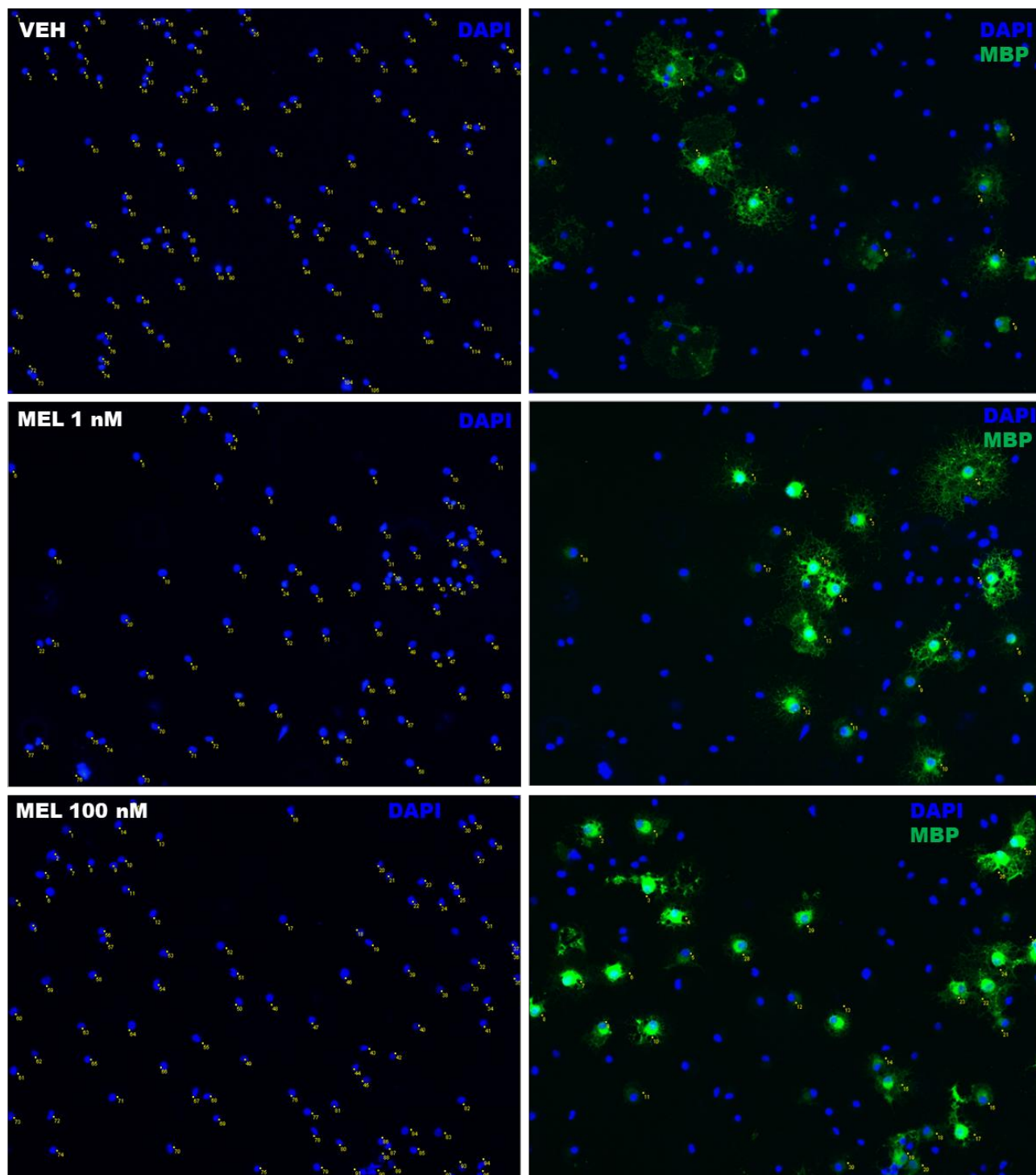
**Figura 2. Determinación del número de células inmunopositivas a MBP para cada tratamiento.** En el panel A se muestra un gráfico de tipo caja y bigote y en el panel B un gráfico de tipo nube de lluvia (raincloud plot) del número de células inmunopositivas a MBP. Ambos gráficos permiten apreciar la dispersión y distribución de los datos.

En las figuras 1 y 2 se muestran gráficos de tipo caja y bigote (panel A) y de tipo nube de lluvia (*raincloud plot*) (panel B), de los datos correspondientes al conteo de núcleos celulares y células positivas a MBP, respectivamente, para los tres tratamientos.

**Tabla 2. Análisis de la varianza (ANOVA) de una vía para los datos correspondientes a los núcleos.**

ANOVA- Núcleos					
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado de la media	F	p
Tratamiento	6192.340	2	3096.170	1.094	0.339
Residuales	260286.544	92	2829.202		

El resultado de este análisis indica que no hay una diferencia significativa en el número de núcleos teñidos con DAPI entre las imágenes provenientes de los distintos tratamientos ( $F(2,92) = 1.09, p = 0.33$ ).



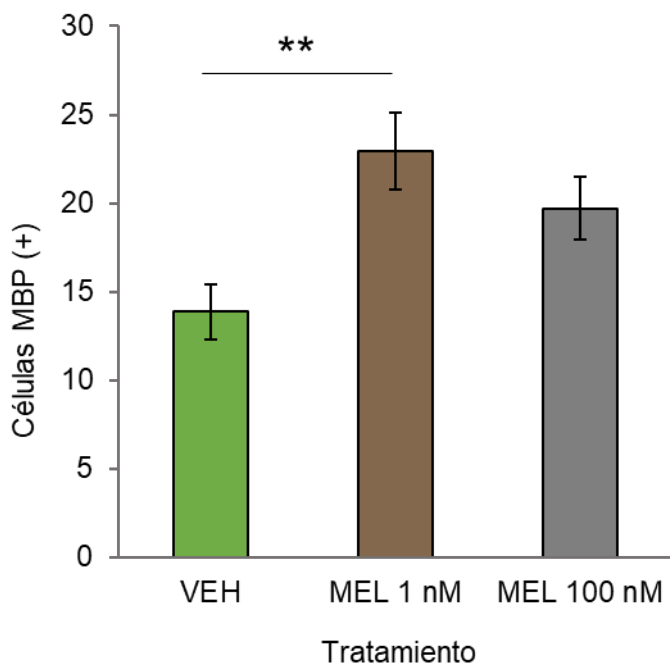
**Figura 3. Cuantificación de núcleos celulares y células inmunopositivas a MBP.** Imágenes representativas de las células precursoras de oligodendrocitos que fueron incubadas con el vehículo (VEH), melatonina 1 nM (MEL 1 nM) o melatonina 100 nM (MEL 100 nM) durante 72 h. Se realizó una tinción nuclear fluorescente con el compuesto DAPI (color azul, imágenes del panel izquierdo) y una detección inmunofluorescente de MBP (color verde; imágenes del panel derecho).

**Tabla 3. Análisis de la varianza (ANOVA) de una vía para los datos correspondientes al número de células inmunopositivas a MBP.**

ANOVA- MBP (+)					
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado de la media	F	p
Tratamiento	1404.616	2	702.308	6.023	0.003*
Residuales	10727.005	92	116.598		

\*p<0.05

Por otra parte, en el ANOVA realizado para el número de células inmunopositivas a MBP se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos ( $F(2,92) = 6.02$ ,  $p = 0.003$ ). Tras verificar el supuesto de homogeneidad de varianzas de los grupos con la prueba de Levene ( $F(2,92) = 2.23$ ,  $p = 0.113$ ), se realizó el análisis *post hoc* mediante la prueba de Tukey, que muestra que sólo hay diferencias significativas entre el grupo VEH y el tratamiento con MEL 1 nM ( $p = 0.002$ ) (Figura 4).



**Figura 4. Efecto de la melatonina sobre el número de células inmunopositivas a MBP.** Las células precursoras de oligodendrocitos fueron incubadas durante 72 h con el vehículo (VEH), melatonina 1 nM (MEL 1 nM) o melatonina 100 nM (MEL 100 nM). La proteína MBP se detectó mediante inmunofluorescencia indirecta. Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar de la media (eem) de los datos obtenidos del análisis de al menos 27 imágenes por tratamiento. ANOVA de una vía, prueba *post hoc* Tukey; \*\*  $p < 0.01$

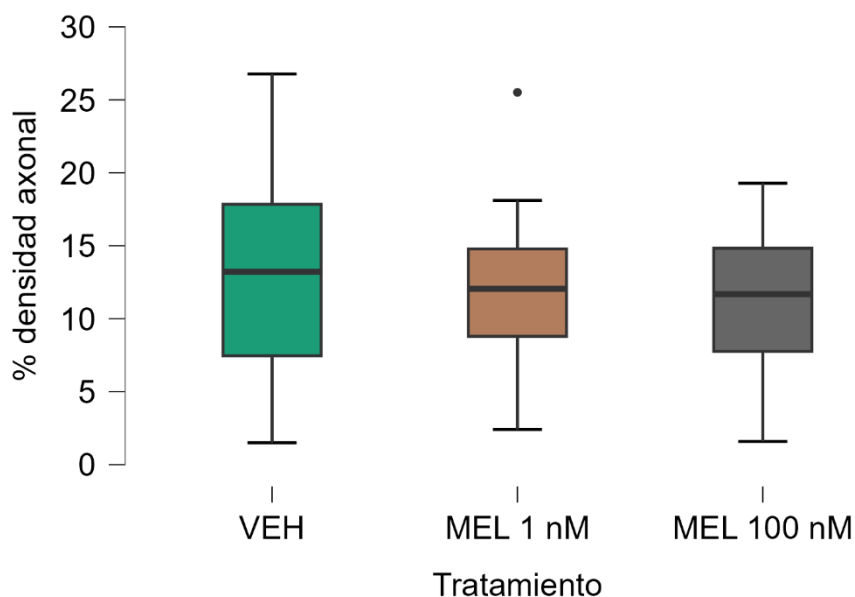
## Efecto de la melatonina sobre la mielinización *in vitro*

Los siguientes resultados corresponden al análisis de 129 imágenes, de las cuales al menos 41 imágenes corresponden a cada grupo experimental, mediante el *plugin* MyelinJ del software ImageJ. Los datos extremos detectados en el primer análisis realizado mediante el software GraphPad Prism fueron eliminados. En la Tabla 4 se muestra la estadística descriptiva obtenida del análisis posterior de los datos mediante el software Jasp.

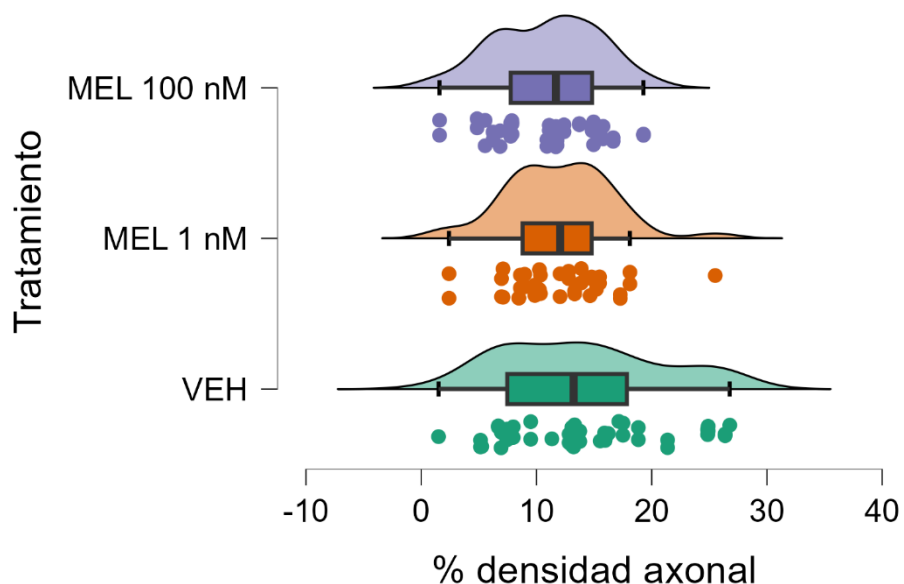
**Tabla 4. Estadística descriptiva correspondiente al porcentaje de densidad axonal y al porcentaje de mielinización obtenidos mediante el *plugin* MyelinJ.**

Tratamiento	% densidad axonal			% mielinización		
	VEH	MEL 1 nM	MEL 100 nM	VEH	MEL 1 nM	MEL 100 nM
n (imágenes)	44	39	39	41	36	36
Datos extremos eliminados	1	2	2	4	5	7
Mediana	13.221	12.048	12.048	5.229	7.695	7.798
Media	13.959	11.962	11.962	6.034	7.263	7.557
Error estándar de la media	1.041	0.720	0.720	0.499	0.322	0.268
Desviación estándar	6.902	4.496	4.496	3.194	1.931	1.606

**A**



**B**



**Figura 5. Evaluación de la densidad axonal en los cocultivos incubados con melatonina.** En el panel A se muestra un gráfico de tipo caja y bigote y en el panel B un gráfico de tipo nube de lluvia (raincloud plot). Ambos gráficos permiten apreciar la dispersión y distribución de los datos correspondientes al porcentaje de densidad axonal evaluado mediante el programa MyelinJ.

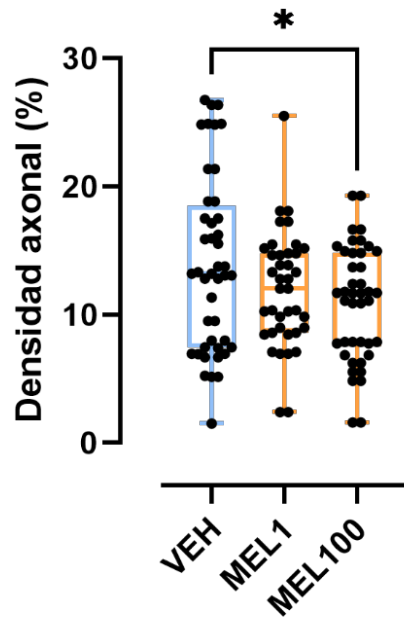
La prueba de homogeneidad de varianzas de Levene aplicada a los datos de la evaluación del porcentaje de densidad axonal en las imágenes de los distintos tratamientos arroja una diferencia significativa ( $F(2,122) = 6.027, p = 0.003$ ), por lo que al realizar el ANOVA de una vía se aplicó la corrección de Brown-Forsythe.

**Tabla 5. Análisis de la varianza (ANOVA) de una vía para los datos correspondientes al porcentaje de densidad axonal evaluado mediante el programa MyelinJ**

ANOVA- % densidad axonal						
Corrección		Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado de la media	F	p
homogeneidad de varianzas	Ninguna	208.976	2.000	104.488	6.023	0.033*
	Residuales	3636.010	122.000	29.803		
Brown-Forsythe	Tratamiento	208.976	2.000	104.488	3.600	0.031*
	Residuales	3636.010	106.808	34.043		

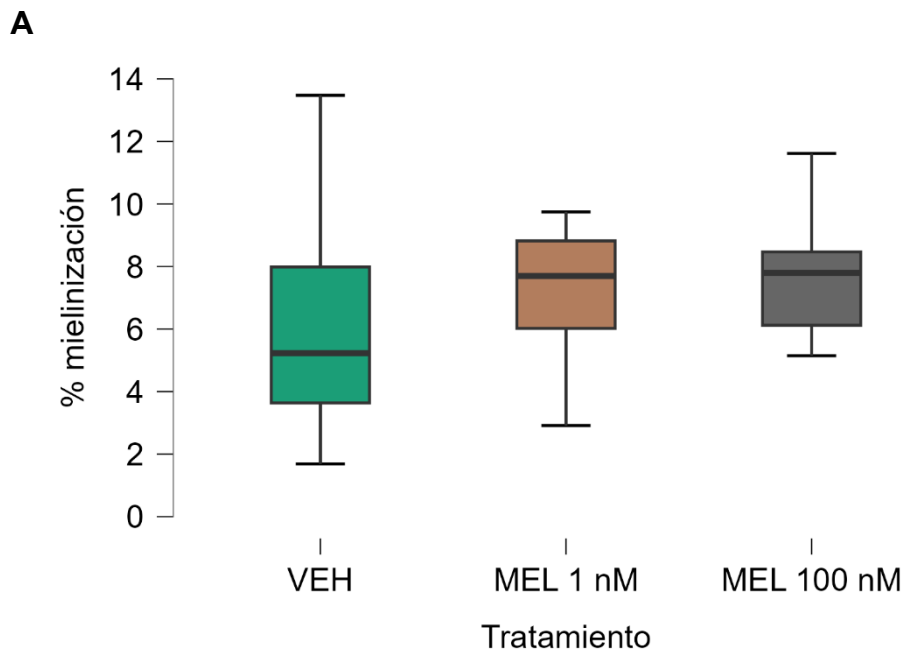
\* $p < 0.05$

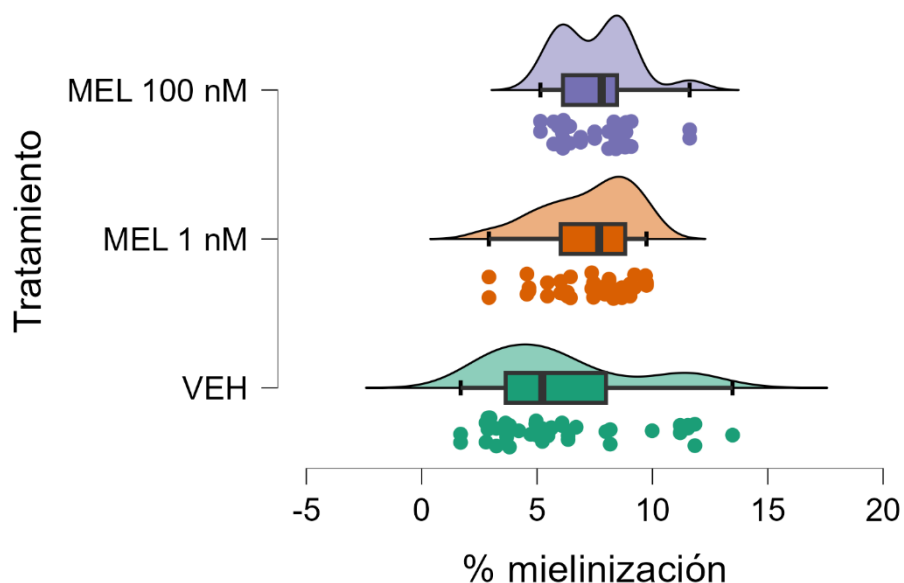
Se realizó la prueba *post hoc* de Tukey, que indica que hay una diferencia significativa entre los tratamientos VEH y MEL 100 nM ( $p=0.028$ ).



**Figura 6. Efecto de la melatonina sobre el porcentaje de densidad axonal.** Los cocultivos fueron incubados durante 13 días con el vehículo (VEH), melatonina 1 nM (MEL1) o melatonina 100 nM (MEL100). Los neurofilamentos se detectaron como marcador axonal mediante inmunofluorescencia indirecta. Se representan los datos obtenidos del análisis de al menos 39 imágenes por tratamiento. ANOVA de una vía, prueba *post hoc* Tukey; \*  $p<0.05$

En cuanto a la evaluación del porcentaje de mielinización en las imágenes analizadas, se obtuvieron los siguientes resultados:



**B**

**Figura 6. Evaluación de la mielinización en los cocultivos incubados con melatonina.** En el panel A se muestra un gráfico de tipo caja y bigote y en el panel B un gráfico de tipo nube de lluvia (raincloud plot). Ambos gráficos permiten apreciar la dispersión y distribución de los datos correspondientes al porcentaje de mielinización evaluado mediante el programa MyelinJ.

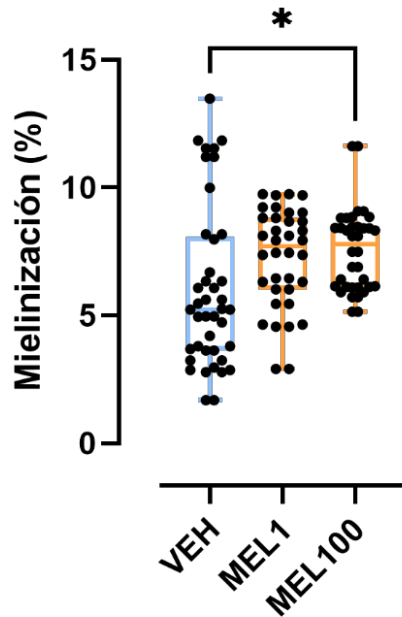
La prueba de homogeneidad de varianzas de Levene aplicada a los datos de la evaluación del porcentaje de mielinización en las imágenes de los distintos tratamientos arroja una diferencia significativa ( $F(2,110) = 8.094, p < 0.001$ ), por lo que al realizar el ANOVA de una vía se aplicó la corrección de Brown-Forsythe.

**Tabla 6. Análisis de la varianza (ANOVA) de una vía para los datos correspondientes al porcentaje de mielinización evaluado mediante el programa MyelinJ.**

ANOVA- % mielinización						
Corrección		Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado de la media	F	p
Ninguna	Tratamiento	50.997	2.000	25.499	4.461	0.014*
	Residuales	628.761	110.000	5.716		
Brown-Forsythe	Tratamiento	50.997	2.000	25.499	4.723	0.011*
	Residuales	628.761	87.745	7.166		

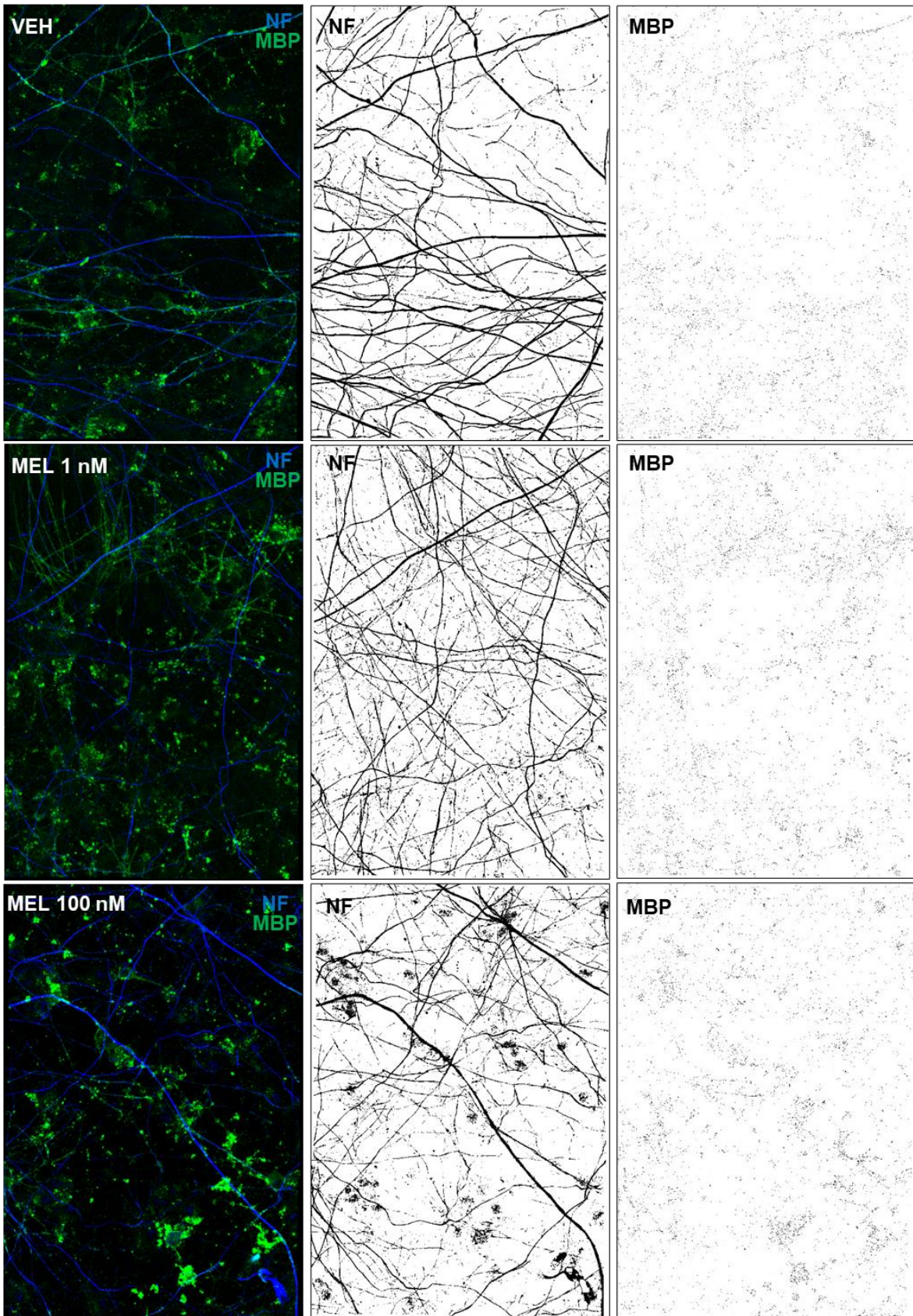
\* $p < 0.05$

Se realizó la prueba *post hoc* de Tukey, que indica que hay una diferencia significativa entre los tratamientos VEH y MEL 100 nM ( $p=0.017$ ).



**Figura 7. Efecto de la melatonina sobre el porcentaje de mielinización.** Los cocultivos fueron incubados durante 13 días con el vehículo (VEH), melatonina 1 nM (MEL1) o melatonina 100 nM (MEL100). La proteína MBP se detectó mediante inmunofluorescencia indirecta. Se representan los datos obtenidos del análisis de al menos 36 imágenes por tratamiento. ANOVA de una vía, prueba *post hoc* Tukey; \*  $p<0.05$

En la figura 7 se muestran imágenes representativas de los cocultivos tratados con el vehículo (VEH) o la melatonina 1 nM (MEL 1nM) y 100 nM (MEL 100 nM). En el panel izquierdo se muestran las imágenes de inmunofluorescencia, en particular, los canales correspondientes a la inmunodetección de los neurofilamentos (NF) como marcadores axonales en color azul y a la inmunodetección de MBP como marcador de mielina en color verde. En el panel central se muestran las imágenes que genera el plugin MyelinJ para el canal azul (NF) y a partir del cual se generan los datos del porcentaje de densidad axonal y en el panel derecho lo correspondiente al canal verde (MBP), a partir del cual se generan los datos del porcentaje de mielinización.



**Figura 7. Imágenes representativas de cada tratamiento aplicado a los cocultivos, analizadas con MyelinJ.** El panel superior corresponde al vehículo (VEH), el panel central al tratamiento con melatonina 1 nM (MEL 1 nM) y el panel inferior al tratamiento con melatonina 100 nM (MEL 100 nM). El panel vertical izquierdo corresponde a la detección por inmunofluorescencia de axones (NF, canal azul), y de proyecciones oligodendrogiales y tractos mielinizados (MBP, canal verde). Análisis del porcentaje de densidad axonal (NF, panel vertical central). Análisis del porcentaje de mielinización (MBP, panel vertical derecho).

## DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó el efecto de la melatonina sobre la oligodendrogénesis y la mielinización *in vitro*. Para la evaluación de la oligodendrogénesis se analizaron imágenes de microscopía de fluorescencia de preparaciones de OPCs aislados de corteza cerebral de rata, que fueron incubados con melatonina en concentraciones fisiológicas de 1 y 100 nM (Tan et al., 2016), o con el vehículo. Los resultados indican que en presencia de melatonina 1 nM, hay un aumento estadísticamente significativo ( $p = 0.002$ ) en el número de células inmunopositivas a MBP con respecto del vehículo. La MBP se considera un marcador de diferenciación oligodendroglial porque se expresa en oligodendrocitos inmaduros y maduros, de acuerdo con la clasificación reportada por Barateiro & Fernandes (2014) ,y no en etapas previas (pre-oligodendrocitos y OPCs). Por lo tanto, los resultados indican que la melatonina, en la concentración presente en circulación (concentración fisiológica (Reiter, 1993)) induce la oligodendrogénesis. Esto es consistente con un estudio previo de nuestro grupo de trabajo en el que se encontró que en OPCs obtenidos del nervio óptico o del hipocampo de la rata, el tratamiento con melatonina 100 nM induce un incremento significativo de la complejidad morfológica y del contenido de tubulina acetilada, ambos indicativos de diferenciación y maduración oligodendroglial (Rodríguez-Cárdenas, 2019 (tesis); manuscrito en elaboración). Los resultados de dicho estudio sugieren que la melatonina puede incidir en la oligodendrogénesis mediante la modulación del citoesqueleto oligodendroglial.

Nuestros resultados son consistentes también con el estudio de Ghareghani et al., (2017) quienes reportaron que en un rango de concentraciones de melatonina de 0.01-10  $\mu$ M, hay

mayor viabilidad y proliferación de células madre neurales, y que en concentraciones de 0.05  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$ , la melatonina incrementa la diferenciación oligodendroglial. En dicho estudio, sin embargo, la concentración más baja que se evalúa es de 10 nM (0.01  $\mu\text{M}$ ) y se encuentra un efecto sobre la proliferación más que sobre la diferenciación oligodendroglial. De manera similar, en el estudio de Sotthibundhu et al., (2010) se observa que la melatonina modula la habilidad proliferativa de precursores neurales de la zona subventricular (la principal área neurogénica del cerebro adulto) en ratones adultos, en una forma dependiente de su concentración. En dicho estudio aplicaron concentraciones de melatonina de 0.001, 0.01, 0.1, 1 y 10  $\mu\text{M}$ , en donde la más efectiva fue 1  $\mu\text{M}$ , sin embargo, el efecto sobre la proliferación sufrió un decremento a una concentración mayor (10  $\mu\text{M}$ ). Además, reportaron la expresión de receptores de melatonina, específicamente  $\text{MT}_1$ , en estas células.

Esto puede deberse a que las células en las que evalúan el efecto son células madre neurales que todavía conservan la multipotencialidad para diferenciarse en neuronas o neuroglia (astrocitos/oligodendrocitos), mientras que en el presente estudio se utilizaron OPCs, ya comprometidos al linaje oligodendroglial (McCarthy & de Vellis, 1980).

De acuerdo con Ramirez-Rodriguez et al., (2011) la melatonina puede modular la organización del citoesqueleto por el efecto que tiene sobre proteínas asociadas con la polimerización de microtúbulos a lo largo de las dendritas en neuronas del hipocampo. En relación con el presente estudio, se observó un incremento de las células inmuno-positivas a MBP, la cual está asociada con el citoesqueleto, ya que induce la polimerización de F-actina y el agrupamiento de MF (Boggs, 2006).

Olivier et al., (2009) describieron el efecto neuroprotector de la melatonina en una lesión de la materia blanca por hipoxia prenatal en el cerebro de rata. De acuerdo con sus resultados, la melatonina promueve la maduración oligodendroglial con una disminución en la activación de la microglía a una concentración de 1  $\mu\text{M}$ , además, reportaron un aumento en la densidad de células MBP positivas en comparación con células que no fueron tratadas, y mencionan que obtuvieron resultados similares en una concentración de 100  $\mu\text{M}$ . También, determinaron que los receptores  $\text{MT}_1$  y  $\text{MT}_2$  son expresados en astrocitos y microglía, y en menor medida en neuronas y oligodendrocitos inmaduros.

En el estudio previo de nuestro grupo de trabajo (Rodríguez-Cárdenas et al. en preparación) se encontró que en una población enriquecida en OPCs A2B5(+) de hipocampo de rata, el

99% de las células expresa los receptores membranales de melatonina MT<sub>1</sub> y MT<sub>2</sub>. Sin embargo, hasta el momento nuestro grupo no ha evaluado si los efectos de la melatonina observados en el estudio previo y el presente están mediados a través de dichos receptores. Al respecto, Biran et al., (2014), sugieren que los efectos neuroprotectores de la melatonina están en gran parte mediados por receptores específicos, más que en sus propiedades antioxidantes intrínsecas, además señalan tres líneas de evidencia que lo sugieren: (1) el antagonista de los receptores de melatonina, luzindol, suprime la neuroprotección inducida por la melatonina, (2) las dosis en las que se observan los efectos neuroprotectores de la melatonina son inferiores a las utilizadas generalmente para obtener un efecto antioxidante significativo, y (3) la melatonina protege contra las lesiones de la materia blanca pero no contra las lesiones de la placa cortical, mientras que la N-acetilcisteína, una molécula antioxidante típica, protege contra ambos.

En este trabajo también se evaluó el efecto de la melatonina sobre la mielinización en un modelo *in vitro*. En el análisis de las imágenes correspondientes a las preparaciones tratadas con melatonina 100 nM, se observó un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de mielinización respecto al vehículo; en este grupo también se observó una disminución en la densidad axonal. Hasta donde sabemos este es el primer estudio en el que se aborda el efecto de la melatonina sobre la mielinización en un modelo de cocultivo. Además, los estudios previos utilizan modelos de daño a la materia blanca y concentraciones farmacológicas de melatonina. En nuestro estudio, las concentraciones de melatonina utilizadas son concentraciones fisiológicas, que pueden encontrarse en la circulación o en el líquido cefalorraquídeo durante la fase de oscuridad del ciclo de iluminación ambiental (Reiter, 1993; Tan et al., 2016). Si bien el proceso de oligodendrogénesis es indispensable para que ocurra la mielinización, en ésta están involucradas diversas señales solubles y de contacto celular entre el axón y los oligodendrocitos (Dermitzakis et al., 2022; Fekete & Nishiyama, 2022). En el SNC, gran parte de estas señales son inhibitorias, por lo que un fármaco que induce la oligodendrogénesis no necesariamente induce también la mielinización. Nuestros resultados indican que la melatonina induce tanto la oligodendrogénesis como la mielinización, en concentraciones fisiológicas.

Las perspectivas de continuación de este trabajo incluyen evaluar el efecto de la melatonina en un nivel mayor de complejidad, en modelos *ex vivo* de cultivos cerebrales organotípicos y comenzar a dilucidar el mecanismo de acción que subyace a los efectos de la melatonina,

es decir, si dichos efectos están mediados por sus receptores de membrana y qué vías de señalización intracelular están involucradas.

## CONCLUSIONES

La melatonina induce la oligodendrogénesis y la mielinización en modelos *in vitro*. La influencia sobre la fisiología oligodendroglial, se suma a los efectos ya reportados de la melatonina como un modulador clave de los procesos involucrados en el desarrollo y la plasticidad del sistema nervioso central.

## REFERENCIAS

- Abo Taleb, H. A., & Alghamdi, B. S. (2020). Neuroprotective Effects of Melatonin during Demyelination and Remyelination Stages in a Mouse Model of Multiple Sclerosis. *Journal of Molecular Neuroscience*, 70(3), 386–402. <https://doi.org/10.1007/s12031-019-01425-6>
- Akhmanova, A., & Hoogenraad, C. C. (2005). Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(1), 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2004.11.001>
- 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 (BBA) - Molecular Cell Research*, 1843(9), 1917–1929. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.04.018>
- Bates, I. R., Boggs, J. M., Feix, J. B., & Harauz, G. (2003). Membrane-anchoring and Charge Effects in the Interaction of Myelin Basic Protein with Lipid Bilayers Studied by Site-directed Spin Labeling. *Journal of Biological Chemistry*, 278(31), 29041–29047. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302766200>

- Bauer, N. G., Richter-Landsberg, C., & Ffrench-Constant, C. (2009). Role of the oligodendroglial cytoskeleton in differentiation and myelination. *Glia*, *57*(16), 1691–1705. <https://doi.org/10.1002/glia.20885>
- Benitez-King, G. (2006). Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *Journal of Pineal Research*, *40*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2005.00282.x>
- Bergles, D. E., & Richardson, W. D. (2016). Oligodendrocyte Development and Plasticity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *8*(2), a020453. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020453>
- Biran, V., Phan Duy, A., Decobert, F., Bednarek, N., Alberti, C., & Baud, O. (2014). Is melatonin ready to be used in preterm infants as a neuroprotectant? *Developmental Medicine & Child Neurology*, *56*(8), 717–723. <https://doi.org/10.1111/dmcn.12415>
- Black, M., Slaughter, T., & Fischer, I. (1994). Microtubule-associated protein 1b (MAP1b) is concentrated in the distal region of growing axons. *The Journal of Neuroscience*, *14*(2), 857–870. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-02-00857.1994>
- Boggs, J. M. (2006). Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *63*(17), 1945–1961. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6094-7>
- Brinkmann, B. G., Agarwal, A., Sereda, M. W., Garratt, A. N., Müller, T., Wende, H., Stassart, R. M., Nawaz, S., Humml, C., Velanac, V., Radyushkin, K., Goebbels, S., Fischer, T. M., Franklin, R. J., Lai, C., Ehrenreich, H., Birchmeier, C., Schwab, M. H., & Nave, K. A. (2008). Neuregulin-1/ErbB Signaling Serves Distinct Functions in Myelination of the Peripheral and Central Nervous System. *Neuron*, *59*(4), 581–595. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.06.028>
- Brockschneider, D. (2006). Ermin, A Myelinating Oligodendrocyte-Specific Protein That Regulates Cell Morphology. *Journal of Neuroscience*, *26*(3), 757–762. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4317-05.2006>
- de Faria, O., Pivonkova, H., Varga, B., Timmler, S., Evans, K. A., & Káradóttir, R. T. (2021). Periods of synchronized myelin changes shape brain function and plasticity. *Nature Neuroscience*, *24*(11), 1508–1521. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00917-2>

- Dermitzakis, I., Manthou, M. E., Meditskou, S., Miliaras, D., Kesidou, E., Boziki, M., Petratos, S., Grigoriadis, N., & Theotokis, P. (2022). Developmental Cues and Molecular Drivers in Myelinogenesis: Revisiting Early Life to Re-Evaluate the Integrity of CNS Myelin. *Current Issues in Molecular Biology*, 44(7), 3208–3237. <https://doi.org/10.3390/cimb44070222>
- Fekete, C. D., & Nishiyama, A. (2022). Presentation and integration of multiple signals that modulate oligodendrocyte lineage progression and myelination. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 16. <https://doi.org/10.3389/fncel.2022.1041853>
- Fields, R. D. (2005). Myelination: An Overlooked Mechanism of Synaptic Plasticity? *The Neuroscientist*, 11(6), 528–531. <https://doi.org/10.1177/1073858405282304>
- Fields, R. D. (2008). White matter in learning, cognition and psychiatric disorders. *Trends in Neurosciences*, 31(7), 361–370. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.04.001>
- Ghareghani, M., Sadeghi, H., Zibara, K., Danaei, N., Azari, H., & Ghanbari, A. (2017). Melatonin Increases Oligodendrocyte Differentiation in Cultured Neural Stem Cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 37(7), 1319–1324. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0450-4>
- González, J., & Toro, J. (2007). The neuroglia in the immune response of the nervous central system. *Acta Neurol Colomb*, 23, 25–30.
- Guerrero, J., Carrillo-Vico, A., & Lardone, P. (2007). La melatonina. *Investigación y Ciencia*, 373, 30–38.
- Gunata, M., Parlakpınar, H., & Acet, H. A. (2020). Melatonin: A review of its potential functions and effects on neurological diseases. *Revue Neurologique*, 176(3), 148–165. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2019.07.025>
- Jiang, S., Avraham, H. K., Park, S.-Y., Kim, T.-A., Bu, X., Seng, S., & Avraham, S. (2005). Process elongation of oligodendrocytes is promoted by the Kelch-related actin-binding protein Mayven. *Journal of Neurochemistry*, 92(5), 1191–1203. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02946.x>
- Jiang, S., Seng, S., Avraham, H. K., Fu, Y., & Avraham, S. (2007). Process Elongation of Oligodendrocytes Is Promoted by the Kelch-related Protein MRP2/KLHL1. *Journal of Biological Chemistry*, 282(16), 12319–12329. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701019200>

- Kaur, C., Sivakumar, V., & Ling, E. A. (2010). Melatonin protects periventricular white matter from damage due to hypoxia. *Journal of Pineal Research*, 48(3), 185–193. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2009.00740.x>
- Lee, J., Gravel, M., Zhang, R., Thibault, P., & Braun, P. E. (2005). Process outgrowth in oligodendrocytes is mediated by CNP, a novel microtubule assembly myelin protein. *Journal of Cell Biology*, 170(4), 661–673. <https://doi.org/10.1083/jcb.200411047>
- Li, W., Zhang, B., Tang, J., Cao, Q., Wu, Y., Wu, C., Guo, J., Ling, E.-A., & Liang, F. (2007). Sirtuin 2, a Mammalian Homolog of Yeast Silent Information Regulator-2 Longevity Regulator, Is an Oligodendroglial Protein That Decelerates Cell Differentiation through Deacetylating  $\alpha$ -Tubulin. *Journal of Neuroscience*, 27(10), 2606–2616. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4181-06.2007>
- Lunn, K. F., Baas, P. W., & Duncan, I. D. (1997). Microtubule Organization and Stability in the Oligodendrocyte. *The Journal of Neuroscience*, 17(13), 4921–4932. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-13-04921.1997>
- McCarthy, K. D., & de Vellis, J. (1980). Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *Journal of Cell Biology*, 85(3), 890–902. <https://doi.org/10.1083/jcb.85.3.890>
- Miller, S. L., Yawno, T., Alers, N. O., Castillo-Melendez, M., Supramaniam, V. G., VanZyl, N., Sabaretnam, T., Loose, J. M., Drummond, G. R., Walker, D. W., Jenkin, G., & Wallace, E. M. (2014). Antenatal antioxidant treatment with melatonin to decrease newborn neurodevelopmental deficits and brain injury caused by fetal growth restriction. *Journal of Pineal Research*, 56(3), 283–294. <https://doi.org/10.1111/jpi.12121>
- Olivier, P., Fontaine, R. H., Loron, G., Van Steenwinckel, J., Biran, V., Massonneau, V., Kaindl, A., Dalous, J., Charriaut-Marlangue, C., Aigrot, M.-S., Pansiot, J., Verney, C., Gressens, P., & Baud, O. (2009). Melatonin Promotes Oligodendroglial Maturation of Injured White Matter in Neonatal Rats. *PLoS ONE*, 4(9), e7128. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007128>
- Pang, Y., Zheng, B., Kimberly, S. L., Cai, Z., Rhodes, P. G., & Lin, R. C. S. (2012). Neuron-oligodendrocyte myelination co-culture derived from embryonic rat spinal cord and cerebral cortex. *Brain and Behavior*, 2(1), 53–67. <https://doi.org/10.1002/brb3.33>

- Pham-Dinh, D., Mattei, M. G., Nussbaum, J. L., Roussel, G., Pontarotti, P., Roeckel, N., Mather, I. H., Artzt, K., Lindahl, K. F., & Dautigny, A. (1993). Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a member of a subset of the immunoglobulin superfamily encoded within the major histocompatibility complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(17), 7990–7994. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.17.7990>
- Qualmann, B., & Kessels, M. M. (2008). Actin Nucleation: Putting the Brakes on Arp2/3. *Current Biology*, *18*(10), R420–R423. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.04.014>
- Ramirez-Rodriguez, G., Ortíz-López, L., Domínguez-Alonso, A., Benítez-King, G. A., & Kempermann, G. (2011). Chronic treatment with melatonin stimulates dendrite maturation and complexity in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Journal of Pineal Research*, *50*(1), 29–37. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00802.x>
- Reindl, M., & Waters, P. (2019). Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies in neurological disease. *Nature Reviews Neurology*, *15*(2), 89–102. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0112-x>
- Reiter, R. (1993). The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*, *49*(8), 654–664.
- Rela, L. (2016). Células gliales¿ Servidoras de las neuronas o compañeras de equipo? *Ciencia Hoy*, *26*, 37–42.
- Ross, M., & Pawlina, W. (2015). Tejido Nervioso. In Médica Panamericana (Ed.), *Histología: Texto y Atlas* (7th ed., pp. 385–436). Wolters Kluwer.
- Rumsby, M., Afsari, F., Stark, M., & Hughson, E. (2003). Microfilament and microtubule organization and dynamics in process extension by central glia-4 oligodendrocytes: Evidence for a microtubule organizing center. *Glia*, *42*(2), 118–129. <https://doi.org/10.1002/glia.10211>
- Saab, A. S., & Nave, K.-A. (2017). Myelin dynamics: protecting and shaping neuronal functions. *Current Opinion in Neurobiology*, *47*, 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.09.013>
- Schachner, M., & Bartsch, U. (2000). Multiple functions of the myelin-associated glycoprotein MAG (siglec-4a) in formation and maintenance of myelin. *Glia*, *29*(2), 154–

165. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(20000115\)29:2<154::AID-GLIA9>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(20000115)29:2<154::AID-GLIA9>3.0.CO;2-3)

Simpson, P. B., & Armstrong, R. C. (1999). Intracellular signals and cytoskeletal elements involved in oligodendrocyte progenitor migration. *Glia*, 26(1), 22–35. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199903\)26:1<22::AID-GLIA3>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199903)26:1<22::AID-GLIA3>3.0.CO;2-M)

Song, J., Goetz, B. D., Baas, P. W., & Duncan, I. D. (2001). Cytoskeletal Reorganization during the Formation of Oligodendrocyte Processes and Branches. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 17(4), 624–636. <https://doi.org/10.1006/mcne.2001.0974>

Sothibundhu, A., Phansuwan-Pujito, P., & Govitrapong, P. (2010). Melatonin increases proliferation of cultured neural stem cells obtained from adult mouse subventricular zone. *Journal of Pineal Research*, 49(3), 291–300. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00794.x>

Tan, D.-X., Manchester, L. C., & Reiter, R. J. (2016). CSF generation by pineal gland results in a robust melatonin circadian rhythm in the third ventricle as an unique light/dark signal. *Medical Hypotheses*, 86, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2015.11.018>

Terada, N., Kidd, G. J., Kinter, M., Bjartmar, C., Moran-Jones, K., & Trapp, B. D. (2005).  $\beta$ -tubulin is selectively expressed by oligodendrocytes in the central nervous system. *Glia*, 50(3), 212–222. <https://doi.org/10.1002/glia.20175>

Tomassy, G. S., Dershowitz, L. B., & Arlotta, P. (2016). Diversity Matters: A Revised Guide to Myelination. *Trends in Cell Biology*, 26(2), 135–147. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.09.002>

Valdés-Tovar, M., Estrada-Reyes, R., Solís-Chagoyán, H., Argueta, J., Dorantes-Barrón, A. M., Quero-Chávez, D., Cruz-Garduño, R., Cercós, M. G., Trueta, C., Oikawa-Sala, J., Dubocovich, M. L., & Benítez-King, G. (2018). Circadian modulation of neuroplasticity by melatonin: a target in the treatment of depression. *British Journal of Pharmacology*, 175(16), 3200–3208. <https://doi.org/10.1111/bph.14197>

Valdés-Tovar, M., Rodríguez-Ramírez, A. M., Rodríguez-Cárdenas, L., Sotelo-Ramírez, C. E., Camarena, B., Sanabrais-Jiménez, M. A., Solís-Chagoyán, H., Argueta, J., & López-Riquelme, G. O. (2022). Insights into myelin dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder. *World Journal of Psychiatry*, 12(2), 264–285. <https://doi.org/10.5498/wjp.v12.i2.264>

- Villapol, S., Fau, S., Renolleau, S., Biran, V., Charriaut-Marlangue, C., & Baud, O. (2011). Melatonin Promotes Myelination by Decreasing White Matter Inflammation After Neonatal Stroke. *Pediatric Research*, 69(1), 51–55. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181fcb40b>
- Vouyiouklis, D. A., & Brophy, P. J. (1995). Microtubule-associated proteins in developing oligodendrocytes: Transient expression of a MAP2c isoform in oligodendrocyte precursors. *Journal of Neuroscience Research*, 42(6), 803–817. <https://doi.org/10.1002/jnr.490420609>
- Whitehead, M. J., McCanney, G. A., Willison, H. J., & Barnett, S. C. (2019). MyelinJ: an ImageJ macro for high throughput analysis of myelinating cultures. *Bioinformatics*, 35(21), 4528–4530. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz403>

