



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIOLOGÍA**

**Efecto de dos inhibidores de fosfodiesterasas,
Sildenafil y BAY 73-6691, en la expresión de
mielina en células oligodendrogliales**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MUÑOZ ESQUIVEL JONATHAN

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. KLINTSY JULIETA TORRES HERNÁNDEZ

ASESORA INTERNA:

DRA. LETICIA MORALES LEDESMA



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX. 2016



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

Efecto de dos inhibidores de fosfodiesterasa, Sildenafil y BAY
73-6691, en la expresión de mielina en células
oligodendrogiales

TESIS PRESENTADA POR: MUÑOZ ESQUIVEL JONATHAN

DIRECTORA DE TESIS: DRA. KLINTSY JULIETA TORRES HERNÁNDEZ

ASESORA INTERNA: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA

INVESTIGACIÓN REALIZADA EN EL LABORATORIO DE NEUROINMUNOENDOCRINOLOGIA
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y NEUROCIRUGÍA "MANUEL VELASCO SUÁREZ"

AGRADECIMIENTOS

Quiero dirigir mi agradecimiento a quienes han hecho posible la realización de este proyecto.

Dra. Klinty Julieta Torres Hernández

Por ofrecerme la oportunidad de incorporarme a su estudio, por sus enseñanzas y consejos. Quien me oriento en mi formación en el ámbito profesional.

Dra. Lucinda Aguirre Cruz

Por brindarme la oportunidad de incorporarme a su equipo de trabajo en el laboratorio de neuroinmunoendocrinología en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez".

Dra. Leticia Morales Ledesma

Por aceptar ser mi tutora interna y por sus valiosas sugerencias para enriquecer este trabajo.

M. en C. Catalina Machuca Rodríguez

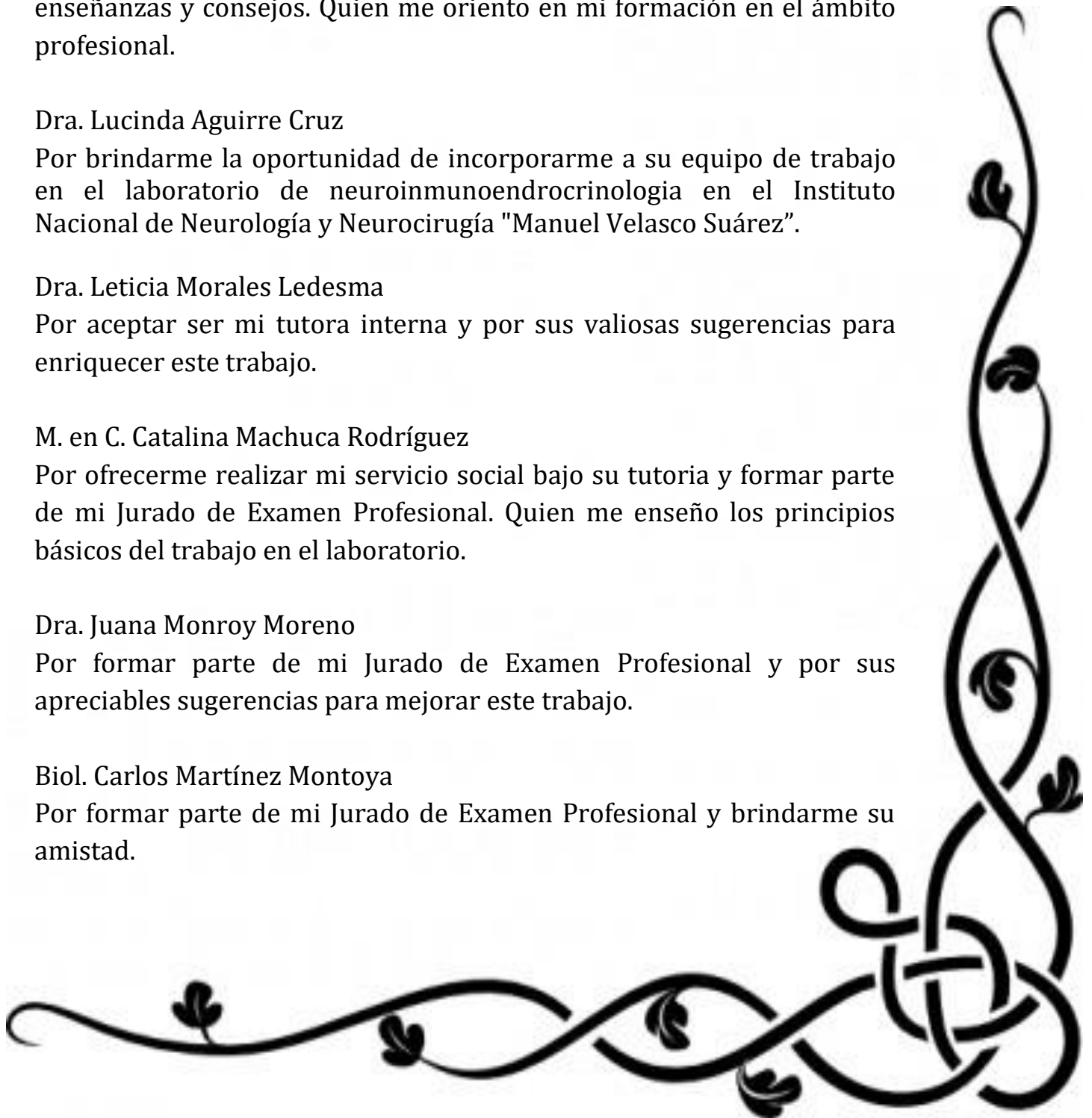
Por ofrecerme realizar mi servicio social bajo su tutoría y formar parte de mi Jurado de Examen Profesional. Quien me enseñó los principios básicos del trabajo en el laboratorio.

Dra. Juana Monroy Moreno

Por formar parte de mi Jurado de Examen Profesional y por sus apreciables sugerencias para mejorar este trabajo.

Biol. Carlos Martínez Montoya

Por formar parte de mi Jurado de Examen Profesional y brindarme su amistad.





DEDICATORIAS

A mis padres

Por su apoyo incondicional para concluir mis estudios.





CONTENIDO

1	RESUMEN	1
2	MARCO TEÓRICO	2
2.1	Sistema Nervioso	2
2.2	Las neuronas.....	5
2.3	Células Gliales.....	9
2.4	Oligodendrocitos.....	11
2.4.1	Mielina.....	24
2.5	Esclerosis Múltiple	32
2.5.1	Tratamientos en la Esclerosis Múltiple.	36
2.6	Enzimas Fosfodiesterasas.....	37
2.7	Inhibidores de Fosfodiesterasas.....	44
2.7.1	Sildenafil.....	44
2.7.2	BAY 73-6691.....	45
2.8	Validación de PCR en tiempo real.	46
2.8.1	Transcripción reversa	46
2.8.2	RNA como material de inicio.....	47
2.8.3	Un paso vs dos pasos de RT-PCR tiempo real.....	47
2.8.4	La elección de ARN total vs. ARNm	48
2.8.5	Los cebadores para la transcripción inversa	49
2.8.6	Las enzimas de la transcriptasa reversa	50
2.8.7	Actividad del inhibidor de RNAasa sobre la transcriptasa inversa.....	50
2.8.8	Diseño Primer	51
2.8.9	Controles para RT-PCR tiempo real	52
2.8.10	Reacción en cadena de la polimerasa	53
2.8.11	Eficiencia de PCR cuantitativa	56
2.8.12	Rango dinámico lineal.	57
2.8.13	Normalización.....	57
2.8.14	Curvas de validación	58
3	JUSTIFICACIÓN	62
4	HIPÓTESIS	63
5	OBJETIVOS	64
5.1	Objetivo General.....	64
5.2	Objetivos Particulares	64
6	MATERIAL Y MÉTODOS	65
6.1	Metodo de obtención y purificación de células precursoras oligodendrogiales.....	65
6.2	Tratamiento con inhibidores de fosfodiesterasas.	66
6.2.1	BAY 73-6691.....	66
6.2.2	Sildenafil.....	66
6.3	Metodo de extracción y purificación de RNA	66
6.4	Metodo de síntesis de cDNA por PCR-Transcripción Reversa.	67
6.5	Curva de validación de la expresión de genes de mielina.	68
6.6	Metodo de cuantificación relativa de genes por PCR-Tiempo Real.....	69
6.7	Metodo para ensayos inmunofluorecencia indirecta.	70
6.8	Análisis Estadístico	71



7	RESULTADOS	72
7.1	Validación de la técnica de cuantificación de genes de mielina por PCR-Tiempo Real	72
7.1.1	Validación de la reacción para cuantificar al gen GAPDH	73
7.1.2	Validación la reacción para cuantificar al gen CNPasa	74
7.1.3	Validación la reacción para cuantificar al gen MBP	75
7.1.4	Validación la reacción para cuantificar al gen MOG	76
7.2	Efecto de BAY 73-6691 sobre la expresión de genes y proteínas de mielina	77
7.2.1	Efecto de BAY 73-6691 en la expresión del gen de mielina CNPasa	78
7.2.2	Efecto de BAY 73-6691 en la expresión del gen de mielina MBP	79
7.2.3	Efecto de BAY 73-6691 en la expresión del gen de mielina MOG	80
7.2.4	Efecto de BAY 73-6691 en la expresión de gen regulador Hes1	81
7.2.5	Efecto de BAY 73-6691 en la expresión de gen regulador Hes5	82
7.2.6	Efecto de BAY 73-6691 en la expresión de gen regulador Rock2	83
7.2.7	Efecto de BAY 73-6691 en la expresión de gen regulador Id2	84
7.2.8	Efecto de BAY 73-6691 en la expresión de gen regulador Id4	85
7.2.9	Efecto de BAY 73-6691 en la expresión de proteína de mielina CNPasa	86
7.2.10	Efecto de BAY 73-6691 en la expresión de proteína de mielina MBP	87
7.3	Efecto de sildenafil sobre la expresión de genes y proteínas de mielina	88
7.3.1	Efecto del citrato de sildenafil en la expresión del gen de mielina CNPasa	89
7.3.2	Efecto del citrato de sildenafil en la expresión del gen de mielina MBP	90
7.3.3	Efecto del citrato de sildenafil en la expresión del gen de mielina MOG	91
7.3.4	Efecto del citrato de sildenafil en la expresión del gen regulador Hes1	92
7.3.5	Efecto del citrato de sildenafil en la expresión del gen regulador Hes5	93
7.3.6	Efecto del citrato de sildenafil en la expresión del gen regulador Rock2	94
7.3.7	Efecto del citrato de sildenafil en la expresión del gen regulador Id2	95
7.3.8	Efecto del citrato de sildenafil en la expresión del gen regulador Id4	96
7.3.9	Efecto del citrato de sildenafil en la expresión de proteína de mielina CNPasa	97
7.3.10	Efecto del citrato de sildenafil en la expresión de proteína de mielina MBP	98
8	DISCUSIÓN	99
9	CONCLUSIONES	102
10	PERSPECTIVAS	103
11	INDICE DE FIGURAS	104
12	INDICE DE TABLAS	107
13	REFERENCIAS	108



1 RESUMEN

Introducción: La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune, crónica y progresiva del sistema nervioso central que cursa con la aparición de lesiones inflamatorias, cuya principal característica es la pérdida de mielina. Las personas con EM sufren la pérdida de las funciones nerviosas, causando discapacidad y dependencia familiar progresiva. Algunos inhibidores de fosfodiesterasas actúan como agentes anti-inflamatorios en modelos experimentales de encefalomiелitis autoinmune experimental, reduciendo la progresión de la enfermedad, aunque se desconoce su efecto sobre la reparación de la mielina. **Objetivo:** Analizar si los inhibidores de enzimas fosfodiesterasas BAY 73-6691 y Sildenafil promueven la síntesis de mielina en células oligodendrogiales de rata. **Métodos:** A partir de ratas neonatas obtuvimos un cultivo primario de células precursoras de oligodendrocitos, las cuales fueron tratadas con BAY 73-6691 y Sildenafil. Evaluamos el efecto de BAY 73-6691 y Sildenafil sobre la expresión de genes de mielina y de genes reguladores por PCR en tiempo real, así como la expresión de proteínas de mielina por inmunofluorescencia indirecta. **Resultados:** BAY 73-6691 y Sildenafil inhibieron la expresión de genes de mielina, además de la expresión de proteínas de mielina. Sin embargo, el efecto inhibitorio de BAY 73-6691 es transitorio, posiblemente por la supresión de genes reguladores negativos. **Conclusión:** Identificamos dos fármacos inhibidores de fosfodiesterasas, BAY 73-6691 y Sildenafil, que inhiben la síntesis de mielina.

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Sistema Nervioso

El sistema nervioso (SN) es un conjunto de estructuras especializadas (encéfalo, médula espinal y nervios) que tienen como función controlar y regular el funcionamiento de los órganos y sistemas; así como, la relación del organismo con el medio externo con la que elabora diferentes respuestas biológicas [1,2,3]. El sistema nervioso se divide en dos grandes subsistemas en sistema nervioso periférico (SNP) y en sistema nervioso central (SNC). El SNP se compone de nervios que conectan el encéfalo y la médula espinal con estructuras periféricas. Estos nervios inervan el músculo (esquelético, cardíaco, liso), epitelios glandulares y contienen una gran variedad de fibras sensitivas. El SNC, constituido por siete partes básicas:

1. **Médula espinal**, se aloja en el interior del conducto vertebral y continúa rostralmente con el bulbo raquídeo del encéfalo. La médula espinal ocupa los dos tercios superiores del conducto vertebral y presenta 31 pares de nervios espinales (8 cervicales, 12 torácicos, 5 lumbares, 5 sacros y 1 coccígeo) unidos a través de las raíces anteriores y posteriores de los nervios espinales. La medula espinal es el principal enlace entre el SNP y el encéfalo, transmite la información sensitiva procedente de las paredes del tronco, de las extremidades, de las vísceras y distribuye impulsos motores a dichas áreas. Los impulsos entran y salen de la médula espinal a través de 31 pares de nervios raquídeos.
2. **Médula oblonga o bulbo raquídeo**, está constituido por neuronas que desarrollan funciones propias del bulbo (transmisión de impulsos de la medula espinal al encéfalo) y por tractos ascendentes (generalmente sensitivos) y descendentes (generalmente motores) que pasan a través del bulbo en su trayecto desde o hacia la médula espinal.



3. **Protuberancia**, al igual que el bulbo raquídeo, la protuberancia contiene muchas somas neuronales, algunos de los cuales se organizan en núcleos de los nervios craneales, y está atravesado por vías ascendentes y descendentes.
4. **Cerebelo**, está formado por dos hemisferios, los hemisferios están profundamente surcados y están unidos por el vermis. El cerebelo está conectado con diversas regiones del SNC y se considera parte del sistema motor, coordina la actividad de grupos musculares individuales para producir movimientos voluntarios finos y sinérgicos.
5. **Mesencéfalo**, conecta el diencefalo con el rombencéfalo. Los centros mesencefálicos participan en las vías visuales y auditivas reflejas, en la función motora, en la transmisión del dolor y en funciones viscerales.
6. **Diencefalo**, los componentes más grandes del diencefalo son el tálamo y el hipotálamo. Por el tálamo, con excepción de la olfacción, toda la información sensitiva que termina alcanzando el córtex cerebral debe pasar por él. Por tanto, una de sus funciones es recibir información sensitiva de diferentes tipos y distribuirla hacia aquellas regiones específicas del córtex cerebral especializadas en su decodificación. El hipotálamo participa en la conducta sexual, en la alimentación, en la secreción de los factores de liberación que actúan en la hipófisis, en la regulación de la temperatura corporal y en una amplia variedad de funciones vegetativas. A través de sus conexiones descendentes, el hipotálamo actúa sobre los centros vegetativos del tronco del encéfalo y de la médula espinal.
7. **Hemisferios cerebrales**, corresponden a las porciones de mayor tamaño y más visibles del encéfalo humano. Cada hemisferio consta de tres subdivisiones principales. En primer lugar, el córtex cerebral, una capa de somas neuronales de unos 0,5 cm de espesor que cubre toda la superficie del hemisferio. Esta capa de células se repliega formando elevaciones

denominadas circunvoluciones o giros, separadas por pliegues denominados surcos. El segundo componente importante del hemisferio es la sustancia blanca subcortical, compuesta por los axones mielinizados que conducen la información de entrada o de salida del córtex cerebral. El tercer componente fundamental del hemisferio es un grupo destacado de somas neuronales denominado colectivamente núcleos o ganglios basales. Estos importantes centros del prosencéfalo están implicados en funciones motoras (Fig. 1). La médula, la protuberancia y el mesencéfalo se denominan colectivamente como el tronco cerebral, los hemisferios cerebrales y el diencefalo se denominan como el cerebro anterior. Debido a su localización en el interior del cráneo y espina dorsal, estas estructuras son las más protegidas del cuerpo [4,5,6].

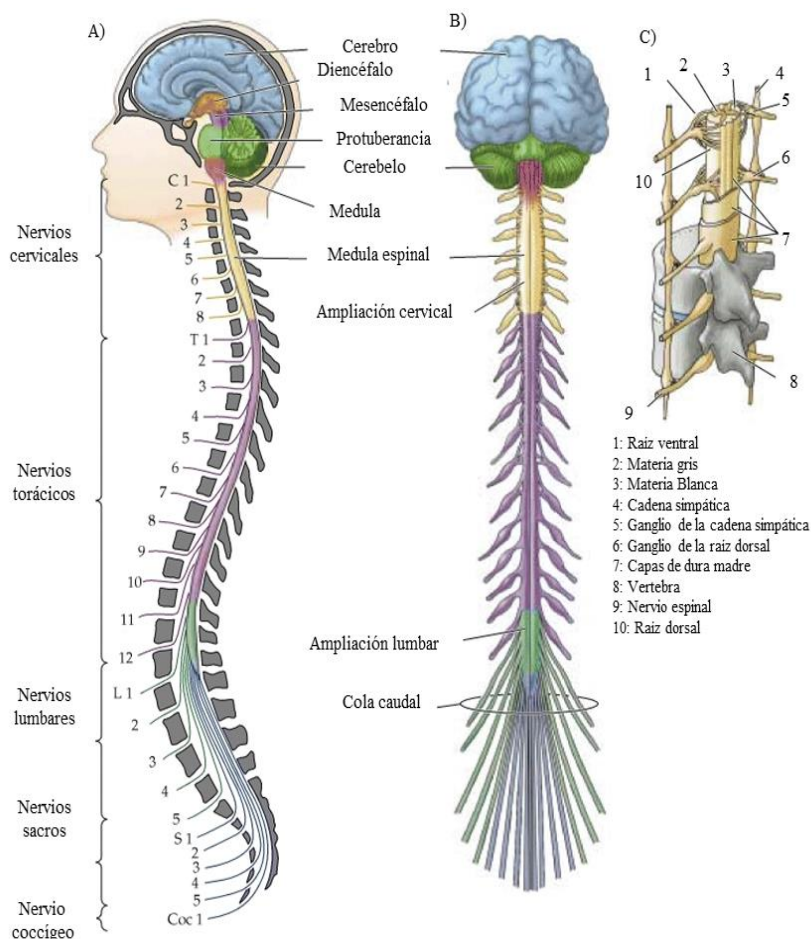


Figura 1. Las subdivisiones y los componentes del sistema nervioso central.

(A) Vista lateral que indica los siete componentes principales del sistema nervioso central. (B) Vista ventral que indica la aparición de los nervios segmentarios y las ampliaciones cervical y lumbar. (C) Diagrama de varios segmentos de la médula espinal, que muestra la relación de la médula espinal con el canal óseo en el que se encuentra [4].



2.2 Las neuronas

El SN está constituido por un único tipo de tejido, el tejido nervioso y éste presenta a su vez dos tipos celulares, las neuronas y las células gliales. Las neuronas, como elementos celulares estructurales y funcionales del SN, son las células excitables cuya función es captar y transmitir los impulsos nerviosos o comunicarse químicamente mediante sinapsis e influir en otras neuronas o tejidos efectores. Una neurona típica puede identificarse morfológicamente en 4 regiones: a) el cuerpo celular, también llamado soma o pericarion; b) las dendritas; c) el axón; y d) las terminales axónicas o sinápticas (Fig. 2). El soma constituye el centro funcional y metabólico de la neurona, contiene organelos como el núcleo, aglomeraciones de retículo endoplásmico rugoso denominadas cuerpos de Nissl, así como complejos de Golgi, ribosomas libres, mitocondrias y el retículo endoplásmico liso. En conjunto, los somas constituyen la sustancia gris del SNC, y los grupos de somas neuronales que tienden a compartir funciones específicas en el SNC se denominan núcleos. Las dendritas son prolongaciones que se ramifican cerca del cuerpo celular cuya función es ser la zona receptora principal de la neurona, mientras que otra prolongación llamada axón, única y más larga, conduce los impulsos a destinos más alejados. La sustancia blanca del SNC está formada por haces de axones envueltos en una vaina aislante de lipoproteína denominada mielina [5,6,7]. El axón finaliza con estructuras especializadas llamadas terminales axónicas o sinapsis o, en caso de inervar músculos, placas motoras terminales (unión neuromuscular) que funciona de manera similar a la sinapsis [5].

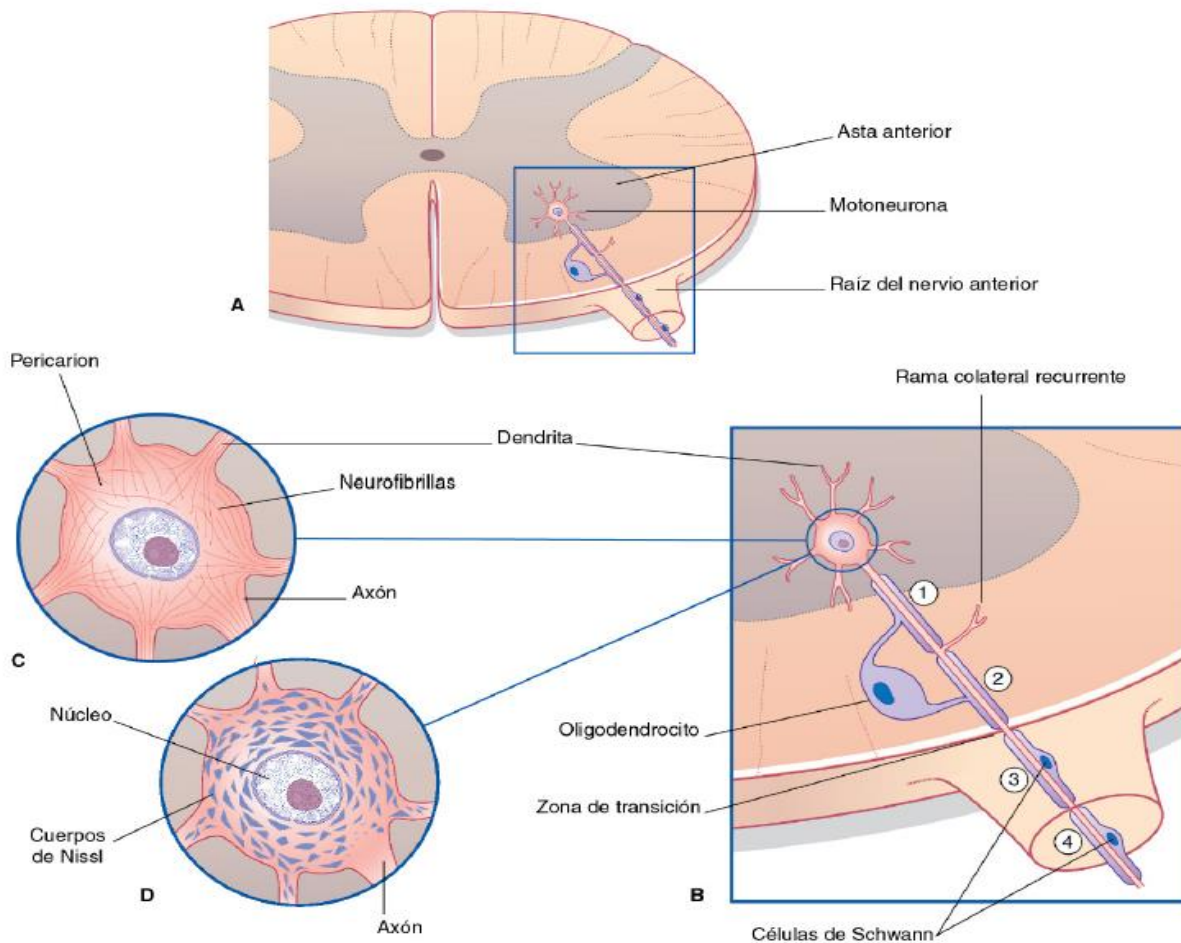


Figura 2. Esquema de motoneurona en el asta anterior de la médula espinal.

(A) Esquema de una motoneurona en el asta anterior de la médula espinal. (B) Imagen aumentada de A. (C) Tras la tinción con sales argentícas, se aprecian las neurofibrillas (neurofilamentos en ovillo). (D) Tras una tinción catiónica, como la tionina, se aprecian los cuerpos de Nissl [7].

La sinapsis son los puntos de contacto entre neuronas, existen tres tipos de sinapsis:

1. Sinapsis eléctrica.- Consisten en uniones comunicantes entre dendritas o somas de neuronas contiguas, donde existe una continuidad citoplásmica a través de canales de 1,5-nm, la hendidura sináptica es muy estrecha (de unos 3.5 nm) y hay aposición de membranas (uniones estrechas o gab-junctions), lo cual permite que la despolarización o hiperpolarización de una neurona provoque la despolarización o hiperpolarización de la

otra neurona. No participan transmisores ni hay retardo sináptico. Permiten que los cambios electrotónicos pasen de una neurona a otra. Al estar estrechamente acopladas, no hay modulación posible. Su función es la de asegurar la actividad sincrónica de las neuronas que presentan una acción común. Un ejemplo son los circuitos neuronales que controlan las sacudidas oculares, en donde la mirada pasa rápidamente de un objeto de interés a otro.

2. Sinapsis químicas.- Consta de una membrana presináptica, una hendidura sináptica y una membrana postsináptica. La membrana presináptica pertenece al botón terminal, y la membrana postsináptica pertenece a la neurona diana. El mensaje es transmitido por una sustancia neurotransmisora liberada por el botón mediante exocitosis, atraviesa la estrecha hendidura sináptica y activa los receptores en la membrana postsináptica. La hendidura sináptica puede ser de unos 20 nm o más amplia, en la sinapsis química, el mensaje es unidireccional y cuando se trata de sinapsis por liberación exocitótica, presentan un retardo. Este retardo sináptico está dado por el proceso de liberación del neurotransmisor y por el pasaje del neurotransmisor por la hendidura sináptica, su duración es de unos 0.5 mseg. Subyacente a la membrana postsináptica se encuentra la red subsináptica; en ésta la activación del receptor desencadena numerosos cambios bioquímicos (Fig. 3) [6,7].
3. Sinapsis mixta.- Se denominan sinapsis mixtas, a ciertas sinapsis en las que se presenta una sinapsis química y una sinapsis eléctrica juntas. Permite a la neurona tener una vía de comunicación rápida (sinapsis eléctrica) y otra relativamente lenta pero de acción prolongada en el tiempo (sinapsis química). Las señales son unidireccionales y son excitatorias o inhibitorias.[7].

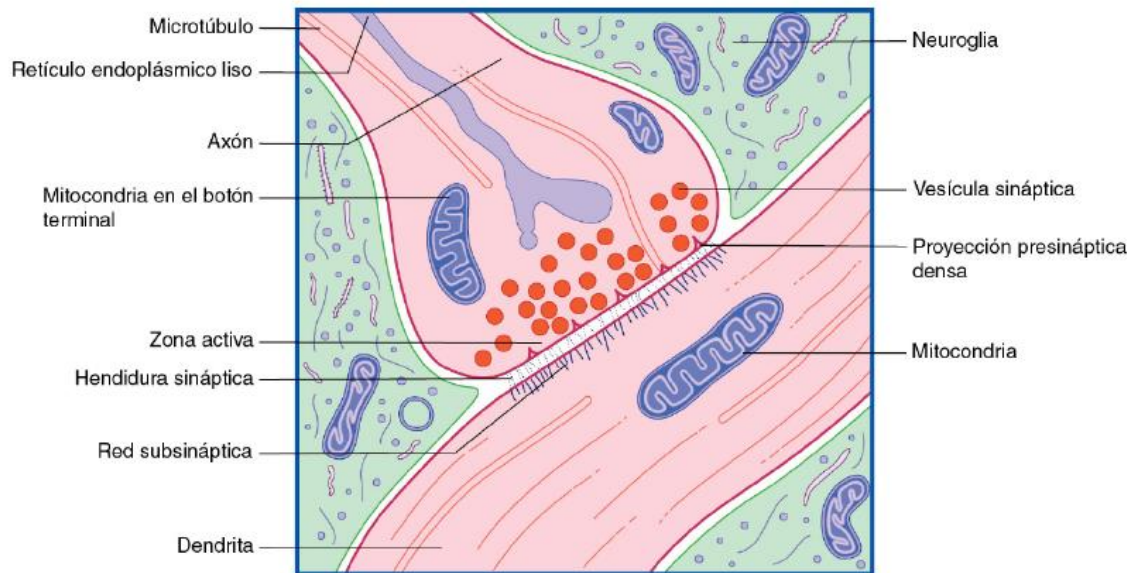


Figura 3. Ultraestructura de una sinapsis axodendrítica [6].

Las neuronas se clasifican en el número de procesos o prolongaciones originados en el cuerpo neural en unipolares, bipolares y multipolares. Las **neuronas unipolares**, presentan un único proceso que da origen a varias ramas. En los mamíferos, la neurona sensorial primaria de los ganglios de las raíces dorsales es una variante de una neurona unipolar. Las **neuronas bipolares** son de soma ovoide y presentan dos procesos, periférico (función dendrítica) y central (axonal). Las neuronas bipolares de la retina son un ejemplo de esta clase. Las neuronas multipolares son el tipo predominante en el SNC de los mamíferos. Presentan arborizaciones dendríticas y un solo axón. Por ejemplo las neuronas piramidales de la corteza cerebral, las motoneuronas espinales y las células de Purkinje del cerebelo (Fig. 4). Otra clasificación es de acuerdo a la longitud del axón. **Neuronas de axón largo o de tipo Golgi I**, que participan en la transferencia de información en procesos cerebrales y **Neuronas de axón corto o de tipo Golgi II**, que cumplen la función de interneuronas en circuitos locales [7].

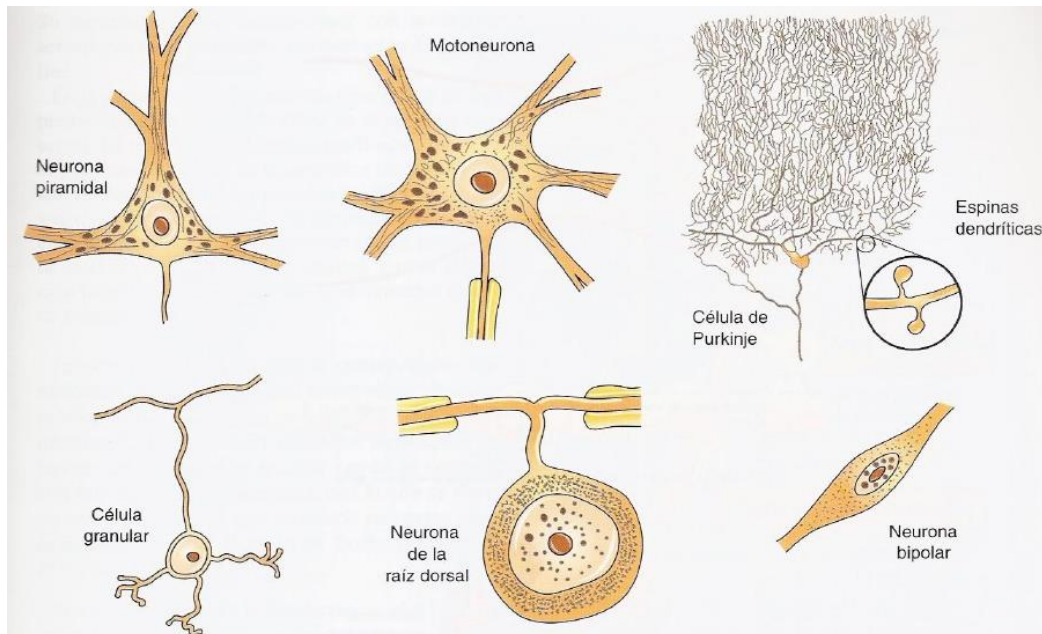


Figura 4. Tipos de neuronas. Clasificación de neuronas según los procesos originados [7].

De esta manera se enuncia la siguiente regla elemental de formación de circuitos neuronales del SNC: “dos neuronas y tres circuitos”. Es decir, dos tipos neuronales (Golgi I y Golgi II) generan tres circuitos: **Circuito local**, formado por interneuronas; **Circuito de proyección**, comunican circuitos locales lejanos entre si y **Circuito “en telaraña”**, que dan la base para que modificaciones locales y aisladas se transformen en estados globales del SNC [5,7].

2.3 Células Gliales

La existencia de las células gliales o glía fue descrita por primera vez en 1856, por Rudolph Virchow reconoció la presencia de un componente intersticial o tejido conjuntivo en el sistema nervioso envolviendo los componentes nerviosos y que denominó Nervenkitz o neuroglia. Las células gliales, son células que controlan el entorno del SN en el que funcionan las neuronas y superan en número a las neuronas en una proporción de aproximadamente 5:1 [5,7,8,9]. Las células gliales desempeñan funciones importantes en procesos de proliferación y regeneración neuronal, así como constituyen el tejido de sostén y revestimiento de las neuronas. En el SNC se

encuentran cuatro tipos de células de la neuroglia: células ependimarias, astrocitos, oligodendrocitos (de origen ectodérmico) y microglia (de origen mesodérmico) (Fig. 5) [5,7,10].

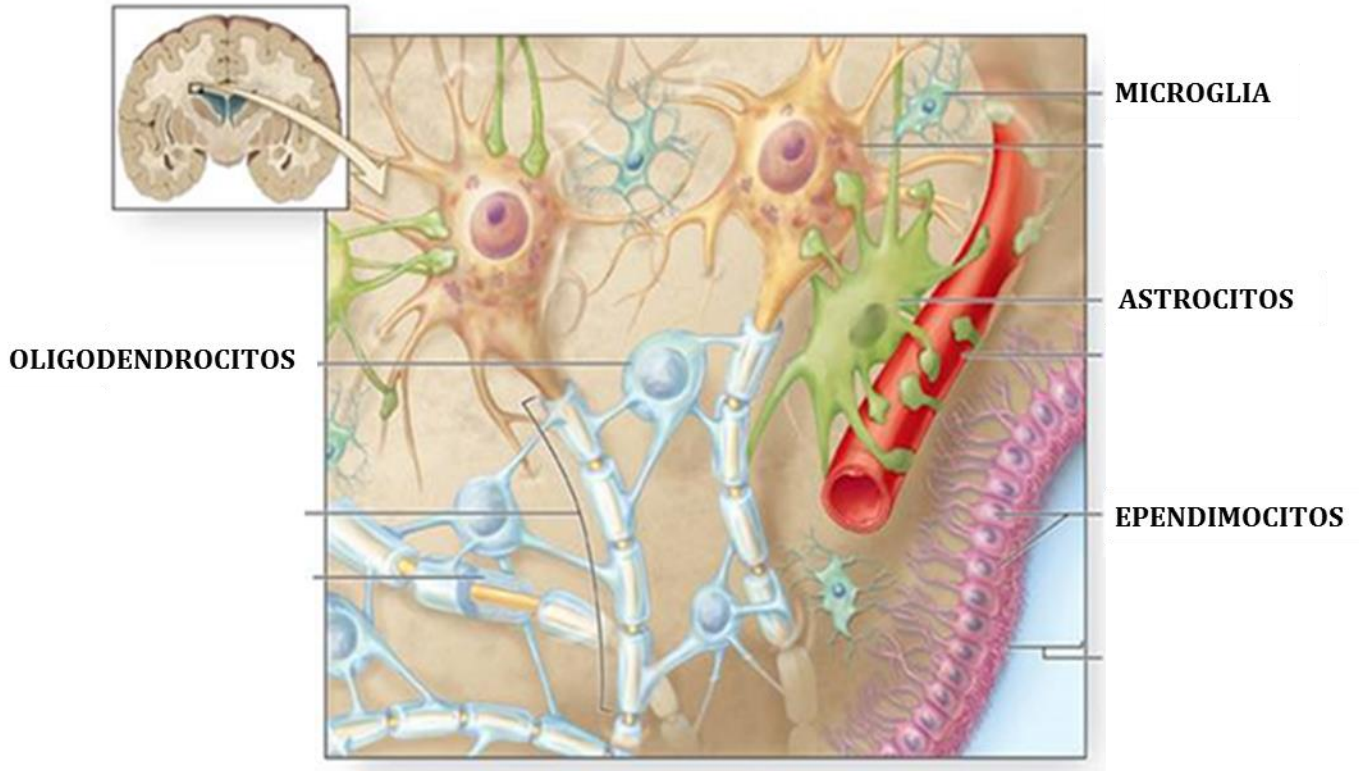


Figura 5. Tipos de células de la neuroglia [7].

Las **células ependimarias**, revisten las cavidades del encéfalo y el conducto central de la medula espinal. Forma una capa única de células cubicas o cilíndricas y poseen microvellosidades o cilios. Los cilios a menudo son móviles y sus movimientos contribuyen al flujo del líquido cefalorraquídeo [11]. Los **astrocitos**, son las células no neuronales mayoritarias del sistema nervioso central. Sus funciones son muy diversas; construyen la microarquitectura del parénquima cerebral dividiendo la materia gris en unidades estructurales relativamente independientes, mantienen la homeostasis cerebral, almacenan y distribuyen sustratos energéticos, controlan el desarrollo de células neurales, la sinaptogénesis y el mantenimiento



sináptico [12,13,14]. La **microglia**, son células pequeñas con capacidad fagocitaria que eliminan los restos de tejido de células dañadas; además las células de la microglia proporcionan la defensa contra microorganismos invasores, organiza la protección y restauración de la homeostasis del tejido, libera múltiples factores y compuestos pro-inflamatorios con efectos inmunorreguladores [15].

2.4 Oligodendrocitos

Los oligodendrocitos son células gliales que interactúan con el soma y el axón de las neuronas del SNC, en el adulto se distribuyen de manera homogénea por todo el SNC principalmente en la sustancia blanca, desempeñando una función crítica en el cerebro y en la médula espinal mediante la síntesis de vainas de mielina que envuelven los axones proporcionando el aislamiento eléctrico necesario para maximizar la velocidad de conducción; pero también en la sustancia gris, donde forman las células satélite que parecen participar en el intercambio iónico con las neuronas. La importancia de los oligodendrocitos y de la mielina se hace evidente en enfermedades tales como la esclerosis múltiple (siglas en español, EM) en el que las lesiones desmielinizadas resultan en déficits físicos y cognitivos [6,16,17,18]. La mayor parte del conocimiento sobre la biología de los oligodendrocitos se deriva de estudios en modelos animales murinos, estos estudios llevaron a la identificación de principios importantes del desarrollo de oligodendrocitos y formación de la mielina [19]. Los oligodendrocitos son las últimas células que se generarán después de las neuronas y astrocitos durante el desarrollo embrionario. Los oligodendrocitos se originan a partir de células mitóticas precursoras de oligodendrocitos (CPO) y se diferencian en células progenitoras que progresivamente maduran en células productoras de mielina. Las CPO generadas durante el desarrollo embrionario en áreas restringidas del SNC tienen una alta capacidad de migración poblando el cerebro y la médula



espinal para generar oligodendrocitos que mielinizan todo el SNC durante la vida postnatal. Una pequeña fracción de las CPO generadas durante el desarrollo embrionario se mantienen como células inmaduras con una lenta proliferación o en estado quiescente en el SNC adulto, estas CPO están presentes en todas las estructuras del cerebro y representan 2-9% de la población de células del SNC [20]. En la médula espinal, la mayoría de los oligodendrocitos se derivan de un dominio especializado de la zona ventricular ventral que primero da lugar a los precursores de las neuronas motoras, y luego a las CPO. A partir de ahí, las CPO migran a lo largo de la médula espinal y, finalmente, se diferencian en oligodendrocitos formadoras de mielina. Posteriormente, una fuente adicional de CPO surge en la médula espinal dorsal, que contribuyen con 10-15% de la población de oligodendrocitos final en la médula espinal. En el cerebro anterior en desarrollo, varias olas de la producción de CPO migran generando toda la población de oligodendrocitos. En ratones la primera ola de producción de CPO se origina en la eminencia ganglionar, la segunda y tercera ola de CPO emanan de la eminencia lateral y caudal ganglionar, finalmente de la corteza después del nacimiento, que respectivamente, dan lugar a la mayoría de oligodendrocitos adultos en ratones [16,18,19,20]. Una vez en su destino final, los oligodendrocitos maduran en respuesta a una combinación de factores de crecimiento, hormonas, neurotransmisores y proteínas de la matriz extra celular, adquiriendo su típico perfil bioquímico con la expresión de proteínas de mielina que incluyen a la proteína básica de mielina (MBP), proteína proteolipídica (PLP), 2'3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa (CNPasa), glicoproteína de la mielina del oligodendrocito (MOG) y glicoproteína asociada a la mielina (MAG); así como morfología, que comienza a cubrir al axón de las neuronas formando vainas de mielina [21,22,23]. Las sucesivas fases de diferenciación y maduración de las CPO se caracterizan por cambios morfológicos (aumento progresivo del número de ramificaciones) donde la mayor capacidad de movimiento de las

células oligodendrogliales se limita a las etapas en las que la morfología celular es menos ramificada y por la expresión de diferentes marcadores inmunocitoquímicos (Fig. 6) [16].

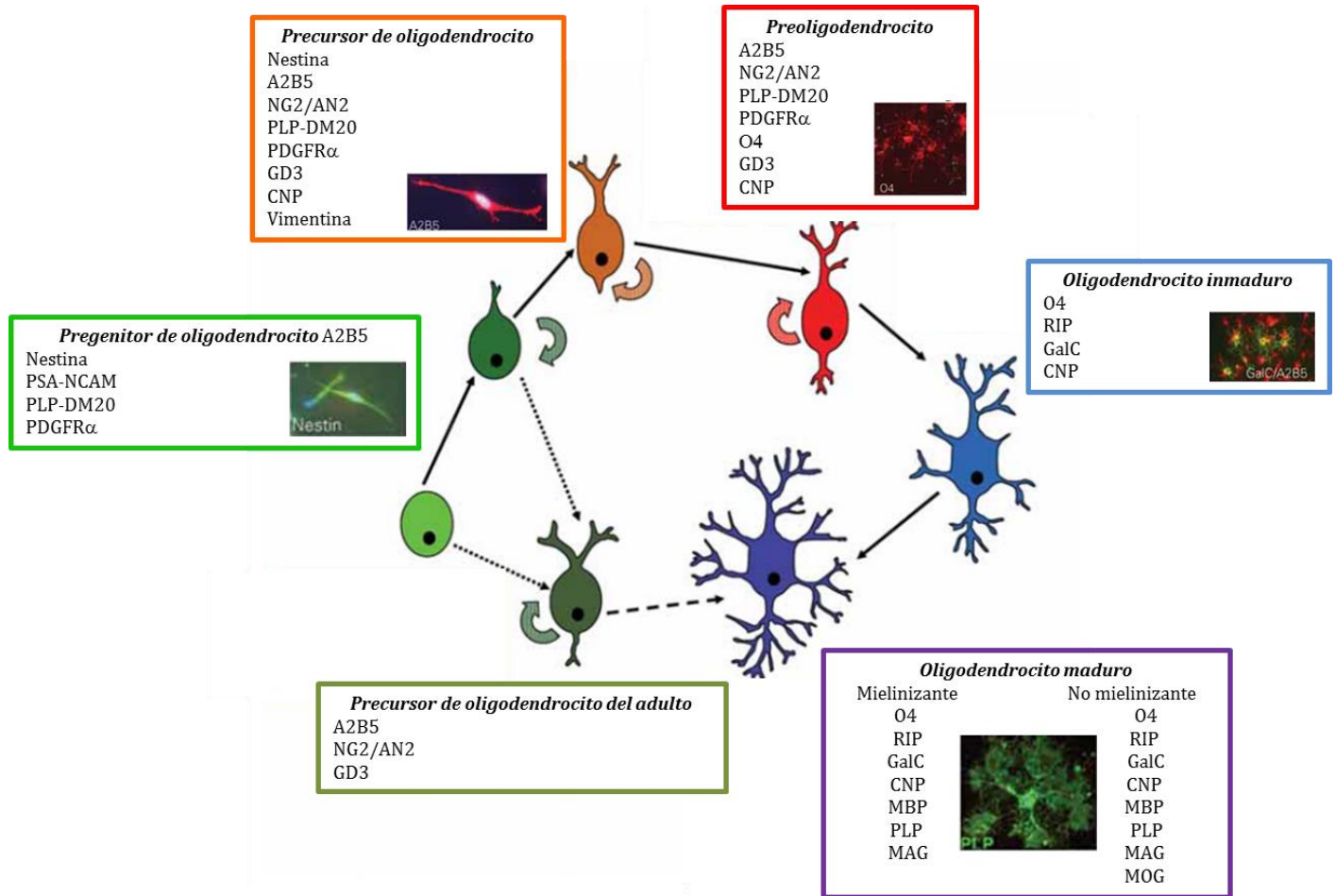


Figura 6. Distintas etapas del linaje oligodendroglial.

Durante las primeras etapas, las células conservan cierta capacidad proliferativa (indicada con flechas). La mayor capacidad de movimiento de las células oligodendrogliales se limita, casi exclusivamente, a las etapas en las que la morfología celular es menos ramificada [11].



La especificación, migración, proliferación y diferenciación de oligodendrocitos maduros esta regulada por la interacción de factores intrínsecos y extrínsecos que participan en la generación de CPO y mielinización. Factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF); así como, vías de señalización Shh, Fyn, FAK, MAPK/ERK, AMPc/GMPc, PI3K/Akt/mTor, Wnt y Notch, son esenciales en la mielinización [24,25,26,27].

La especificación de las células del linaje de los oligodendrocitos en la médula espinal ventral y en el telencéfalo son dependiente de Shh, mientras que el surgimiento posterior de CPO de origen dorsal es independiente de Shh pero dependiente de FGF2. Dos clases de familias de transcripción, las proteínas bHLH, Olig1 y Olig2, y NKX2.2, son dependientes de la concentración de Shh para controlar el origen de la neurona frente al destino de la glía. Se requiere Olig2 para la producción de neuronas motoras y de CPO, pero específicamente para CPO se requiere tanto Olig1 y Olig2. En las primeras etapas, los factores de transcripción bHLH Neurogenina-1 y Neurogenina-2 promueven la producción de la neurona motora Olig2 dependiente y previene la producción de CPO. En etapas posteriores, la reducción de Neurogenina-1, Neurogenina-2 y factores gliogénicos, como Sox9 y Notch, regulan la función Olig2 para producir glía en lugar de las neuronas. Además de la especificación de CPO y la proliferación, Shh también regula la migración de los CPO a través del receptor LRP-2. Del mismo modo, al mantener PDGFR en los CPO, Sox10 y Sox9 promueven la migración. Las CPO también dependen de múltiples componentes de la matriz extracelular (ECM), incluyendo tenascin-C, la cual inhibe la migración, mientras que la fibronectina y la laminina merosina la promueven. La migración de CPO depende de la reorganización del citoesqueleto de actina, y moduladores de la polimerización de actina en oligodendrocitos incluyen la familia Src receptor de la tirosina cinasa Fyn, un regulador

clave de la diferenciación de oligodendrocitos y mielinización. PDGF estimula la migración de CPO a través de la activación de Fyn cinasa, también las CPO expresan una gama de receptores de neurotransmisores, que incluyen al glutamato, GABA, receptores muscarínicos, y ATP y su producto de degradación de adenosina (Fig. 7) [24,28].

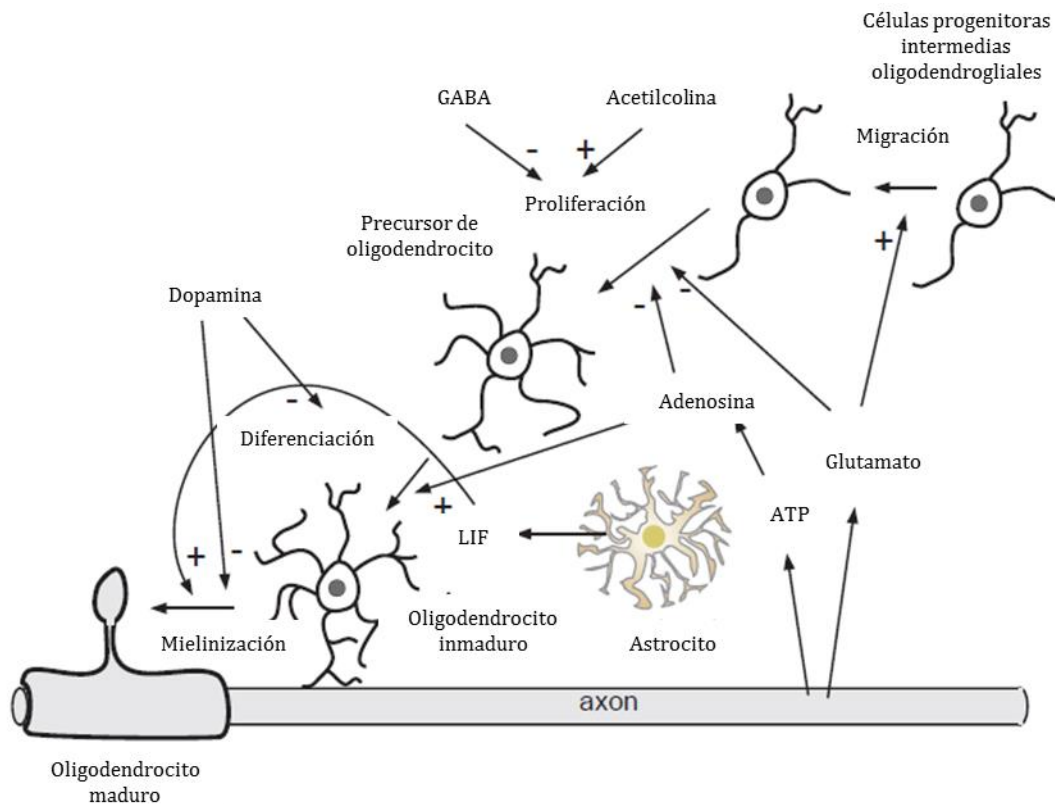


Figura 7. Señalización Axón-oligodendrocitos.

Los oligodendrocitos expresan un número de receptores de neurotransmisores que median interacciones axón-glia, durante la diferenciación y la mielinización. El glutamato y ATP, junto con su producto de degradación de adenosina, estimulan la migración de CPO. El glutamato también inhibe la proliferación y la diferenciación. El ATP estimula a los astrocitos para liberar el factor inhibidor de la leucemia (LIF), que estimula la diferenciación. La proliferación y diferenciación de CPO también se alteran por GABA y dopamina, que son inhibitorios; así como ACh, que es generalmente es estimulante [24].

Fyn cinasa, pertenece a la familia Src cinasas no receptores de tirosina. Se expresa en todo el cerebro y es altamente expresado en los oligodendrocitos. Fyn integra señales procedentes de moléculas de la matriz extra celular y de ligandos axonales, con el fin de inducir cambios en la dinámica del citoesqueleto que conducen a la diferenciación y la mielinización estimulando la transcripción del gen MBP (Fig. 8) [27,29].

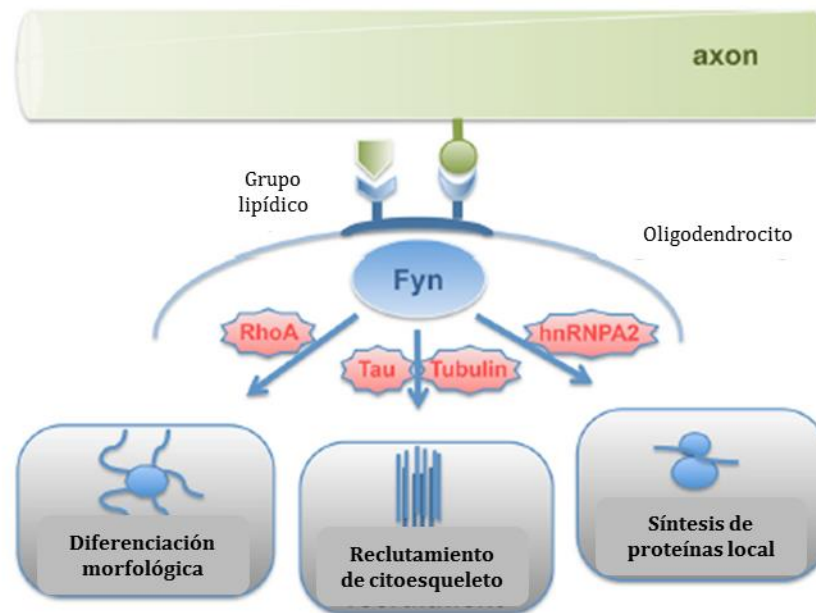


Figura 8. Transmisión de señales por Fyn Cinasa.

Fyn cinasa asociada con balsas lipídicas, activa tres vías principales que regulan la diferenciación, la estabilidad del citoesqueleto y la polarización celular, así como la síntesis de proteínas locales [29].

La cinasa de adhesión focal (FAK), es una proteína cinasa no receptora de tirosina que se expresa de forma ubicua en el SNC. FAK está presente en las células del linaje de oligodendrocitos. FAK al igual que Fyn, integra las señales desde el espacio extra celular con el fin de inducir cambios en el citoesqueleto dentro de los oligodendrocitos necesarios para la



mielinización. Señalización FAK a menudo es estimulada por otras vías de señalización, como Akt/mTOR [27].

La proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK/ERK), comprende familias de proteínas cinasas Serina/Treonina específicas, activadas por estímulos extracelulares a través de la fosforilación de proteínas. Es una vía de punto de convergencia de muchas señales externas en los oligodendrocitos, incluyendo NRG1, BDNF, IGF-, y FGF. La señalización ERK1 y ERK2 promueve la mielinización, mientras que p38MAPK se ha demostrado que regulan positivamente la diferenciación de oligodendrocitos y la expresión de genes de mielina mediante la modulación de la función del gen Sox [27,30].

Adenosina 3',5'-monofosfato cíclica (AMPC) y guanosina 3',5'-monofosfato cíclica (GMPc), son segundos mensajeros que regulan una multitud de respuestas celulares. La formación de estos segundos mensajeros puede ser activado por un número muy grande de estímulos celulares, principalmente neurotransmisores y hormonas. Todos estos estímulos se detectan por los receptores acoplados a proteínas G (en inglés G-protein-coupled receptor, GPCR), que utilizan proteínas G heterotriméricas, responsables de la activación o inhibición de la enzima adenilato ciclasa (AC) o guanilato ciclasa (GC) [31].

En la vía del AMPC, el estímulo externo se une a los GPCR y la proteína G heterotrimérica, se encarga de transmitir el estímulo a las adenilato ciclasas. Estas proteínas G heterotrimérica, están formadas por una subunidad α , responsable de la especificidad de la proteína G y de la fijación e hidrólisis del GTP, y dos subunidades más pequeñas β y γ . El estímulo externo que se une a los GPCR funciona como un factor de intercambio de nucleótidos de guanosina, para reemplazar el guanosín difosfato (GDP) con guanosín trifosfato (GTP). Induciendo la disociación del complejo

heterotrimerico en sus subunidades $G_{\beta\gamma}$ y G_{α} . El complejo $G_{s\alpha}$.GTP activa a AC, que es el enzima responsable de la conversión del trifosfato de adenosina (ATP) a AMPc y pirofosfato [32], [33].

En la vía del GMPc, el GMP cíclico, se sintetiza por la GC. Este último se presenta en dos formas diferentes: hay GC soluble (GCs) y GC unida a la membrana (GCp). La GCs se activa por el NO, y GCp pertenece a un grupo de receptores que funciona tanto como un transductor, como un amplificador para generar el segundo mensajero GMP cíclico (Fig. 9) [32].

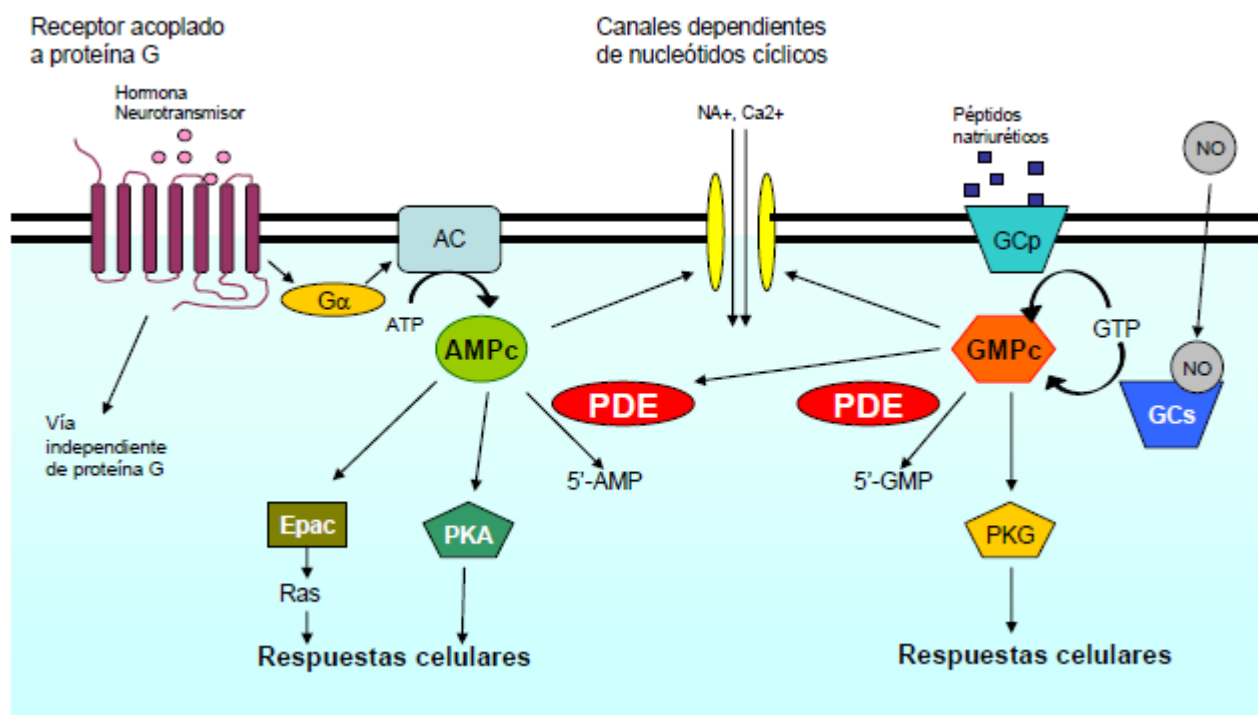


Figura 9. Vía de señalización del AMPc y del GMPc [34].

El AMPc, una vez sintetizado por las AC, actúa como segundo mensajero intracelular interactuando con diferentes tipos de proteínas como PKA (proteína cinasa dependiente de AMPc), canales iónicos dependientes de nucleótidos cíclicos, que son los sistemas efectores de la respuesta celular al estímulo inicial o ligando. Las PKA, son proteínas heterotetraméricas con dos subunidades reguladoras (RI y RII), que contienen los sitios de unión del AMPc, y otras dos



catalíticas (CI y CII). En ausencia de AMPc, el tetrámero es inactivo. La unión del AMPc a las subunidades reguladoras, reduce su afinidad por las subunidades catalíticas, activas por sí mismas. Estas subunidades catalíticas liberadas, fosforilando residuos específicos de serina y treonina, alteran la actividad de sus proteínas diana, entre las que encontramos: receptores, otras proteínas cinasas, canales de calcio, fosfodiesterasas, MAPK, factores de transcripción, histonas, etc. Además, el AMPc es capaz de activar la expresión de genes cuyo promotor contenga una o varias secuencias CREs (cyclic AMP response elements, en inglés), que unen factores de transcripción como son CREB (cyclic AMP response element binding protein, en inglés), CREM (cyclic AMP response element modulator, en inglés) o ATF-1 (activating transcription factor, en inglés). Una vez activada la PKA, la subunidad C entra hacia el núcleo de la célula donde, mediante la fosforilación del residuo de serina 133, activa CREB que, en este estado, activa genes de respuesta al AMPc mediante la unión a las secuencias conservadas CREs. Todos aquellos genes de respuesta al AMPc presentan una secuencia palindrómica CRE y están involucrados en procesos fisiológicos en los que también está implicado CREB. Así CREB, está implicado en una variedad de procesos como el metabolismo celular, el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa, la espermatogénesis, el control del ritmo circadiano o en procesos de aprendizaje y memoria [33,34]. En oligodendrocitos CREB, desempeña diferentes funciones en etapas específicas del desarrollo de oligodendrocitos. En las primeras etapas, cuando las células son precursores inmaduros, CREB funciona como mediador de la proteína cinasa C (PKC)/MAPK regulando la proliferación celular. En contraste, en etapas posteriores, CREB funciona como mediador en la expresión de MBP [35].

El GMPc, una vez sintetizado por las guanilato ciclasas, actúa como segundo mensajero intracelular interactuando con diferentes proteínas: proteína cinasa dependiente de GMPc

(PKG), canales iónicos dependientes de nucleótidos (CNGC), transportadores de nucleótidos cíclicos y fosfodiesterasas. Las PKG, es un dímero formado por dos cadenas polipeptídicas idénticas que continúan asociadas incluso después de la activación por GMPc, a diferencia de PKA, que se disocia una vez que se une el AMPc. Esta enzima participa en procesos tan diversos como la relajación muscular, la agregación plaquetaria o la regulación de las PDE dependientes del GMPc [33]. Además el GMPc, es capaz de activar al factor de respuesta sérica (SRF), quien está implicado en la plasticidad neuronal y se relaciona con la formación de la memoria [34]. Así como, SRF está asociado a la diferenciación de oligodendrocitos (Fig. 10) [36].

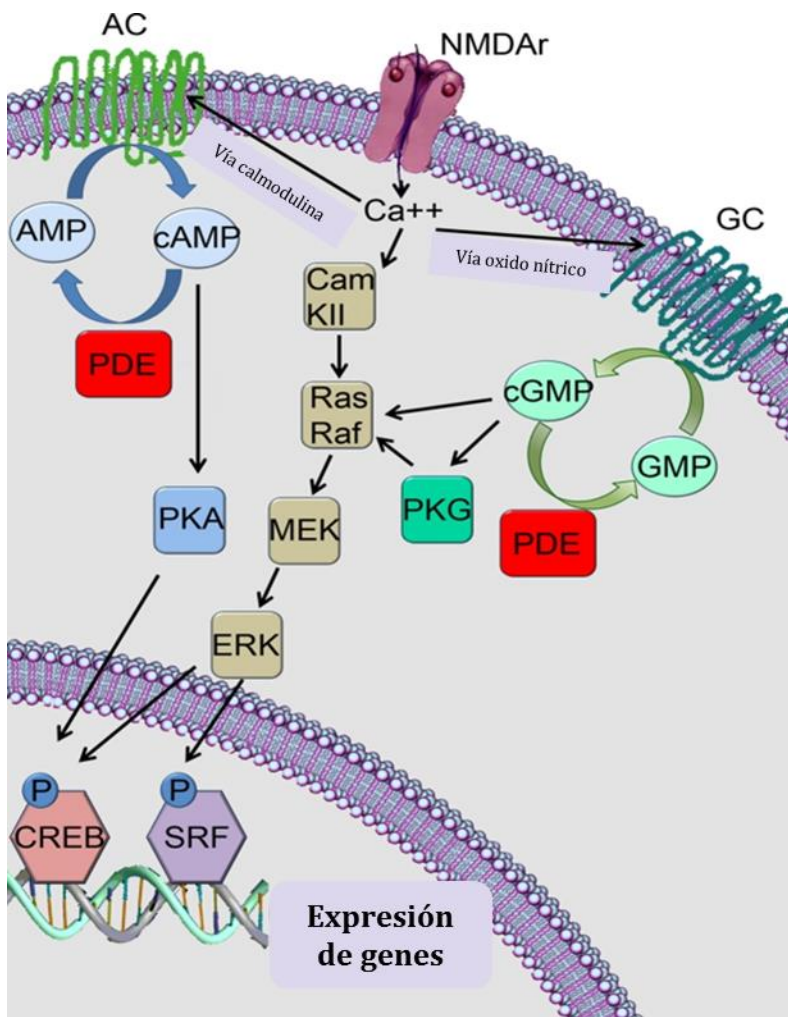


Figura 10. AMPc y GMPc promueven la expresión de genes.

NMDAr, receptor ionotrópico de glutamato NMDA (N-metil-D-aspartato); AC, adenilato ciclasa; GC, guanilato ciclasa; PDE, enzima fosfodiesterasa; Cam, calmodulina; KII, proteína cinasa dependiente de calmodulina; MEK, proteína cinasa (MAP/ERK); ERK, cinasas reguladas por señales extracelulares; CREB, proteína de elemento de respuesta a unión de cAMP; SRF, factor de respuesta sérica, modificado de [34].



Proteína cinasa serina/Treonina (Akt)/proteína cinasa diana de mamífero de la rapamicina (mTOR), son proteínas cinasas serina/treonina, altamente conservadas. Regulan múltiples funciones celulares, incluyendo la supervivencia, proliferación, la organogénesis y la diferenciación de numerosos tipos de células. Akt es activada por un segundo mensajeros lipídico generado por PI3-cinasa (PI3K), a su vez Akt activa a mTOR. Al igual que la vía MAPK/ERK, la vía PI3K/Akt/mTOR representa una poderosa vía integradora de múltiples señales extracelulares que influyen en el desarrollo de oligodendrocitos. La señalización Akt en oligodendrocitos se activa por neurregulinas, integrinas, IGFI, NT-3 y por el factor inhibidor de la leucemia [27,28].

Está claro que la vía de mTOR es un mediador esencial de la señalización PI3K/Akt durante el desarrollo de oligodendrocitos, y esta vía conecta a varios factores externos de crecimiento u hormonas con funciones conocidas en la diferenciación de CPOs y la mielinización. Sin embargo, los objetivos específicos del mTOR aún no se han definido en oligodendrocitos. Por lo que se proponen varios aspectos en que la señalización de mTOR puede ser crítica. Estos incluyen la regulación de la diferenciación, reordenamientos del citoesqueleto involucrada en la maduración morfológica y procesos necesarios para la síntesis de mielina [37].

Proteínas Wnt son una familia de glicoproteínas de señalización que promueven la acumulación y activación del factor de transcripción β -catenina. La señalización β -catenina es un regulador conocido de desarrollo neural embrionario, la proliferación celular, y diferenciación; sin embargo, la señalización canónica de Wnt- β -catenina inhibe la diferenciación y la mielinización de CPO mediante la supresión de Olig2 a través de un complejo transcripcional y la modulación epigenética de la expresión génica. La fuente endógena de Wnt es desconocida, pero por la unión a su receptor frizzled inhibe GSK-3 β para permitir la translocación de β -catenina al núcleo, donde se forma un complejo con el factor de transcripción TCF4 (factor de células T, factor de mejora



linfoide o TCF/LEF) para activar o reprimir genes diana. La formación del complejo de TCF4 con β -catenina es impedido por HDAC1/2, que de ese modo antagoniza la señalización Wnt para estimular la diferenciación de oligodendrocitos (Fig. 9) [24,26].

Notch, es una proteína implicada en especificación celular en el SNC, así como regulador en el sistema inmunitario. La vía de señalización Notch desempeña una función importante en la regulación del equilibrio entre la proliferación, diferenciación y la mielinización en el SNC en desarrollo. La familia Notch incluye cuatro receptores de superficie celular (Notch1-Notch4), dependiendo del tipo de ligando que se una al receptor Notch, esto puede inhibir o promover la diferenciación y maduración de los CPO, a través de señalización canónica o no canónica respectivamente. Activación de la señalización canónica mediada por ligandos incluyendo Jagged1 y Delta1 que restringen diferenciación de CPO y es permisiva para la proliferación, mientras que la vía de señalización no canónica en CPO es provocada por ligandos axonales incluyendo F3/contactina y está implicado en efectos sobre la maduración (Fig. 11) [25,26].

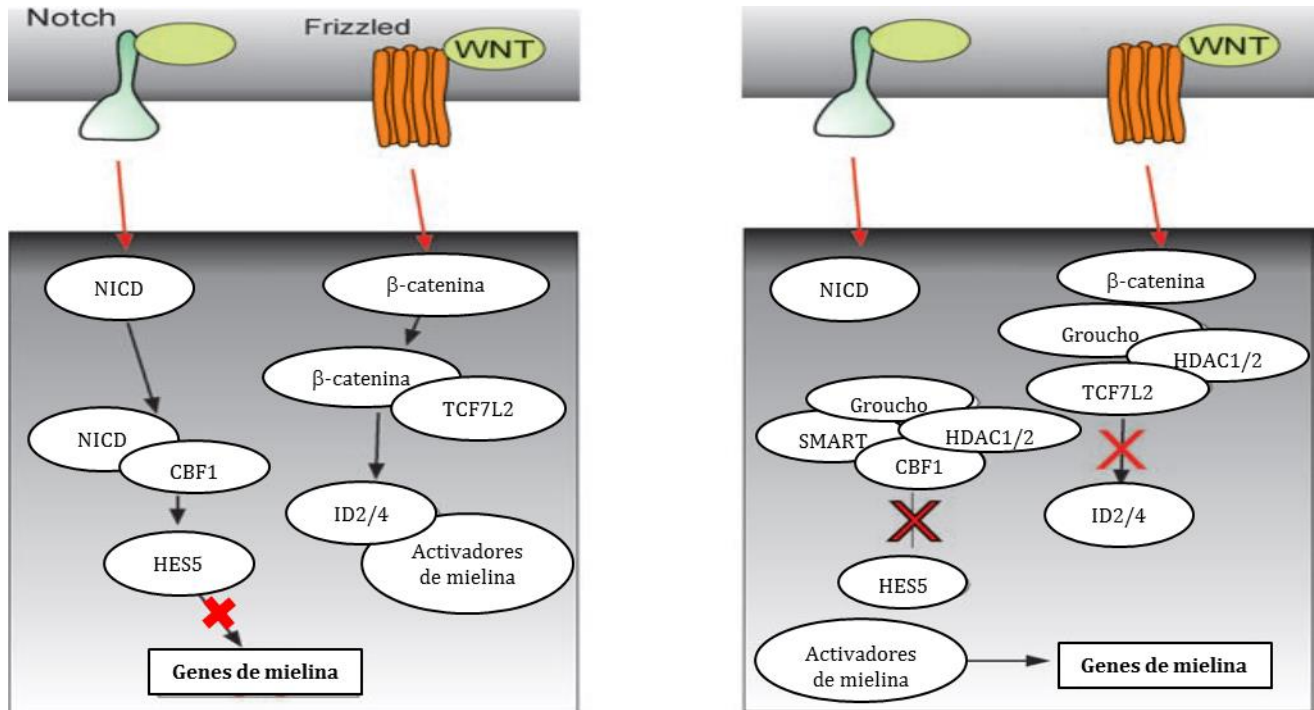


Figura 11. Interacción de señales extracelulares y factores epigenéticos en el control de la diferenciación de oligodendrocitos.

A. Reguladores negativos de la diferenciación de oligodendrocitos como Wnt o señalización Notch, que actúan a través de β -catenina, Smads o NICD inducir la transcripción de los inhibidores de la diferenciación como ID2, ID4 y Hes1/5. ID2/4 secuestran a Olig1/2 activadores de genes de mielina, mientras que Hes1/5 se unen a elementos reguladores de genes necesarios para la maduración de los oligodendrocitos.

B. HDAC1/2, con co-represores, tales como Groucho, compiten o desplazan a componentes de Wnt y Notch para causar desinhibición, activando de ese modo la transcripción de genes de mielina [24].

2.4.1 Mielina

La principal función de los oligodendrocitos es la formación de mielina o mielinización, es decir, la formación de un complejo lipoproteico que se deposita alrededor de un axón en un proceso en espiral, en el cual las caras internas y externas de la membrana plasmática del oligodendrocito forman las líneas densas alternantes mayores y menores que se ven en las secciones transversales de la vaina de mielina [6,38]. La vaina de mielina es una capa aislante que proporciona la rápida conducción de los impulsos nerviosos, que impone una conducción saltatoria dividiendo al axón en porciones conductoras y no conductoras, de esta manera el axón está cubierto por una serie de segmentos de mielina y las interrupciones entre segmentos se denominan nódulos (o nodos) de Ranvier (Fig. 12) [5].

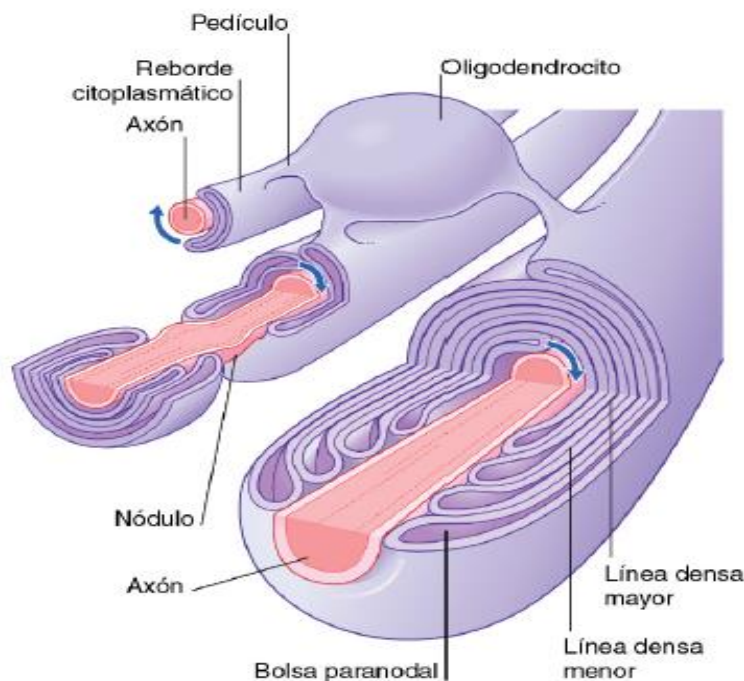


Figura 12. Mielinización en el sistema nervioso central.

Las flechas indican el movimiento del extremo de crecimiento del reborde citoplasmático de los oligodendrocitos [6].



Además de proporcionar aislamiento esencial que permite que el potencial de acción sea desviado de nodo a nodo, la vaina de mielina también es crítica para el agrupamiento específico en los nodos de los canales de sodio y de potasio que generan el potencial de acción. La mielinización incrementa enormemente la velocidad de la conducción del impulso, ya que el proceso de despolarización salta de un nódulo a otro. Los rápidos intercambios iónicos a través de la membrana axónica, esenciales para la generación del potencial de acción y su propagación a lo largo del axón, se producen en los nódulos de Ranvier. La despolarización es después conducida pasivamente (como un potencial gradual) hacia el siguiente nódulo. Este método, la conducción saltatoria, es más rápido y requiere mucha menos energía que hacer que se produzcan intercambios iónicos de manera continua a lo largo de la longitud del axón (Fig. 13) [6,24].

La membrana multicapa de mielina que rodea las fibras nerviosas está compuesta de lípidos unidos simultáneamente a proteínas específicas de mielina. Los lípidos constituyen el 70% de su peso seco y las proteínas un 30%. La estructura principal de lípidos que comprenden a la mielina está compuesta por: colesterol, glicoesfingolípidos derivados de galactosilceramidas (GalCer) y glucosilceramidas (GlcCer), y fosfolípidos en una proporción molar constante de 2:1:2. La composición proteica de la mielina está integrada por la proteína integral de membrana PLP y la proteína extrínseca MBP quienes constituyen el 80 por ciento de proteínas de mielina del SNC; mientras que las proteínas MAG, MOG y CNPasa son cuantitativamente constituyentes menores (Fig. 14) [39,40].

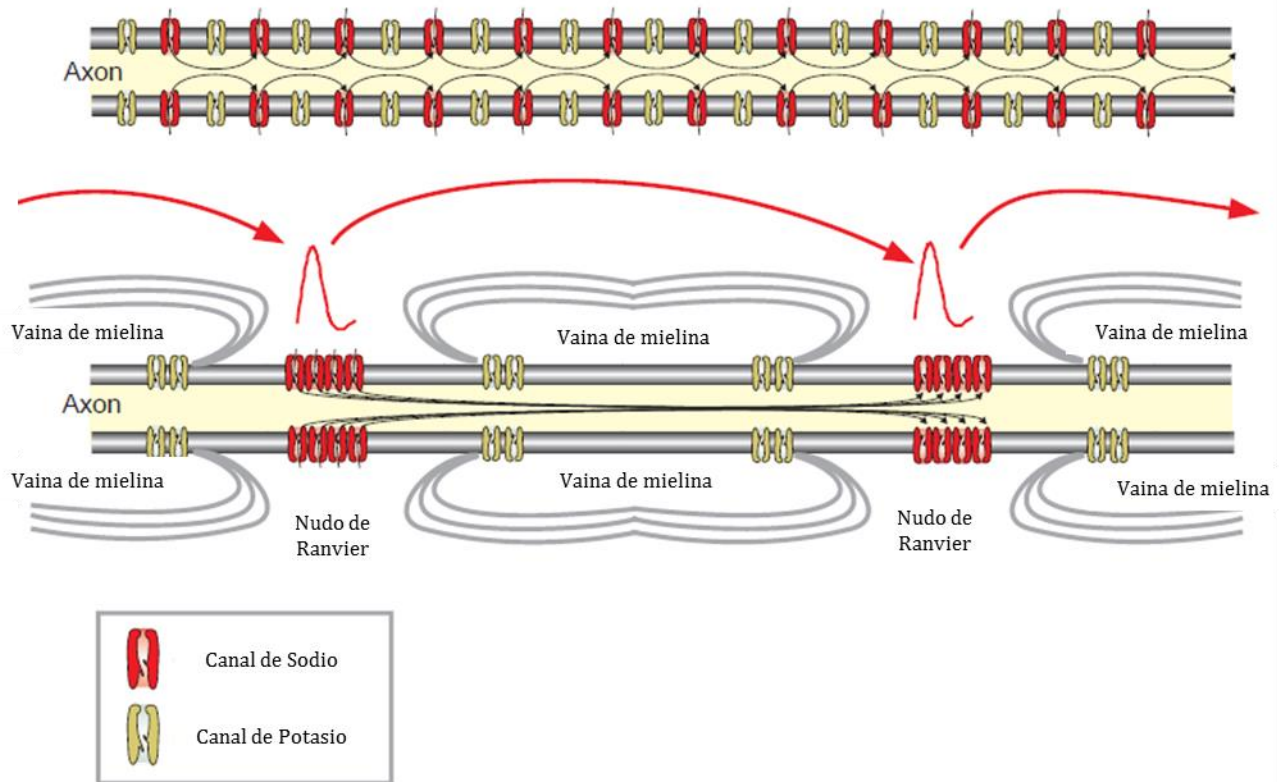


Figura 13. Conducción saltatoria.

La vaina de mielina impone una conducción saltatoria en los axones dividiendo la membrana axonal en porciones alternas conductoras localizadas a los nodos de Ranvier, y porciones no conductoras por debajo de la vaina de mielina. La mielina aumenta la velocidad de conducción, de modo que los potenciales de acción no se generan a lo largo de las áreas cubiertas por la vaina de mielina, y la despolarización de la membrana sólo puede alcanzar el umbral requerido para producir un potencial de acción en los nodos de Ranvier [24].

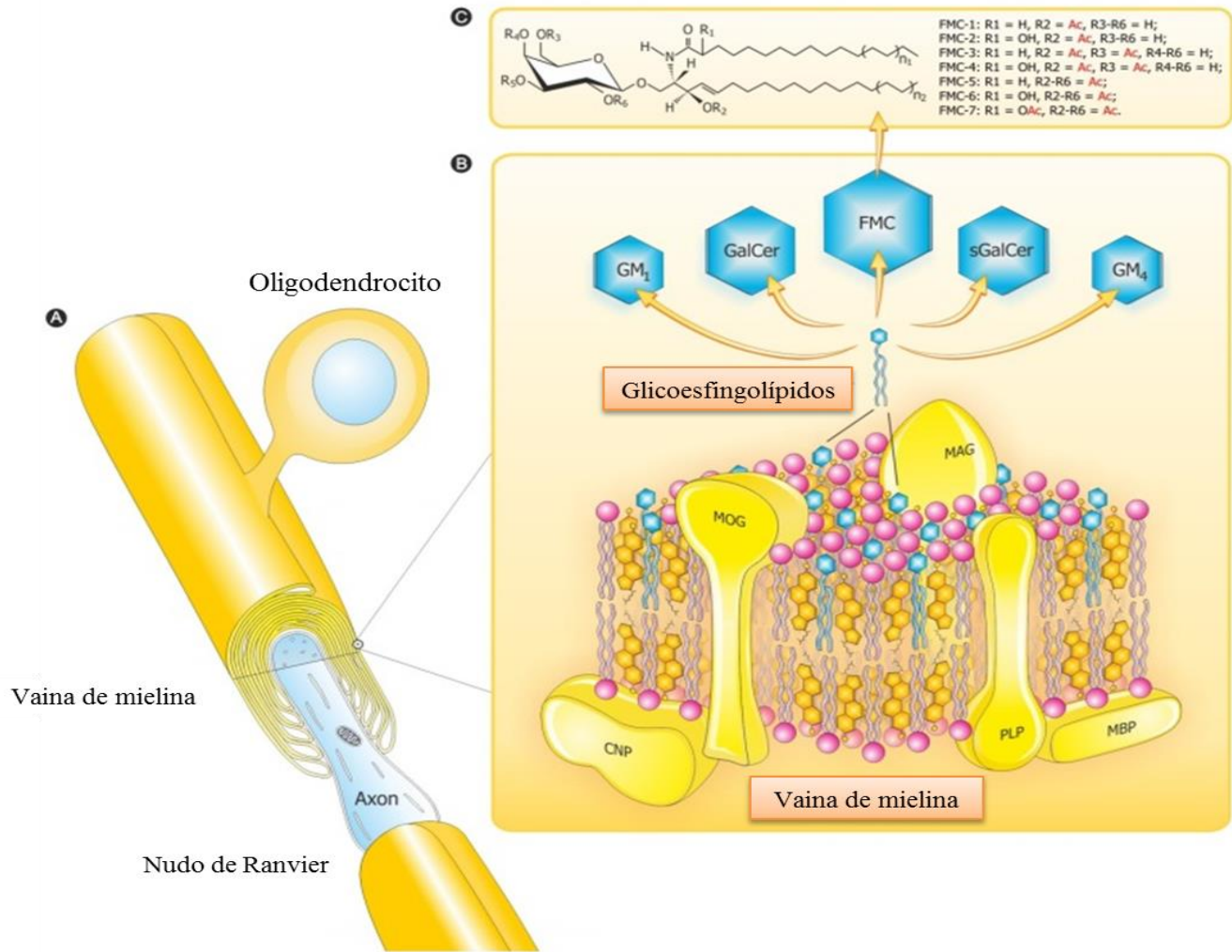


Figura 14. Diagrama compuesto que resume las características de la mielina del SNC.

(A) La arquitectura; (B) La composición molecular en 3D y el montaje basado en la conformación y (C) La esfingosina 3-O-acetil-esfingosina-GalCer. El diagrama muestra la disposición de los lípidos complejos y las proteínas más abundantes. La constancia relativa molar de lípidos: colesterol, fosfolípidos, galactosilceramida (GalCer) es = 2: 2: 1 [40].



La **proteína básica de mielina (MBP)**, es una familia de proteínas con muchas isoformas, y constituye hasta un 30 por ciento de la proteína de la mielina. Hay cuatro isoformas de MBP los más importantes isoformas en seres humanos es 18.5- y 17.2 kDa, en el ratón de 18.5 y 14 kDa. Estos son codificados por los primeros siete exones del gen MBP distribuidos en un tramo de 32 kb en el ratón en el cromosoma 18. Todo el gen MBP es sustancialmente mayor que este, a 105 kb en ratones y 180 Inhumanos kb, y codifica dos familias de proteínas, la primera comprende las MBPs asociados a la mielina y la segunda siendo el golli (gen expresado en el linaje de los oligodendrocitos) de proteínas MBP [24,29].

La **proteína proteolipídica (PLP)**, constituye hasta el 50% de proteínas de la mielina del SNC, con las dos isoformas PLP (25 kDa) y DM20 (20 kDa). Hay una fuerte conservación de la secuencia de proteínas entre las especies, con un 100 por ciento entre la identidad proteínas PLP murinos y humanos. PLP y DM20 son codificada por el mismo gen, localizado en el cromosoma X, así como dos adicionales variantes - sr-PLP y sr-DM20 - derivados de splicing alternativo del gen. La variante de empalme DM20 se expresa predominantemente en primeras etapas de la diferenciación de oligodendrocitos, y disminuye gradualmente a medida que la mielina. Variante de empalme PLP se convierte en la principal forma en oligodendrocitos maduros [24,29].

La **proteína CNP (2',3'-cíclico de nucleótidos-3'-fosfodiesterasa)**, constituye el 4% de mielina en el SNC. Existen dos isoformas, CNP1 (46 kDa) y CNP2 (48 kDa), las dos transcripciones parecen estar bajo el control de diferentes promotores durante la diferenciación de oligodendrocitos [24,29].

La **glicoproteína asociada a la mielina (MAG)**, se expresa en la mielina del SNC como del SNP. Es solamente un componente menor de la mielina (<1% en el SNC y 0,1% en el SNP), pero es la



principal glicoproteína. MAG consta de dos isoformas, S (pequeño, 67 kDa) y L (grande, 72 kDa), MAG se expresa diferencialmente durante el desarrollo [24,29].

La **glicoproteína mielítica del oligodendrocitos (MOG)**, es específico de los oligodendrocitos y se encuentra en la superficie celular y láminas más externas de la mielina. La expresión de MOG se regula en el desarrollo y es una de las últimas proteínas de la mielina que se expresa, por lo que es un marcador para oligodendrocitos maduros. MOG es un auto antígeno clave para la desmielinización primaria en esclerosis múltiple [24,38,40,39,41].

El inicio del desarrollo de la mielinización implica el reconocimiento axón-glial y eventos de adhesión que regulan la producción de productos génicos relacionados con la mielina y el crecimiento de los axones. La mielinización se produce entonces en una serie de distintas fases interdependientes.

- a) Contacto axonal y reconocimiento por parte de las CPO.
- b) Fase de inducción, en el que las CPO se extienden a lo largo de los procesos para formar cortos segmentos de revestimiento, provocando la diferenciación de las CPO en oligodendrocitos premielinizantes y el inicio de la agrupación de canales iónicos axonales.
- c) Fase de remodelación, en la que se pierden los procesos no mielinizante, crecimiento radial y longitudinal de los procesos de mielinización y el establecimiento de nodos de Ranvier.
- d) Fase de maduración, en el que los axones y vainas de mielina dentro de las unidades se someten a un crecimiento interdependiente, establecen dimensiones adultas de diámetro del axón. Los oligodendrocitos de desarrollo tardío, llenan vacíos amielínicos a lo largo de los axones que forman parte de crecimiento normal en la edad adulta, así como en respuesta a la remodelación y desmielinización/remielinización (Fig. 15) [24,29].

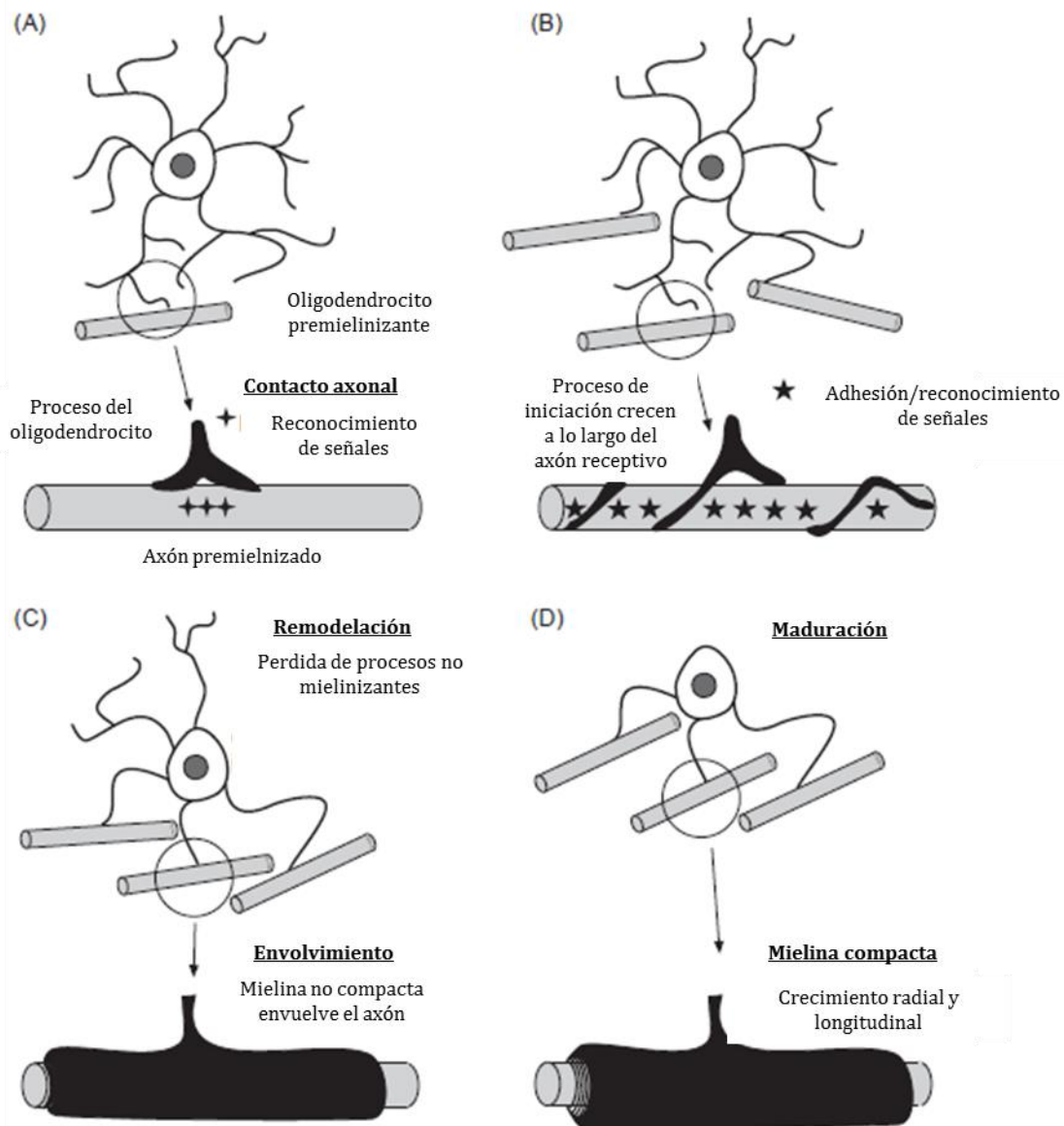


Figura 15. Interacciones axon-glia que regulan la mielinización.

Una serie de eventos de reconocimiento y adhesión axón-glia regulan el inicio del desarrollo de mielinización. Interacciones laminina-integrina pueden considerarse una señal axonal que promueve la diferenciación de oligodendrocitos, con un papel clave en la activación de Fyn [24].

La comunicación continua entre axones y oligodendrocitos es importante durante el desarrollo y mantenimiento de la vaina de mielina. Varios tipos de moléculas, que actúan en diversos niveles de regulación, median estos eventos. Algunas de estas moléculas de señalización promueven o inhiben la mielinización (Fig. 16) [28].

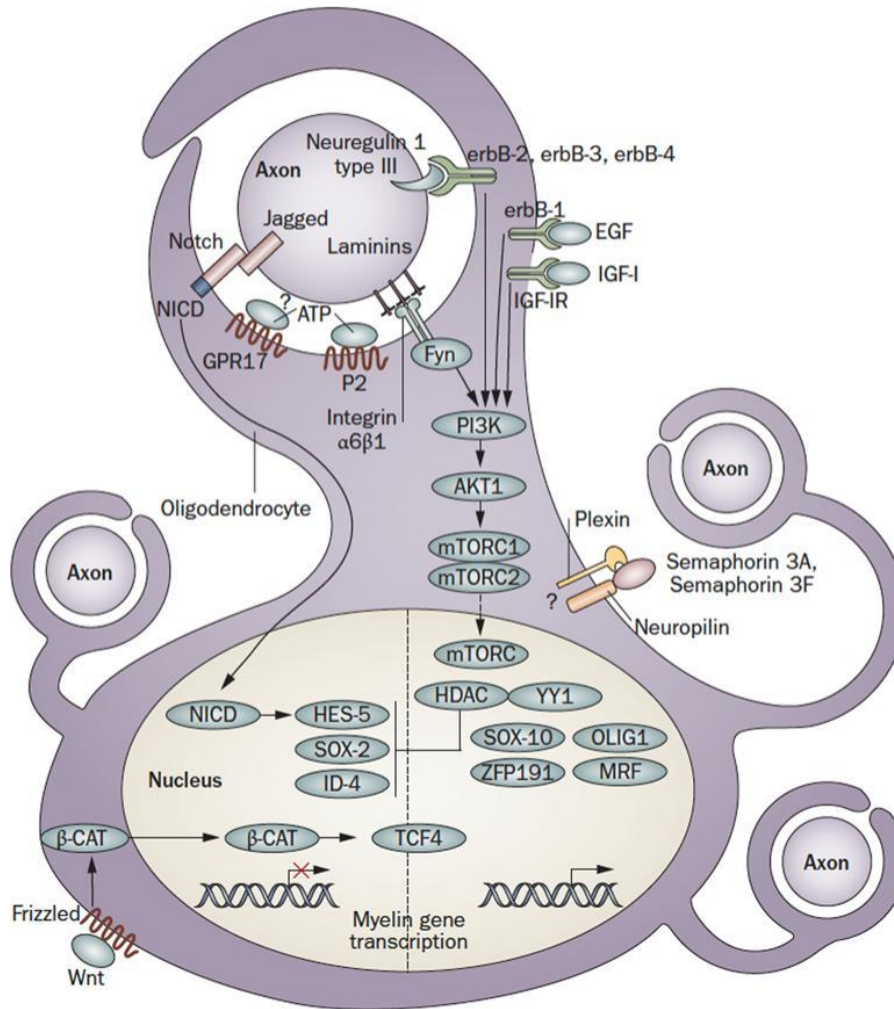


Figura 16. Vías de señalización axón-glía en la mielinización.

Representación esquemática de las principales vías de señalización que regulan el inicio de la mielinización durante el desarrollo del SNC [28].



2.5 Esclerosis Múltiple

Las enfermedades desmielinizantes son aquellas en las que existe un proceso patológico dirigido contra la mielina en zonas localizadas formando placas desmielinizadas o afectando grandes extensiones del sistema nervioso central con consecuencias funcionales graves en los pacientes. En contraposición a ellas, las leucodistrofias son aquellas en las que el origen de la enfermedad es una formación inadecuada de la mielina [42].

La enfermedad desmielinizante más frecuente es la esclerosis múltiple (por sus siglas en español EM), la EM es la principal causa de discapacidad no traumática en adultos jóvenes. Se trata de una enfermedad autoinmune del SNC, crónica, progresiva e incapacitante que afecta a 2.1 millones de personas en el mundo. En México se estima que entre 11 y 20 de cada 100,000 habitantes sufren EM, por lo que existen más de 20,000 personas cuya calidad de vida y capacidad productiva pueden verse seriamente modificadas por la enfermedad [43].

La EM se define como una enfermedad progresiva que cursa con la aparición de lesiones inflamatorias focales (placas), en las que lo más llamativo es la pérdida de mielina (desmielinización) y degeneración axonal en los nervios ópticos, cerebrales y de la medula espinal junto con astrogliosis reactiva y microglia activada, en la que puede existir preservación relativa de los axones en la fase precoz, aunque puede estar muy afectada en las fases finales [40,44,45]. Estas lesiones se presentan con una morfología frecuentemente de tipo redondeado y oval, aunque a menudo presentan formas alargadas (conocidas como dedos de Dawson) que llegan a infiltrar vasos sanguíneos medianos y pequeños [46]. Las lesiones suelen ser múltiples y están distribuidas por todo el SNC, característicamente tienen distribución perivenular y se localizan más frecuentemente en la sustancia blanca periventricular y subpial. Las placas de desmielinización son de dos tipos dependiendo de la actividad de la enfermedad. En las que se



reconoce la lesión aguda, el fenómeno patológico fundamental es la inflamación; por el contrario, la lesión crónica destaca por una desmielinización franca que progresivamente se acompaña de degeneración axonal y de gliosis [45].

Los pacientes con EM tienen axoplasma anormal con un contenido reducido de mitocondrias y de microtubulos con diversos grados de fragmentación de neurofilamentos. Las hipótesis centrales de la degeneración de los axones desmielinizados crónicamente implican un desequilibrio entre la demanda de energía y el suministro de energía [46].

En las fibras mielinizadas normales, los canales de Na^+ se concentran en los nodos de Ranvier, lo que permite la conducción saltatoria de potenciales de acción. La bomba Na^+/K^+ ATPasa, mantiene los gradientes iónicos necesarios para la neurotransmisión y son los mayores consumidores de ATP en el SNC. Se requiere un intercambio iónico dependiente de la energía continua para el mantenimiento de la polarización axonal y apoyar muchas funciones neuronales. Después de la desmielinización, los canales de Na^+ están difusamente redistribuidos a lo largo del axolema desmielinizado. Si el Na^+ axonal se eleva por encima de su concentración nominal, el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ que intercambia el Na^+ axoplásmico por Ca^{++} extracelular, opera de manera inversa. Con el aumento de la actividad eléctrica, Ca^{++} axoplásmico aumentará y eventualmente una respuesta degenerativa se dará inicio. La acumulación excesiva de Ca^{++} axoplásmico conduce a un círculo vicioso de funcionamiento mitocondrial alterada, reducción de la producción de energía y a un transporte axonal comprometido. Debido a la redistribución de los canales de Na^+ y la mayor afluencia resultante de sodio, el consumo de ATP aumenta considerablemente en los axones desmielinizados. Las mitocondrias de los axones desmielinizados es probable que se vean comprometidas y tienen una capacidad reducida para la producción de ATP causada por la disminución de la transcripción nuclear neuronal de genes



mitocondriales codificadas, también la actividad respiratoria mitocondrial del complejo I de la cadena se reduce en lesiones activas crónicas de la EM [46,47].

Los Axones crónicamente desmielinizados que carecen de Na^+/K^+ ATPasa no puede intercambiar iones Na^+ y K^+ , por lo que son incapaces de repolarización del axolema. Estos datos apoyan el concepto de que muchos axones desmielinizados crónicamente no son funcionales antes de la degeneración, por tanto, es probable que sea un contribuyente a la disminución neurológica continua en fases crónicas de la EM [47].

Las dos características fundamentales de la esclerosis múltiple es la diseminación temporal y espacial de los síntomas y signos neurológicos. Los síntomas dependen de las áreas del SNC lesionadas. Un individuo con esta enfermedad experimenta normalmente más de un síntoma pero no todos los individuos presentan todos los síntomas. Éstos incluyen debilidad, hormigueo, alteración de la coordinación, fatiga, problemas de equilibrio, alteraciones visuales, temblor, espasticidad, trastornos del habla, problemas intestinales y/o urinarios, andar inestable (ataxia), problemas en la función sexual, sensibilidad al calor, alteraciones en la memoria a corto plazo y ocasionalmente problemas de juicio o razonamiento (trastornos cognitivos) [48].

Los cuatro subtipos aceptados de la EM son: recurrente y remitente; recaída progresiva; secundaria progresiva; y primaria progresiva.

- EM recurrente-remitente: está presente en el 85% de los pacientes y se define como "recaídas claramente definidas con recuperación completa o con secuelas y el déficit residual tras la recuperación; períodos entre las recaídas caracterizadas por la falta de progresión de la enfermedad".
- EM recurrente progresiva: está presente en 25.5% de los pacientes con esclerosis múltiple y se define como "enfermedad progresiva desde el inicio, con recaídas agudas claras, con o



sin recuperación completa; períodos entre recaídas caracterizadas por la progresión continua".

- EM progresiva secundaria: se desarrolla en el 65-80% de los pacientes previamente afectados por la forma recurrente-remitente, y se define como "curso de la enfermedad recurrente-remitente inicial seguida de progresión con o sin recaídas ocasionales, remisiones de menor importancia".
- EM progresiva primaria: está presente en 15% de los pacientes y se define como "la progresión de la enfermedad desde el inicio con mesetas ocasionales y pequeñas mejoras temporales permitidos" [49].

El mecanismo patogénico más aceptado es que la esclerosis múltiple es el producto de la conjunción de una determinada predisposición genética y un factor ambiental desconocido que, al parecer en un mismo sujeto, originarían un amplio espectro de alteraciones en la respuesta inmunitaria, que a su vez serían las causantes de la inflamación presente en las lesiones de esclerosis múltiple [50]. La predisposición hereditaria, combinada con el factor ambiental desconocido, establece o mantienen células T autorreactivas, que tras un periodo de latencia de 10-20 años serán activadas por un factor sistémico o local (infección viral, puerperio, etc.) mediante un mecanismo de mimetismo molecular (epítomos compartidos por la mielina y los posibles agentes infecciosos) o por una estimulación a través de superantígenos virales o bacterianos. Una vez activadas, estas células T pasan selectivamente la barrera hematoencefálica y al ser expuestas de nuevo a su autoantígeno, inician una reacción inflamatoria tipo Th1 [48], en consecuencia la reacción inmune en el SNC depende de varios factores como: integridad de la barrera hematoencefálica; presencia del autoantígeno; calidad de la célula T cooperadora; presencia de anticuerpos activadores del complemento y persistencia de linfocitos B o células

plasmáticas. Durante la evolución de la enfermedad, se producen cambios en las características inmunitarias de los pacientes, que están relacionados con el cambio de fase clínica [50].

2.5.1 Tratamientos en la Esclerosis Múltiple.

El objetivo de la terapia en los pacientes con EM es el prevenir las recaídas y el empeoramiento progresivo de la enfermedad, el tratamiento consiste en:

- a) Tratamientos farmacológicos con base inmunológica para evitar y retardar la aparición de brotes, administrando inmunosupresores e inmunomoduladores que provocan una inhibición inespecífica del sistema inmune;
- b) El tratamiento sintomático y rehabilitador administrando fármacos de gran efectividad para el manejo de los síntomas, los más frecuentes son los urinarios (urgencia, frecuencia, retención e incontinencia), intestinales (constipación, urgencia, incontinencia), cerebelosos (incoordinación, temblor), cognitivos (dificultad para concentración, memoria y disfunción ejecutiva), motores (debilidad y espasticidad) y sensoriales (pérdida de la sensibilidad, disestesia) así como fatiga, trastornos emocionales (depresión, ansiedad, labilidad emocional), disfunción sexual y pérdida de la visión. Por lo tanto, los tratamientos que combinan efectos inmunomoduladores y neuroprotectores son beneficiosos para la EM [44,45,51,52].

Muchos de los fármacos empleados en el tratamiento de la EM han sido evaluados en modelos animales inducidos a encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) que se considera un buen modelo para la EM [53]. Recientes estudios en modelos EAE han mostrado que el tratamiento diario con inhibidores de fosfodiesterasa 5 (PDE5) previene la progresión de la enfermedad [52]; así como, en investigaciones en cultivo demuestran que la inhibición farmacológica de enzimas fosfodiesterasas 4 (PDE4) promueven la diferenciación de CPO [54].

2.6 Enzimas Fosfodiesterasas

Las fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos (PDE) son enzimas metalohidrolasas que tienen una función importante en las vías de señalización intracelular. Las PDE hidrolizan los nucleótidos cíclicos, AMPc y GMPc a sus correspondientes 5'-nucleótidos monofosfato en presencia de cationes divalentes (Fig. 17)[55,33]. Regulando de este modo la concentración intracelular de estos nucleótidos cíclicos, así como, sus vías de señalización y en consecuencia, innumerables respuestas biológicas en la salud y la enfermedad (Fig. 18) [56].

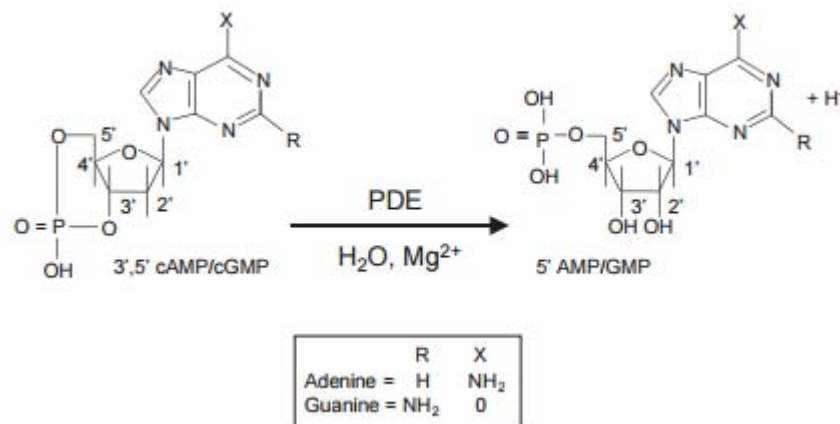


Figura 17. Hidrolisis de los nucleótidos cíclicos por fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos [56].

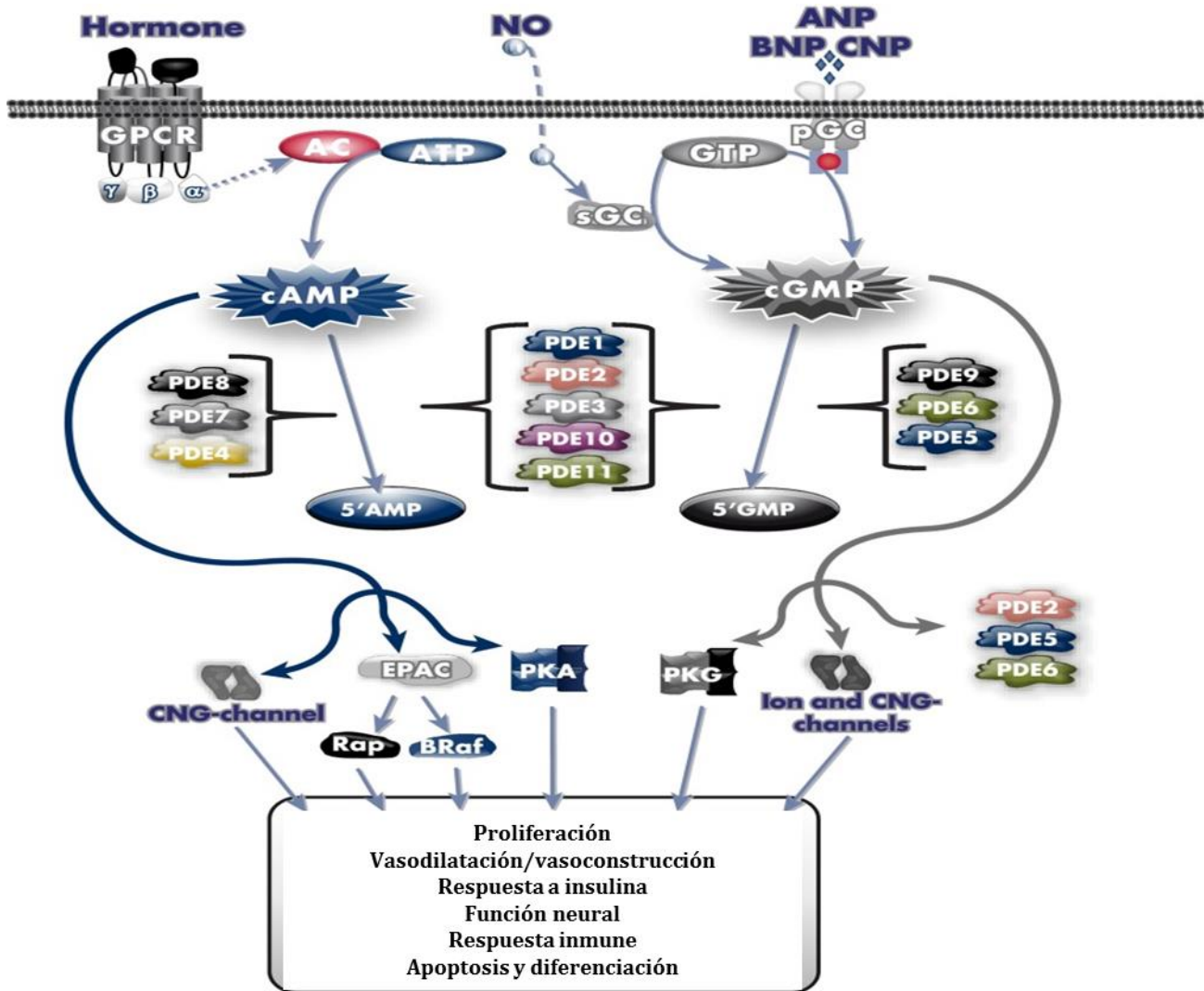


Figura 18. Señalización de nucleótidos cíclicos y regulación.

AC, la adenilato ciclasa; ANP, péptido natriurético atrial; BNP, péptido natriurético tipo B; CNP, péptido natriurético tipo C; B-Raf, B-Raf proteína quinasa; GNC-canal, canal de nucleótido-gated cíclico; PGC, partículas guanilato ciclasa; PKG, GMPc dependiente de la proteína quinasa; Rap, relacionados con la proteína Ras; SAC AC soluble; sGC, guanilato ciclasa soluble [57].



La superfamilia de las PDEs se clasifica en 3 clases:

Clase I.-Incluye a todas las enzimas fosfodiesterasas de mamíferos y de *Drosophila*;

Clase II.-Contiene las enzimas fosfodiesterasas de hongos como *Saccharomyces cerevisiae*;

Clase III.-Únicamente enzimas fosfodiesterasas de células procariotas como *Escherichia coli* [58].

Las PDEs de la clase I se codifican en 21 genes en el genoma humano y son clasificados en 11 familias (PDE1-PDE11), estas familias de enzimas presentan propiedades diferentes, aun así, todas ellas comparten una estructura muy similar que puede dividirse en tres dominios: un extremo amino (NH₂), una región conservada o dominio catalítico y un extremo carboxilo (COOH) (Fig. 19) [33].

La clasificación de las familias PDEs están basadas en determinadas distribuciones tisulares, similitudes estructurales, mecanismos de regulación, secuencia de aminoácidos, dominios proteicos y a propiedades enzimáticas; tales como, especificidad para el sustrato, propiedades cinéticas, a la sensibilidad de reguladores endógenos e inhibidores (Tabla 1) [58,59,60].

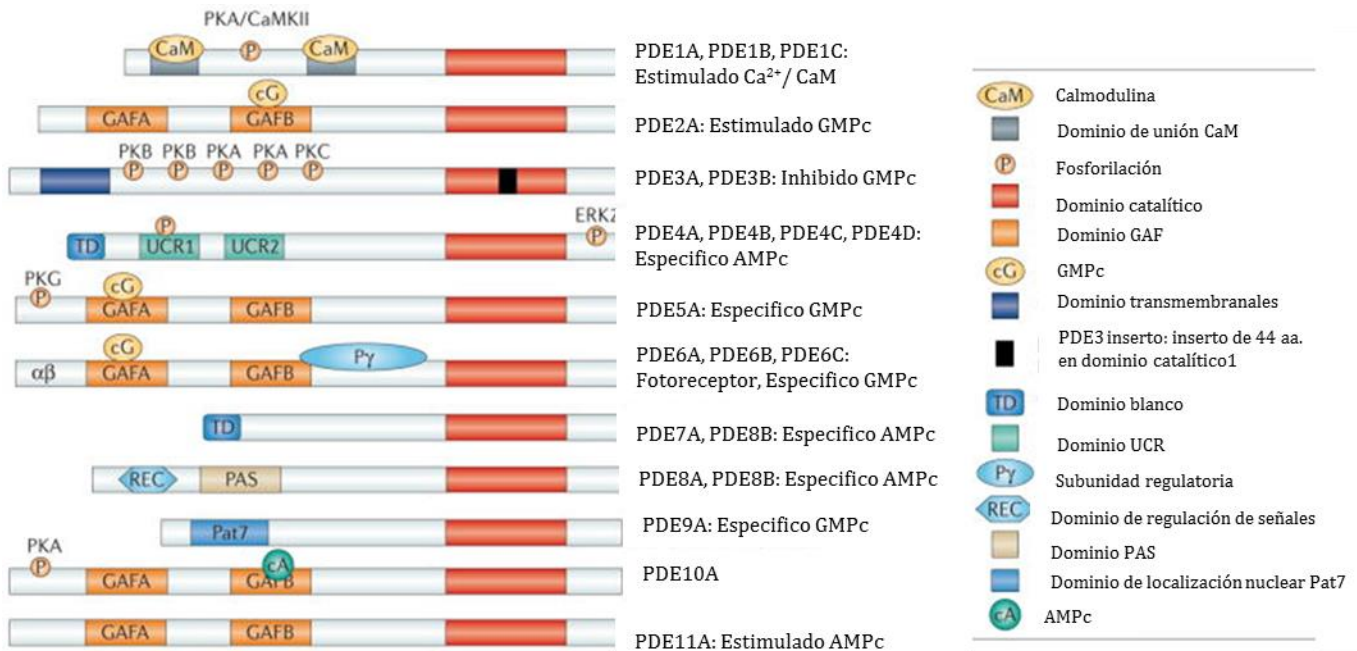


Figura 19. Estructura y organización de dominios de las 11 familias de PDE de mamíferos.

El dominio catalítico conservado (mostrado en rojo) se encuentra en la porción carboxi-terminal de las fosfodiesterasas. El dominio catalítico de la PDE3 contiene un inserto de 44-amino-ácido única (que se muestra en negro). Muchas de las familias de PDE contienen subdominios amino-terminal (tales como dominios GAF, dominios transmembrana, dominios dirigidos, dominios PAS y dominios REC) y regiones hidrofóbicas N-terminales que son importantes en la localización subcelular, en las interacciones con moléculas de señalización y andamios moleculares y en la regulación de la actividad de PDE. Dominios GAF regulan la unión de GMPc (PDE2, PDE5, PDE6 y PDE11), la unión de cAMP (PDE10 y la regulación de la actividad catalítica (PDE2, PDE5 y PDE6). Los sitios de fosforilación están etiquetados en la figura. CaMKII, calcio / calmodulina dependiente de la proteína quinasa II; ERK2, regulada por señal extracelular quinasa 2; PKA, proteína quinasa A; Pat7, señal de localización nuclear 7-residuos [56].



Tabla 1. Clasificación de enzimas fosfodiesterasas de la Clase I.

PDE	Nº ISOFORMAS	SUSTRATO	LOCALIZACIÓN	INHIBIDORES
PDE1	Tres: 1 A, B, C,	AMPc/GMPc	Corazón, cerebro, pulmón, músculo liso.	Nicardipine, vinpocetine, calmidazolium, SCH51866, zaprinast, 8-MMX, IBMX.
PDE2	Una: 2 A	AMPc/GMPc	Glándula suprarrenal, corazón, pulmón, hígado, plaquetas.	EHNA, IBMX
PDE3	Dos: 3 A, B	AMPc/GMPc	Corazón, pulmón, hígado, plaquetas, tejido adiposo, células inflamatorias.	Milrinone, ciclostamide, amrinone, enoximone, SK&F 95654, IBMX
PDE4	Cuatro: 4 A, B, C, D	AMPc	Células de Sertoli, riñón, cerebro, hígado, pulmón, células inflamatorias.	Rolipram, RO 20-1724, cilomilast, roflumilast, BAY 19-8004, zardaverine, CDP840, RS25344, LAS31025, IBMX, AMPc/GMPc
*PDE5	Una: 5 A	GMPc	Pulmón, plaquetas, vasculares, músculo liso.	SILDENAFIL , vardenafil, taldelafil, zaprinast, dipyridamole, SCH 51866, SK&F 96231, WIN 65579, DMPPO, E4021, KF31327, t-1032, T-0156.
*PDE6	Cuatro: 6 A, B, C, D	GMPc	Fotoreceptores.	SILDENAFIL , vardenafil, zaprinast, dipyridamole, DMPPO,
PDE7	Dos: 7 A, B	AMPc	Músculo esquelético, corazón, riñón, cerebro, páncreas, linfocitos T.	dipyridamole, SCH 51866, papaverine, benzothieno.
PDE8	Dos: 8 A, B	AMPc	Testículos, ojo, hígado, músculo esquelético, corazón, riñón, ovario, el cerebro, linfocitos T.	Dipyridamole
*PDE9	Una: 9 A	GMPc	Riñón, hígado, pulmón, cerebro.	SCH 81566, BAY 73-6691
PDE10	Una: 10 A	AMPc/GMPc	Los testículos, cerebro.	Papaverine, TP-10, PQ10, zaprinast, dipyridamole, E4021, SCH 51866, IBMX
PDE11	Una: 11 A	AMPc/GMPc	Músculo esquelético, próstata, riñón, hígado, pituitaria y glándulas salivales, los testículos.	zaprinast, dipyridamole, E4021, SCH 51866, IBMX

Se presentan el Nº de isoformas, la especificidad de sustrato, ubicación en tejido y los inhibidores de las familias de PDEs. * Familias de PDEs en las que el citrato de sildenafil y BAY 73-6691 son inhibidores [55,61].

En este trabajo se investigaron los efectos de Citrato de Sildenafil y de BAY73-6691 en la síntesis de mielina en células oligodendrogiales, por lo que se abordaran solo las familias de las cuales son activas (Tabla 2).

**Tabla 2. Familias de PDEs en la que el citrato de sildenafil y BAY 73-6691 son inhibidores.**

PDE	LOCALIZACIÓN EN EL CEREBRO	ESPECIES
PDE5	Hipocampo, corteza, cerebelo.	Humano, rata, ratón.
PDE6	Fotoreceptores	Humano, rata, ratón.
PDE9	Hipocampo, la corteza, bulbo olfatorio, cuerpo estriado, tálamo, el hipotálamo, la amígdala, el mesencéfalo, cerebelo	Humano, rata, ratón.

Se presenta la localización en el cerebro y especies en la que se encuentran las PDE5, PDE6, PDE9 [55,61].

La familia de las nucleótido cíclico fosfodiesteras-5 (PDE5); fue identificada por primera vez en plaquetas de rata. La PDE5 hidroliza GMPc exclusivamente y es activada por la unión del GMPc a su dominio GAF, por lo que se conoce como la PDE GMPc-activado y GMPc-específica. La PDE5 consta de un solo gen PDE5A, y 3 isoformas PDE5A1, 5A2 y 5A3 [61,62].

La distribución tisular de la PDE5 generalmente coincide con la de la proteína cinasa G (PKG), probablemente porque ambas enzimas son los principales receptores intracelulares de GMPc. Por otra parte, PKG es un excelente catalizador *in vitro* para la fosforilación de la PDE5. La PDE5 se localiza en el citosol con altas concentraciones en el músculo liso, plaquetas, riñón y en algunas zonas del CNS (58).

El GMPc es un regulador fisiológico crucial de la vasodilatación inducida por el óxido nítrico, inhibidores de la PDE5 se pueden utilizar para evitar la destrucción del GMPc y de ese modo mejorar la función eréctil y la hipertensión arterial pulmonar [56]. En particular, los inhibidores PDE5 tienen potencial para otras aplicaciones tales como la mejora de la memoria, la terapia contra el cáncer, y tratamiento de enfermedades del corazón [60].

La familia de las nucleótido cíclico fosfodiesteras-6 (PDE6). Los miembros de la familia PDE6, también conocidos como PDEs fotorreceptoras, hidrolizan específicamente GMPc. Genes localizados en los cromosomas 5q31.2-34, 4p16.3, y 10q24, respectivamente, codifican las tres



subunidades catalíticas de los tres PDE6 isoformas A, B, y C. PDE6A y PDE6B se expresan en los bastones, y PDE6C se expresa en conos. GMPc desempeña una función central en la transducción. En la oscuridad, las concentraciones de GMPc fotorreceptoras son elevados, GMPc abre canales fotorreceptores gated-cGMP (CNGCs), permitiendo afluencia de Ca^{2+} y Na^+ (corriente de oscuridad), que despolariza membranas de células fotorreceptoras. La cascada de activación PDE6 se inicia cuando un fotón de luz es absorbida por varillas o conos fotorreceptores. Inmediatamente, la transducina de la proteína G, activado por intercambio de GDP-GTP, activa PDE6 subunidades catalíticas mediante el desplazamiento de la subunidad inhibidora PDE6 del sitio activo, estimulando así la hidrólisis de GMPc. La disminución de GMPc provoca la desactivación y cierre de las CNGCs fotorreceptoras en la membrana plasmática cercana, lo que resulta en la hiperpolarización de la membrana celular de fotorreceptores, la conversión de la señal luminosa en una señal eléctrica y la iniciación de los procesos de transducción visual [57]. Sin embargo, inhibidores de PDE5 principalmente Sildenafil se asocian a trastornos visuales debido a la actividad contra la PDE6 [61].

La familia de las nucleótido cíclico fosfodiesteras-9 (PDE9). Isoformas PDE9 hidrolizan específicamente GMPc, con la mayor afinidad entre todas las familias de PDE. Veintiún variantes de empalme surgen a partir del gen único PDE9A (cromosoma 21q22.3), a pesar de este alto número de transcritos de ARNm, solamente PDE9A1 y PDE9A6 (llamado originalmente PDE9A5) se han demostrado que se expresa. PDE9A humana se expresa en el bazo, intestino delgado, y el cerebro, la expresión de la proteína PDE9A está altamente conservada entre las especies y se distribuye ampliamente por todo el cerebro de roedores, con la expresión relativa más alta en las neuronas de Purkinje y cerebelo. Poco se sabe acerca de la función de PDE9 en el cerebro (o en cualquier otro lugar). El patrón de expresión PDE9A en cerebro de rata se asemeja mucho a la de



la guanilato ciclasa soluble, lo que sugiere una posible asociación funcional en la regulación de los niveles de GMPc que pueden desempeñar un papel en el comportamiento, la cognición y el aprendizaje, y recientemente, un inhibidor de PDE9A-específica, BAY 73-6691 se demostró para mejorar el aprendizaje y la memoria en roedores [57].

2.7 Inhibidores de Fosfodiesterasas

2.7.1 Sildenafil

Los fármacos inhibidores mejor caracterizados son los de la PDE5 como: vardenafil (Levitra), tadalafil (Cialis) y sildenafil (Viagra).

Citrato de Sildenafil es un polvo blanco cristalino con una solubilidad en agua de 3.5 mg/mL y un peso molecular de 666.7 mg/mol., sildenafil fue sintetizado en la década de los 80. En un principio se estudió su aplicación en hipertensión arterial sistémica y cardiopatía isquémica; posteriormente se demostraron sus efectos sobre la PDE5 a nivel del cuerpo cavernoso con incremento de la función eréctil (63). Así como, en modelos animales con enfermedades neurológicas, como ratas con lesión cerebrovascular embólica, la administración de sildenafil ha mostrado la mejora en la recuperación funcional incluso cuando se administra una semana después de la inducción de la lesión isquémica. Este efecto se asoció con una mejora de la angiogénesis, neurogénesis, sinaptogénesis, remodelación axonal y oligodendrogénesis [52].

En el caso de EAE, el tratamiento con sildenafil después de la aparición de la enfermedad marcadamente reduce los signos clínicos de EAE mediante la prevención de la pérdida axonal, disminuye la infiltración de células T, disminuye la activación microglial y de macrófagos, aumenta la presencia de células T reguladoras en la médula espinal y la promoción de la



remielinización promoviendo la supervivencia de oligodendrocitos. Sugiriendo que el uso de este fármaco puede ser beneficioso para el tratamiento de la EM [52,64].

2.7.2 BAY 73-6691

Es el primer inhibidor potente y selectivo de la fosfodiesterasa 9 (PDE9), que está actualmente en fase de desarrollo preclínico para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Este inhibidor puede tener un uso potencial para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos, como se mencionó anteriormente, para la enfermedad de Alzheimer, al mejorar la memoria a través de la modulación de la ruta NO/GMPc-PKG/CREB. Además, BAY 73-6691 reduce la adhesión de neutrófilos en la enfermedad de células falciformes, lo que sugiere que la inhibición de PDE9 de dichas células puede constituir una estrategia importante para inhibir el proceso de vaso-oclusivo en este trastorno [65,66,67]. Actualmente este inhibidor no se ha utilizado para modelos experimentales de EM.

2.8 Validación de PCR en tiempo real.

2.8.1 Transcripción reversa

El modelo de partida para una reacción de PCR puede ser ADN o ARN. El ADN es por lo general el modelo adecuado para estudiar el genoma de la célula o tejido (como en enfermedades genéticas hereditarias, mutación somática en un tumor, o reordenamiento somática en los linfocitos) y para la detección de virus ADN. Para obtener información sobre la expresión génica en una célula o tejido, o la presencia de ARN genómico en un retrovirus como el VIH, el ARN es el modelo apropiado. El ARN puede ser mejor que el ADN genómico para la detección de cambios estructurales en genes largos, ya que la amplificación de la transcripción empalmada de ARN en lugar de la secuencia genómica reduce en gran medida la longitud del ADN, sin perder ninguna de las regiones codificantes donde clínicamente pueden esperarse supresiones significativas.

La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) combina la síntesis de ADNc a partir de modelos de ARN con PCR para proporcionar un método rápido, sensible para el análisis de la expresión de genes (Fig. 20) [68].

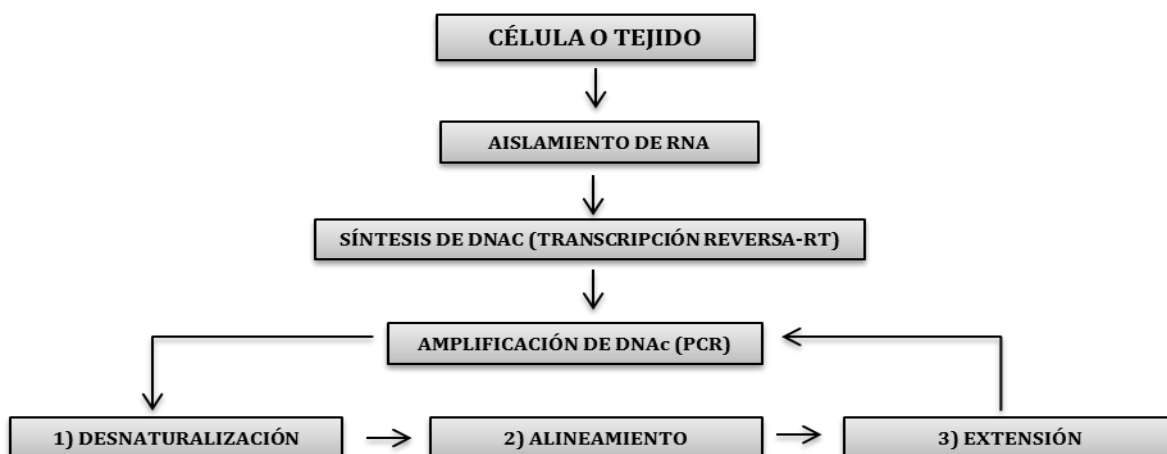


Figura 20. Diagrama esquemático de la PCR en Tiempo Real [68].



La RT-PCR se utiliza para detectar o cuantificar la expresión de RNAm, a menudo de una pequeña concentración. El modelo para RT-PCR puede ser ARN total o poli (A) + RNA seleccionado. Reacciones de RT pueden ser con cebadores aleatorios, oligo (dT) o un cebador específico de gen (GSP) utilizando una transcriptasa inversa. La RT-PCR puede llevarse a cabo bien en formatos de dos pasos o de un paso. En dos etapas RT-PCR, cada paso se realiza en condiciones óptimas, la síntesis de ADNc se realiza primero en buffer de RT y una décima fracción de la reacción se elimina por PCR. En un solo paso RT-PCR y PCR tienen lugar secuencialmente en un solo tubo en condiciones optimizadas tanto para RT y PCR [68].

2.8.2 RNA como material de inicio

PCR de transcripción inversa cuantitativa (RT-PCR tiempo real) se utiliza cuando el material de partida es ARN. En este método, el ARN se transcribe primero en ADN complementario (ADNc) por transcriptasa inversa a partir de ARN total o ARN mensajero. El ADNc se usa entonces como modelo para la reacción de PCR en tiempo real. RT-PCR tiempo real se utiliza en una variedad de aplicaciones, incluyendo análisis de expresión génica, validación de RNAi, validación de micro arreglos, detección de patógenos, pruebas genéticas y en la investigación de enfermedades [69].

2.8.3 Un paso vs dos pasos de RT-PCR tiempo real

RT-PCR tiempo real se puede realizar en un solo paso o un ensayo de dos etapas (Figura 21). Ensayos de un solo paso combinan transcripción inversa y PCR en un único tubo y buffer, utilizando una transcriptasa inversa junto con una ADN polimerasa. Un paso RT-PCR tiempo real solamente utiliza cebadores específicos de secuencia. En los ensayos de dos pasos, la

transcripción inversa y de PCR tiempo real, se llevan a cabo en tubos separados, con diferentes buffers optimizados, condiciones de reacción, y de estrategias de cebado [69].

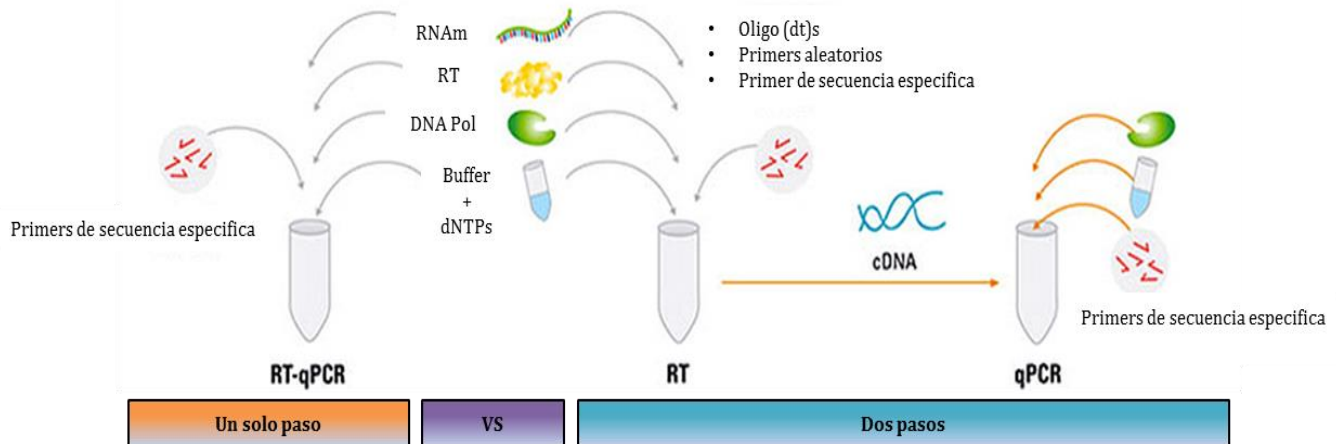


Figura 21. Ensayos de PCR [69].

2.8.4 La elección de ARN total vs. ARNm

En el diseño de un ensayo de RT-PCR tiempo real es importante para decidir si utilizar RNA total o RNAm purificado como modelo para la transcripción inversa. El RNAm puede proporcionar un poco más de sensibilidad, pero RNA total se utiliza a menudo porque tiene ventajas importantes sobre RNAm como material de inicio. En primer lugar, se requieren menos etapas de purificación, lo que garantiza una recuperación más cuantitativa del modelo y una mejor capacidad de normalizar los resultados para el número inicial de células. En segundo lugar, evitando cualquier paso de enriquecimiento de RNAm, se evita la posibilidad de resultados sesgados debido a diferentes rendimientos de recuperación para diferentes RNAm. Tomados en conjunto, el ARN total es más conveniente para utilizar en la mayoría de los casos desde la cuantificación relativa de los blancos y más importante para la mayoría de aplicaciones que la sensibilidad absoluta de detección [69].

2.8.5 Los cebadores para la transcripción inversa

Tres enfoques diferentes pueden ser utilizados para cebar las reacciones de ADNc en ensayos de dos pasos: cebadores oligo (dT), cebadores aleatorios, o cebadores específicos de secuencia (Fig. 22). A menudo, se utiliza una mezcla de oligo (dT) y cebadores aleatorios. Estos cebadores hibridan a la cadena de ARNm y proporcionan a la enzima transcriptasa inversa un punto de partida para la síntesis [69].

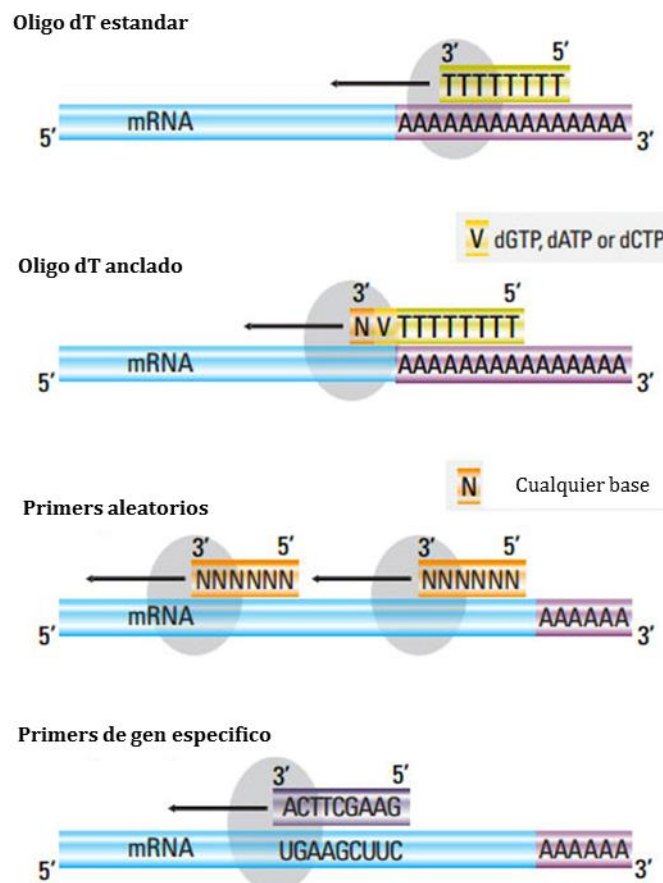


Figura 22. Cuatro métodos diferentes para la etapa de cebado de transcripción inversa en los ensayos de dos pasos de RT-PCR tiempo real [69].



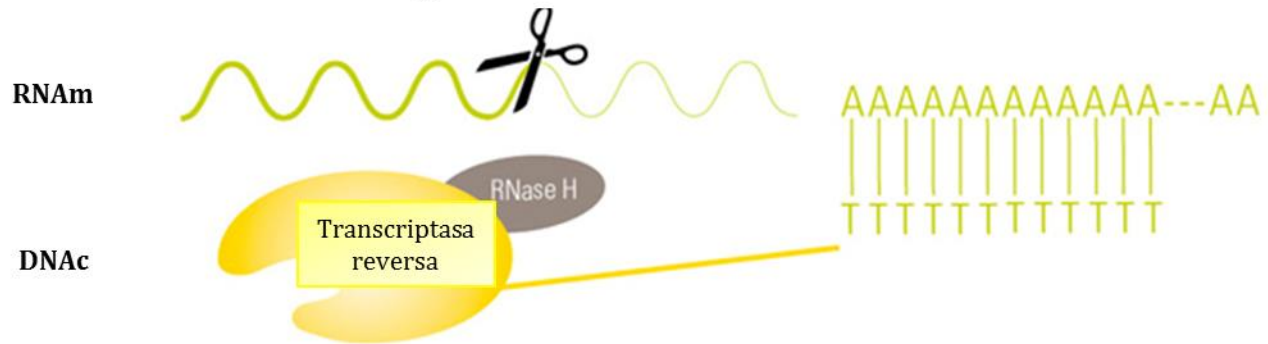
2.8.6 Las enzimas de la transcriptasa reversa

La transcriptasa inversa es la enzima que sintetiza ADNc a partir de ARN. Algunas enzimas tienen actividad de RNAsa para degradar la cadena de ARN en el híbrido ADN-ARN después de la transcripción. Si una enzima no posee actividad RNAsa, un inhibidor de RNAsa se puede añadir para mejorar la eficiencia de la PCR tiempo real. Enzimas usadas comúnmente incluyen a la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina y a la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar. Para RT-PCR tiempo real, es ideal elegir una transcriptasa inversa con alta estabilidad térmica, ya que esto permite la síntesis de ADNc que se lleva a cabo a temperaturas más altas, lo que garantiza el éxito en la transcripción de ARN con altos niveles de la estructura secundaria, y manteniendo su actividad completa durante toda la reacción produciendo rendimientos más altos de ADNc [69].

2.8.7 Actividad del inhibidor de RNAsa sobre la transcriptasa inversa

El inhibidor de RNAsa degrada el ARN del dúplex ARN-ADN para permitir la síntesis eficiente de ADN de doble cadena. Sin embargo, con los modelos de ARNm largos, el ARN puede degradarse prematuramente generando ADNc truncado. Por lo tanto, es generalmente beneficiosa minimizar la actividad del inhibidor de RNAsa cuando se pretende producir transcripciones largas para la síntesis de ADNc. En contraste, transcriptasas inversas con la actividad del inhibidor de RNAsa suelen ser más favorecidos en aplicaciones de PCR tiempo real porque aumentan la fusión del dúplex ARN-ADN durante los primeros ciclos de PCR (Fig. 23) [69].

La actividad de la RNasa H degrada al RNAm causando DNAc truncado.



Inactivación de la actividad de la RNasa H resulta en un incremento del rendimiento sobre productos de DNAc de cadena larga.

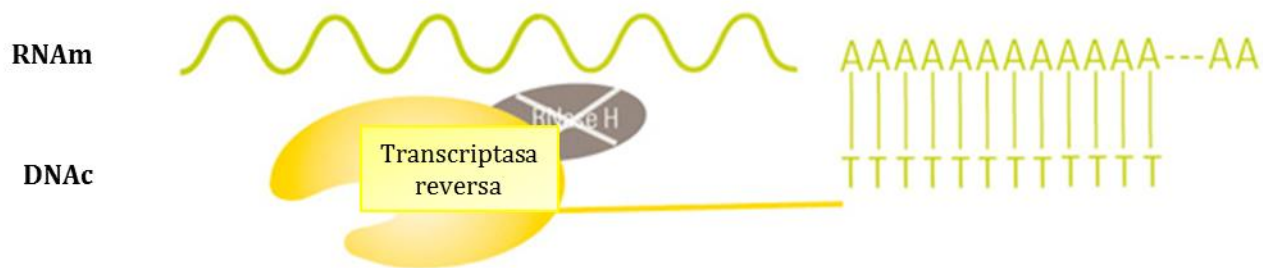


Figura 23. Actividad del inhibidor de RNasa sobre transcriptasas inversas [69].

2.8.8 Diseño Primer

Los cebadores para la etapa de PCR tiempo real de la RT-PCR tiempo real, idealmente deben ser diseñados para abarcar una junta exón-exón (Fig. 24). Este diseño reduce el riesgo de falsos positivos de la amplificación de cualquier contaminación de ADN genómico, ya que la secuencia de ADN genómico que contiene intrón no se amplifica. Si los cebadores no pueden ser diseñados para separar los exones o límites exón-exón, es necesario tratar la muestra de ARN con RNasa libre de DNasa I o de dsDNasa el fin de eliminar la contaminación de ADN genómico [69].

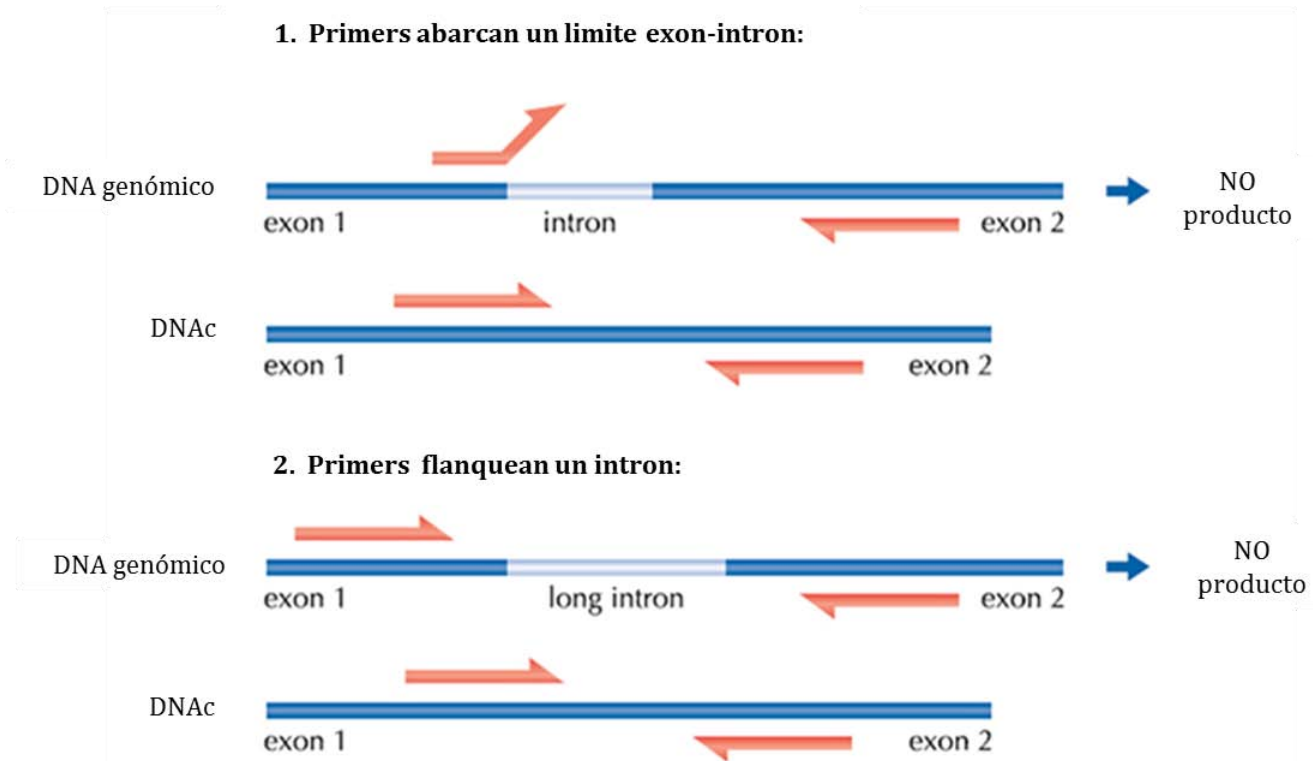


Figura 24. Diseño del primer para el paso PCR tiempo real de RT-PCR tiempo real.

1) Si un cebador está diseñado para abarcar un límite de exón-intrón, la posible contaminación de ADN genómico no se amplifica, debido a que el cebador no puede hibridarse al modelo. En contraste, el ADNc no contiene intrones, se ceba y se amplifica eficientemente. 2) Cuando los cebadores flanquean un largo intrón (ejemplo 1 kb), la amplificación no puede producirse porque el tiempo de extensión es corta, suficiente para una secuencia de ADNc corta, pero no para un blanco genómico largo [69].

2.8.9 Controles para RT-PCR tiempo real

Un control de la transcripción inversa (control -RT) debe ser incluida en todos los experimentos de RT-PCR tiempo real, para la prueba de contaminación de ADN (ADN genómico o de producto de PCR a partir de una ejecución anterior). Un control contiene todos los componentes de reacción a excepción de la transcriptasa inversa. La transcripción inversa no se debería producir en este control, así que si se ve la amplificación por PCR, es más probable que deriva de la contaminación de ADN [69].



2.8.10 Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés) es un método utilizado para amplificar regiones génicas específicas. En esta técnica de PCR se requieren los siguientes componentes: templado (DNA), primers o cebadores (continua y reversa), buffer, Mg^{2+} , Deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) y DNA polimerasa (Taq). La reacción de PCR se realiza en un termociclador y consta de tres etapas: 1) **Desnaturalización** del templado a 95 °C; 2) **Alineamiento** de los primers sobre el templado a 60 °C; y 3) **Extensión** de la nueva cadena, generando un nuevo amplicón a 72 °C. La PCR en tiempo real (PCR-RT) utiliza los mismos componentes que una PCR convencional solo que se agrega fluorescencia a cada reacción antes de la amplificación, permitiendo monitorear ciclo a ciclo el producto de PCR mediante cambios de la señal de fluorescente generada durante las tres etapas de PCR. Actualmente los agentes reporteros más comunes, utilizados para ensayos de PCR-RT son: 1) SYBR Green y 2) Sondas TaqMan [70].

SYBR Green es un intercalante de bases que se une al surco menor de DNA. Al intercalarse y ser excitado mediante una fuente luminosa, genera una señal fluorescente que es detectada por el sistema óptico del equipo de PCR-TR. Así, el aumento de la señal fluorescente es proporcional al amplicón. SYBR Green es una molécula que se une a cualquier DNA de doble cadena, por lo tanto puede considerarse que tiene una unión inespecífica, al trabajar con SYBR Green es importante realizar un proceso de validación (Fig. 25).

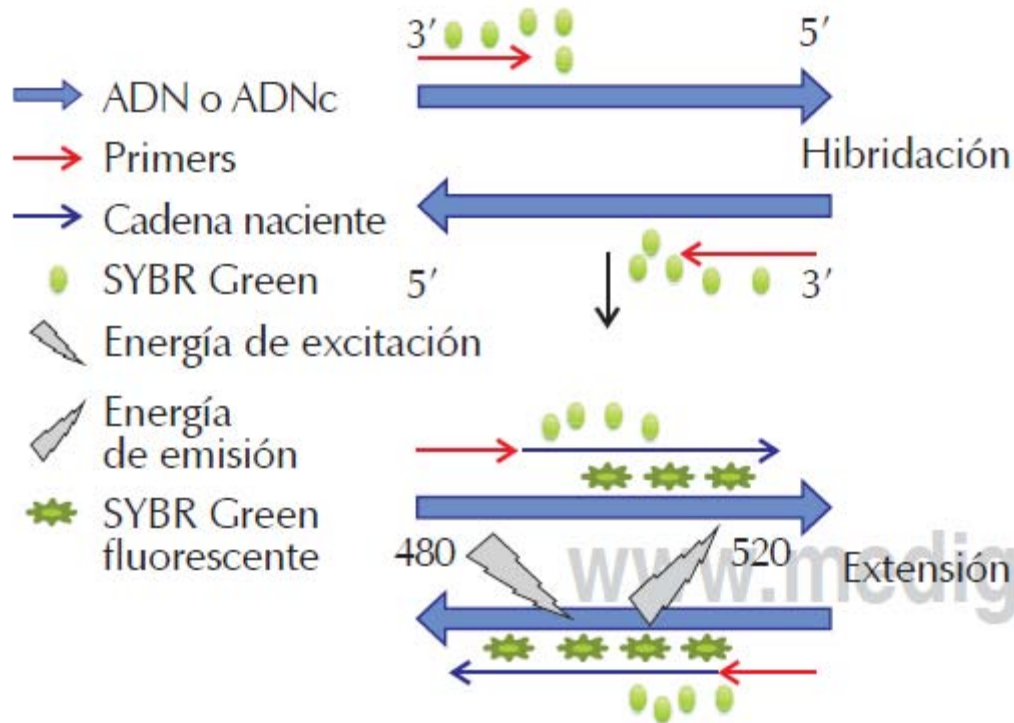


Figura 25. Método no específico de unión de SYBR Green.

Cuando el SYBR Green está unido al ADN de doble cadena, es excitado a una longitud de onda de 480 nm, mientras que la longitud de onda de emisión corresponde a 520 nm [71].

La PCR cuantitativa en tiempo real basada en fluorescencia por su capacidad para detectar y medir diminutas cantidades de ácidos nucleicos en una amplia gama de muestras de numerosas fuentes, es la tecnología que permite por excelencia el diagnóstico molecular en ciencias de la vida, la agricultura y la medicina. Además de su uso como una herramienta de investigación, muchas aplicaciones de diagnóstico se han desarrollado, incluyendo cuantificación microbiana, la determinación de la dosis génica, identificación de transgenes en los alimentos modificados genéticamente, la evaluación del riesgo de recurrencia del cáncer, y aplicaciones para el uso forense. Esta popularidad se refleja en el prodigioso número de publicaciones que reportan datos



de PCR tiempo real, en los que se utilizan invariablemente diversos reactivos, protocolos, análisis, métodos y formatos de presentación en los informes. Esta notable falta de consenso sobre la mejor manera de llevar a cabo experimentos de PCR en tiempo real tiene la consecuencia adversa de perpetuar una serie de graves deficiencias que agravan su estatus como un criterio independiente. Las deficiencias técnicas que afectan el rendimiento del ensayo incluyen lo siguiente: (a) el almacenamiento de muestras inadecuadas, la preparación, y la calidad del ácido nucleico, produciendo resultados variables; (B) mala elección de cebadores, de sondas para la PCR, que conducen a ineficientes y menos robusto rendimiento del ensayo; y (c) los datos inapropiados y análisis estadísticos, producen resultados que pueden ser muy engañosos. En consecuencia, existe el peligro real de la literatura científica siendo corrompido con una multitud de publicaciones que informaran resultados insuficientes y contradictorios.

Se debe recordar que la detección de la presencia de un RNAm no proporciona ninguna información sobre si el RNAm se traduce en una proteína o, de hecho, si una proteína funcional se traduce en absoluto. Otros métodos de cuantificación de proteínas no son siempre capaces de corroborar los datos cuantitativos de RNAm celular. Está bien establecido que existe con frecuencia una falta de concordancia de datos entre expresión de RNAm y concentración de proteínas, que es particularmente cierto para el RNAm que especifica para las proteínas que forman parte de complejos proteicos multifunción. Finalmente, el conocimiento de la presencia y función de micro RNAs específicos es importante para la comprensión de la expresión génica. También es necesario ser conscientes de que los datos de cuantificación de RNA no son absolutos, sino relativos. Por lo tanto, los genes de referencia o materiales utilizados para la normalización son críticos, y cualquier evaluación de la validez de un experimento en PCR tiempo real también debe considerar la conveniencia de la cuantificación relativa.



Gran parte de la varianza en los valores de expresión reportados en los experimentos de PCR tiempo real, no es simplemente debido a la variación en los protocolos experimentales, también es causado por las correcciones aplicadas por diversos tratamientos de los datos algorítmicos, cada uno de lo que hace su propio supuesto sobre los datos. En consecuencia, aunque la PCR en tiempo real con frecuencia se ha proclamado una "técnica estándar de oro", en la práctica esta "técnica" es una variable y el informe de los resultados requiere una considerable sofisticación de análisis e interpretación [70,71].

2.8.11 Eficiencia de PCR cuantitativa

Los ensayos de PCR tiempo real por lo general se correlacionan con una alta eficiencia de PCR. La eficiencia PCR es particularmente importante cuando se presentan informes de concentraciones de RNAm para los genes blancos en relación con los de genes de referencia. El método $\Delta\Delta C_T$ es uno de los métodos populares para determinar diferencias en las concentraciones entre las muestras y se basa en una comparación cuantitativa de una secuencia blanco, normalizada con un referencia interna y comparada con un calibrador. La diferencia de los valores C_T (ΔC_T) entre el gen blanco y el gen de referencia se calcula, y el valor C_T de las diferentes muestras se compara directamente. Los 2 genes deben estar amplificados con eficiencias similares para que puedan ser comparables. La eficiencia de amplificación de PCR se debe establecer por medio de curvas de calibración, porque tal calibración proporciona una indicación simple, rápida y reproducible de la eficiencia media de PCR, la sensibilidad analítica, y la robustez del ensayo. La eficiencia de amplificación debe determinarse a partir de la pendiente log-lineal de la curva de calibración. Específicamente, el logaritmo de la concentración de la plantilla inicial (la variable independiente) se traza en el eje X y los valores C_T (la variable dependiente) se traza en el eje Y.



El máximo teórico de 1,00 (o 100%) indica que la cantidad de producto se duplica con cada ciclo. Las curvas de calibración para cada objetivo cuantificado deberán incluirse con el manuscrito presentado para que esta información se ponga a disposición de los evaluadores. Diferencias en la eficiencia de PCR producirá curvas de calibración con diferentes pendientes. Como consecuencia, las diferencias entre los valores C_T de los objetivos y las referencias no permanecerán constantes y los cálculos de concentraciones relativas serán inexactos, produciendo resultados engañosos. La validación corrobora que solo un producto de amplificación se está generando en la reacción y que la fluorescencia registrada corresponde a ese producto en particular y no a productos inespecíficos o dímeros de cebadores (ensayo de disociación), así como, comprobar que la eficiencia de amplificación de ambos genes (endógeno y blancos) sean los mismos y cercanos al 100% [71,72,73].

2.8.12 Rango dinámico lineal.

El rango dinámico de una reacción es lineal (del más alto al más bajo, del número de copias cuantificables establecido por medio de una curva de calibración) debe ser descrito. Dependiendo de la plantilla utilizada para generar curvas de calibración, el rango dinámico debe cubrir por lo menos 3 órdenes de magnitud e idealmente debe extenderse de 5 o 6 concentraciones a \log_{10} . Los coeficientes de correlación (valores de r^2) deben ser reportados [72].

2.8.13 Normalización.

La normalización es un componente esencial para un fiable ensayo de PCR-RT porque este proceso controla las variaciones en el rendimiento de la extracción, el rendimiento de la transcripción inversa y la eficiencia de amplificación, permitiendo así la comparación de las



concentraciones de RNAm a través de diferentes muestras. El uso de genes de referencia como controles internos es el método más común para la normalización de datos de RNAm celulares; sin embargo, aunque el uso de genes de referencia es comúnmente aceptado como la estrategia de normalización más apropiada, su utilidad debe ser validada experimentalmente para los tejidos o tipos de células en particular y específica para los diseños experimentales. Desafortunadamente, aunque existe una mayor conciencia de la importancia de la validación sistemática, la utilización inapropiada de genes de referencia para la normalización causa efectos potencialmente muy engañosos, estas consideraciones están siendo ampliamente ignoradas. En consecuencia, muchos análisis moleculares de PCR-RT aún contienen datos que están mal normalizados. La normalización implica la presentación de informes de las concentraciones de RNAm de los genes de interés con los genes de referencia. El RNAm de genes de referencia debe ser expresado de forma estable, y sus abundancias deben mostrar fuerte correlación con las cantidades totales de RNAm presente en las muestras. La normalización en contra de un gen de referencia individual no es aceptable a menos que los investigadores presenten pruebas claras para los revisores que confirma que su expresión es invariante bajo las condiciones experimentales descritas. El número óptimo y la elección de los genes de referencia debe ser determinado experimentalmente y el método reportado [72,73].

2.8.14 Curvas de validación

La validación se representa con tres tipos de Figuras:

1. **Curva de disociación o curva Melt:** En éste la temperatura se incrementa gradualmente hasta 95 °C, registrando la intensidad de fluorescencia durante el proceso. Al incrementar la temperatura, las cadenas de DNA se desnaturalizan, disminuyendo la intensidad de

fluorescencia, al llegar a la T_m del amplicón, la velocidad de disociación se incrementa dado que el 50% del producto de amplificación se encuentra desnaturalizado, la curva de disociación presentara un punto de inflexión a esta temperatura [70,71] (Fig. 26).

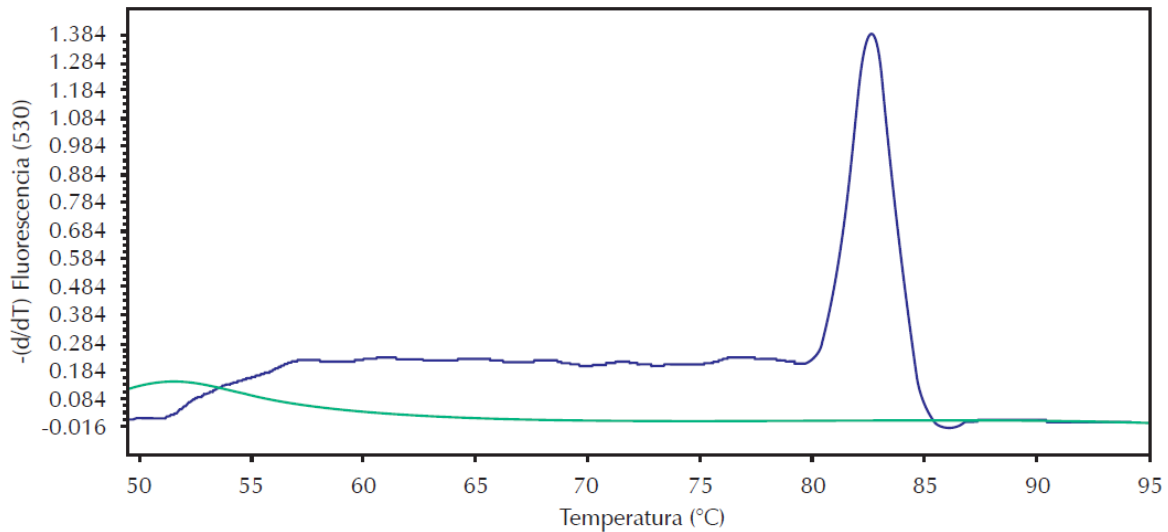


Figura 26. Curva de disociación o curva Melt.

Se puede observar un único pico de amplificación, que indica la especificidad de la reacción, la línea de abajó corresponde al control negativo, el cual no amplificó [71].

2. **Curva de Amplificación:** Muestra el curso, progreso de la reacción y determina el ciclo en el cual cada muestra consigue llegar al umbral de detección " C_T ". De esta forma, el C_T es un valor fraccional que indica cuantos ciclos le tomo a cada muestra generar la cantidad suficiente de fluorescencia para llegar al umbral de detección. Entre más concentrada este la dilución menor será su valor C_T [70] (Fig. 27).

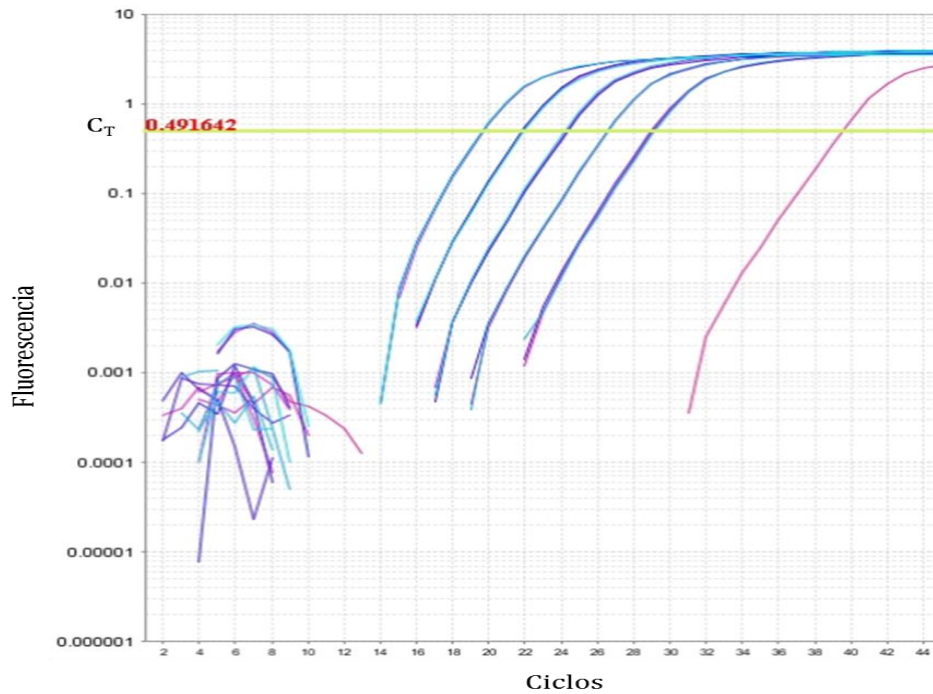


Figura 27. Curva de amplificación de PCR en tiempo real.

La amplificación se detecta en cada ciclo de la reacción, midiendo el incremento de la fluorescencia que es proporcional al aumento de ADN [71].

3. **Grafica de curva estándar:** Esta curva estándar se representa como la regresión del valor C_T contra el logaritmo del factor de dilución empleado en ese punto (Fig. 28). Donde la pendiente que resulta de esta grafica es la que se toma en cuenta para estimar la eficiencia de amplificación [70].

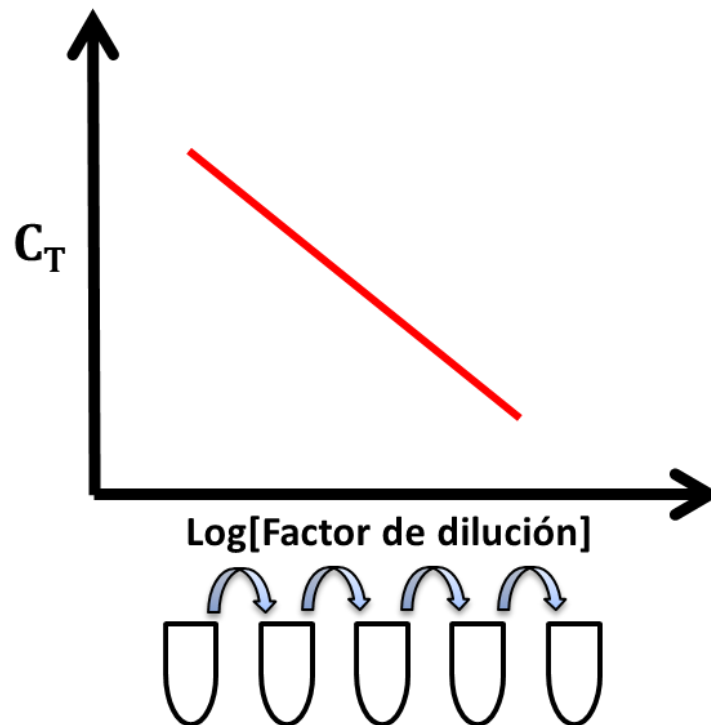


Figura 28. Esquema de la curva estándar.

En el eje de la X se grafica el logaritmo del factor de dilución, en el eje de la Y es el valor C_T resultante en la amplificación de cada uno de ellos.

Un valor de pendiente de -3.32 equivale a una reacción del 100% donde la cinética de amplificación tiene un comportamiento 2^n , a partir de una molécula de DNA se generan 2 moléculas de DNA. Mientras que pendientes más negativas (ej. -3.9) indican una eficiencia menor al 100% lo que podría deberse a la presencia de un inhibidor; por otro lado, pendientes más positivas (ej. -2.5) puede atribuirse a la calidad de muestra o problemas de pipeteo. La fórmula por la cual se puede calcular la eficiencia de la reacción es: $E = (10^{-1/\text{pendiente}} - 1) \times 100$. Para validar la reacción, la eficiencia aceptable debe ser 90-110% para métodos de PCR cuantitativos, y la correlación debe ser $r^2 > 0.98$. Además, la curva debe incluir al menos 5 puntos de dilución [70].



3 JUSTIFICACIÓN

La esclerosis múltiple es una enfermedad autoinmune del sistema nervioso central; ocasionando incapacidad, de avance progresivo y usualmente mortal. Actualmente los tratamientos para la EM se enfocan en administrar agentes inmunomoduladores y sintomáticos que aunque parezcan beneficiosos no reparan las zonas desmielinizadas, ni la progresión de la enfermedad. El interés farmacéutico en las enzimas fosfodiesterasas se ha vuelto importante, debido a su relevante función en la regulación de los segundos mensajeros y así en las diferentes vías de señalización que promueven la remielinización. Por lo que el uso y la evaluación de inhibidores de enzimas fosfodiesterasas, resulta novedoso para el desarrollo de estrategias en busca de nuevos tratamientos para la EM. Recientemente en modelos de EAE, el tratamiento diario con sildenafil aminora los síntomas clínicos y neuropatología, regulando la infiltración de células inflamatorias y aumentando el número de axones remielinizantes. Sin embargo, en modelos experimentales *in vitro*, no se ha mostrado que los inhibidores de fosfodiesterasas promuevan la síntesis de mielina. Por lo que en este presente estudio se evaluaron los efectos de sildenafil, inhibidor de la PDE5 probado en modelos de EAE; así como BAY 73-6691 el primer inhibidor selectivo de PDE9, sobre la expresión de genes y proteínas de mielina en células oligodendrogiales.



4 HIPÓTESIS

Los inhibidores de enzimas fosfodiesterasas sildenafil y BAY 73-6691 inducen la expresión de los genes y la síntesis de proteínas de mielina CNPasa, MBP y MOG en células oligodendrogiales de rata.



5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar si los inhibidores de enzimas fosfodiesterasas sildenafil y BAY 73-6691 inducen la síntesis de mielina en células oligodendrogliales de rata.

5.2 Objetivos Particulares

- 1) Elaborar curvas de dosis-respuesta de sildenafil y de BAY 73-6691, para determinar las concentraciones no letales.
- 2) Estimular células precursoras oligodendrogliales con sildenafil y, BAY 73-6691.
- 3) Realizar la validación de la técnica de cuantificación de genes por PCR tiempo real.
- 4) Cuantificar por PCR tiempo real los genes de mielina CNPasa, MBP y MOG.
- 5) Cuantificar por PCR en tiempo real los genes reguladores Hes1, Hes5, Rock2, Id2 e Id4.
- 6) Realizar la cuantificación relativa de proteínas de mielina CNPasa y MBP mediante inmunofluorescencia indirecta.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Metodo de obtención y purificación de células precursoras oligodendrogliales.

Las ratas neonatas (3-5 días) Wistar fueron anestesiadas con Isoflurano y desinfectadas con etanol al 70%. Las ratas se decapitaron, el cerebro se extrajo asépticamente y se colocó en una caja petri. Los lóbulos del cerebro fueron separados y se removieron las meninges; los lóbulos del cerebro se cortaron en pequeños pedazos y se colocaron en medio de cultivo DMEM. El tejido obtenido fue centrifugado a 2,000 rpm por 1 min, se decantó el sobrenadante, se realizó un proceso de digestión con enzima papaína y se dejó en incubación por 45 min a 37 °C. El proceso fue detenido agregando una solución con inhibidor de tripsina y se dejó en incubación por 4 min a 37 °C. Cuidadosamente el sobrenadante se removió, se hizo un lavado con medio de cultivo y fue centrifugado a 1,200 rpm por 10 min. El sobrenadante fue eliminado, se resuspendió el pellet con medio DMEN y se cultivó en frascos T-75. El cultivo se dejó en incubación a 37 °C con 5% de CO₂ y se realizaron cambios de medio dos veces por semana durante 15-16 días. Transcurridos los días, las células precursoras de oligodendrocitos se purificaron de la siguiente manera: *Primer día.*- Se agitaron los frascos de cultivo a 180 rpm por 2 hrs. a 37 °C y se hizo un cambio de medio de cultivo. Nuevamente se dejó en agitación a 180 a 37 °C toda la noche para separar la microglia y oligodendroglia de la capa de astrocitos. Los pozos de la placa de cultivo se bloquearon con Poli-D-lisina (PDL) con una concentración de 0.5 mg/ml en PBS, se adicionaron 0.4 ml por cada pozo de la placa de cultivo y se dejaron en incubación toda la noche a 4 °C. Cuando se requirió de ensayos de inmuno-tinción se colocaron cubreobjetos de 150 mm de diámetro dentro de los pozos antes de bloquear con PDL. *Segundo día.*- Se colectó el sobrenadante de los frascos de cultivo y se colocó en un caja Petri de polietileno, la cual se dejó en incubación por 30 min (37 °C,



5% CO₂). Se tomó el sobrenadante de las cajas petri, se centrifugo por 10 minutos a 1,500 rpm, el sobrenadante fue eliminado y se resuspendió el pellet en 1 ml de medio Sato. Las células fueron contadas en una cámara de Neubauer y se adicionaron 30,000 células por pozo.

6.2 Tratamiento con inhibidores de fosfodiesterasas.

6.2.1 BAY 73-6691

Para determinar la dosis óptima de **BAY 73-6691** sobre las células oligodendrogiales, el fármaco BAY 73-6691 fue diluido en etanol absoluto, teniendo una solución stock de 10 mM. Se realizaron diluciones seriadas de 100 µM, 10 µM, 1 µM, 0.1 µM y de 0.01 µM., para efectuar un curso temporal de diez días de dosis respuesta en células oligodendrogiales, definiendo como grupo control al vehículo etanol.

6.2.2 Sildenafil

Para determinar la dosis del **Citrato de sildenafil** sobre las células oligodendrogiales, el fármaco sildenafil fue diluido en etanol absoluto, teniendo una solución stock de 5 mM. Se hicieron diluciones seriadas de 100 µM, 10 µM, 1 µM, 0.1 µM y de 0.01 µM., para efectuar un curso temporal de diez días de dosis respuesta en células oligodendrogiales, definiendo como grupo control al vehículo etanol.

6.3 Metodo de extracción y purificación de RNA.

La extracción y purificación de RNA se realizó utilizando reactivos y columnas de silica-gel de RNeasy Mini Kit QIAGEN. Los oligodendrocitos fueron lisados de manera directa con solución buffer RLT más β-mercaptoetanol, agregando 350 µL de buffer RLT por cada pozo de la placa de cultivo. El lisado celular fue colectado y transferido a la columna de afinidad (RNeasy Mini Spin



Columns). El lisado celular se centrifugó a 14,000 rpm por 2 minutos para eliminar los detritos celulares, la columna se descartó y al sobrenadante se le adicionó 350 μ L de etanol al 70% obteniendo un volumen de 700 μ L, el cual fue transferido a la columna (QIAshredder Spin Columns). Los 700 μ L del sobrenadante fueron centrifugados a 10,000 rpm por 2 minutos, el sobrenadante se descartó y a la columna fueron adicionados 350 μ L de solución buffer RWI. La columna fue centrifugada a 10,000 rpm por 2 minutos, el sobrenadante fue descartado y se adicionaron 80 μ L de la mezcla de DNAsa (70 μ L RDA más 10 μ L DNAsa) dejando en incubación durante 15 minutos a T° ambiente. Transcurrido el tiempo se adicionaron 350 μ L de buffer RWI, la columna fue centrifugada a 10,000 rpm por 2 minutos y el sobrenadante fue eliminado. Posteriormente, a la columna se le adicionaron 500 μ L de buffer RPE, centrifugada a 10,000 rpm por 2 minutos y eliminado el sobrenadante resultante. A la columna fueron adicionados nuevamente 500 μ L de buffer RPE, centrifugada a 10,000 rpm por 2 minutos y el sobrenadante resultante fue eliminado. La columna se secó por centrifugación a 14,000 rpm por 2 minutos y traspasada a un tubo eppendorf de 1.5 ml nuevo, el resto fue desechado. Finalmente, a la columna fueron adicionados 30 μ L de agua libre de RNAsa dejando en incubación durante 4 minutos, transcurrido el tiempo la columna fue centrifugada a 10,000 rpm por 2 minutos, las muestras obtenidas fueron congeladas -20 °C.

6.4 Metodo de síntesis de cDNA por PCR-Transcripción Reversa.

La síntesis del cDNA se realizó utilizando High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. De acuerdo con el fabricante, el volumen total para la reacción de RT-PCR fue de 20 uL, que incluyo 10 uL de RNA purificado y 10 uL de master mix. El master mix se realizó según la cantidad de muestras (Tabla 3), que contuvo H₂O, dNTP mix, buffer 10x, random primers, inhibidor de

RNAasa y Transcriptasa inversa. Todas las síntesis de cDNA se realizaron en un termociclador (Applied Biosystems Step One), usando como protocolo de reacción: incubación a 25 °C por 10 minutos, síntesis a 37 °C por 120 minutos, detener la reacción a 85 °C por 5 minutos. Al finalizar la reacción, las muestras de cDNA se congelaron a -20 °C.

Tabla 3. Componentes del master mix High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit.

Componentes	Cantidad de muestras. Volumen en μL														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
H2O	3.2	6.4	9.6	12.8	16	19.2	22.4	25.6	28.8	32	35.2	38.4	41.6	44.8	48
dNTP mix	0.8	1.6	2.4	3.2	4	4.8	5.6	6.4	7.2	8	8.8	9.6	10.4	11.2	12
Buffer 10x	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
Rand primers	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
RNAasa inhi.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Trascriptasa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15

6.5 Curva de validación de la expresión de genes de mielina.

El DNAc fue sintetizado al 3° día de cultivo de células oligodendrogiales, como anteriormente fue mencionado. A partir de la muestra de cDNA se realizaron diluciones en base 5. El volumen total para cada reacción de PCR-RT fue de 20 μL , que incluyó 5 μL de DNAc de las diluciones y 15 μL de master mix. El master mix contuvo H₂O, primers de cadena continua y reversa a una concentración final de 5 μM y SYBR Green supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) constituido por 50 unidades/ml de iTaq/DNA polimerasa, 6 mM MgCl₂, 0,4 mM de cada dNTP, y 20 nM de fluoresceína. Todas las amplificaciones y curvas de validación se hicieron en un equipo de PCR-RT (Applied Biosystems Step One Real-Time PCR), usando como protocolo de validación el siguiente: desnaturalización a 95 °C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1, alineación a 60 °C por 15 segundos y la extensión a 75 °C por 1 minuto, además se programó al equipo para la elaboración de la curva de disociación. Al terminar la validación se realizaron las curvas estándar.

6.6 Metodo de cuantificación relativa de genes por PCR-Tiempo Real.

El volumen total para cada reacción de PCR-RT fue de 20 uL, que incluyo 5 uL de cDNA de la muestra y 15 uL de master mix. El master mix se realizó según la cantidad de muestras (ver tabla 4), que contuvo H₂O, primers de cadena continua y reversa a una concentración final de 5 pM y SYBR Green supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) constituido por 50 unidades/ml de iTaq/DNA polimerasa, 6 mM MgCl₂, 0,4 mM de cada dNTP, y 20 nM de fluoresceína. Todas las amplificaciones y cuantificaciones se hicieron en un equipo de PCR-RT (Applied Biosystems Step One Real-Time PCR), usando como protocolo de reacción el siguiente: desnaturalización a 95 °C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1, alineación a 60 °C por 15 segundos y la extensión a 75 °C por 1 minuto. Al terminar la reacción de PCR en tiempo real se determinaron los valores C_T para cada muestra.

Tabla 4. Componentes de master mix iTAQ Universal SYBR GREEN Supermix

GEN GPADH	Cantidad de muestras. Volumen en μ L														
Componentes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
H2O	3.5	7	10.5	14	17.5	21	24.5	28	31.5	35	38.5	42	45.5	49	52.5
Primer Fwd	1.2	2.4	3.6	4.8	6	7.2	8.4	9.6	10.8	12	13.2	14.4	15.6	16.8	18
Primer Rev	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5	1.8	2.1	2.4	2.7	3	3.3	3.6	3.9	4.2	4.5
SYBR Green	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150

GEN X	Cantidad de muestras. Volumen en μ L														
Componentes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
H2O	2.6	5.2	7.8	10.4	13	15.6	18.2	20.8	23.4	26	28.6	31.2	33.8	36.4	39
Primer Fwd	1.2	2.4	3.6	4.8	6	7.2	8.4	9.6	10.8	12	13.2	14.4	15.6	16.8	18
Primer Rev	1.2	2.4	3.6	4.8	6	7.2	8.4	9.6	10.8	12	13.2	14.4	15.6	16.8	18
SYBR Green	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150

* Gen X (genes de mielina y genes reguladores).



6.7 Metodo para ensayos inmunofluerencia indirecta.

Las células oligodendrogiales fijadas con paraformaldehído al 4% el día 3 de cultivo, fueron colocadas en una cámara húmeda. Las células se bloquearon con una dilución 1:10 de suero normal de cabra durante 45 min hora, y lavadas tres veces con PBS. Los anticuerpos primarios fueron diluidos de acuerdo a la tabla 5. Los anticuerpos diluidos fueron adicionados a las células oligodendrogiales, en un volumen de 100 μ L por muestra. Las muestras fueron incubadas toda la noche a 4° C.

Tabla 5. Diluciones de trabajo de anticuerpos.

Anticuerpo	Dilución Usada
Anti-CNPasa, Millipore	1:500
Anti-MBP, Millipore	1:500
Alexa Fluor 488 IgG, Invitrogen	1:500
Alexa Fluor 488 IgM, Life technologies	1:500
Alexa Fluor 594 IgG, Invitrogen	1:500

Al día siguiente, las células oligodendrogiales fueron lavadas con PBS tres veces, y se les agregó un volumen de 100 μ L del anticuerpo secundario marcados con AlexaFluor 488 ó AlexaFluor 594, de acuerdo a la tabla 5, posteriormente se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente, en obscuridad. Después de la incubación, las células se lavaron tres veces con PBS y se les agrego un volumen de 50 μ L de 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) durante 5 minutos, para tinción de núcleos. Posteriormente, las células oligodendrogiales se lavaron tres veces con PBS y fueron montadas en glicerol en un portaobjetos. Las células fueron analizadas en un microscopio de fluorescencia vertical Zeiss Axistar D2. Todas las condiciones fueron analizadas en 9 campos por duplicado, en experimentos por triplicado.



6.8 Análisis Estadístico

Para comparar las medias de los grupos se empleó análisis de varianza de una vía (ANOVA). Cuando el ANOVA mostró diferencias significativas entre los grupos, se aplicó la comparación múltiple de Tukey para identificar diferencias en pares de grupos. Para determinar las diferencias entre una variable en un punto determinado de tiempo se realizó la prueba T no pareada, cuando sólo se tuvieron dos grupos de comparación. Las pruebas estadísticas se realizaron usando el programa Sigmaplot 12.0 y GraphPad Prim 5. Los valores con diferencias significativas (p) se marcaron de la siguiente manera:

*** = $P < 0.0001$

** = $P < 0.001$

* = $P < 0.01$



7 RESULTADOS

7.1 Validación de la técnica de cuantificación de genes de mielina por PCR-Tiempo Real.

La validación de la técnica de cuantificación de genes por PCR-Tiempo real mostró que tanto el gen endógeno GAPDH y los genes usados para expresión de mielina CNPasa, MBP y MOG cuentan con las eficiencias óptimas de operación como se muestra a continuación.

Tabla 6. Valores obtenidos por la validación de los genes.

GEN	VALOR MELT (°C)	r ²	Valor de la pendiente	Eficiencia (%). Referencia 90-110%
GAPDH	80	0.999	-3.4539	95
CNPasa	78	0.999	-3.3409	99
MBP	78	0.998	-3.2185	105
MOG	79	0.991	-3.2998	101

7.1.1 Validación de la reacción para cuantificar al gen GAPDH

El gen GAPDH, usado como gen de referencia para las validaciones, presentó una curva de disociación que mostró un solo pico de desnaturalización (Fig. 29A) con un valor de disociación MELT de 80°C, (Tabla 6). La curva de validación dio como resultado una regresión lineal de $r^2=0.9992$, con un valor de pendiente de -3.4539 (Fig. 29B), que equivale a una eficiencia de **95%**.

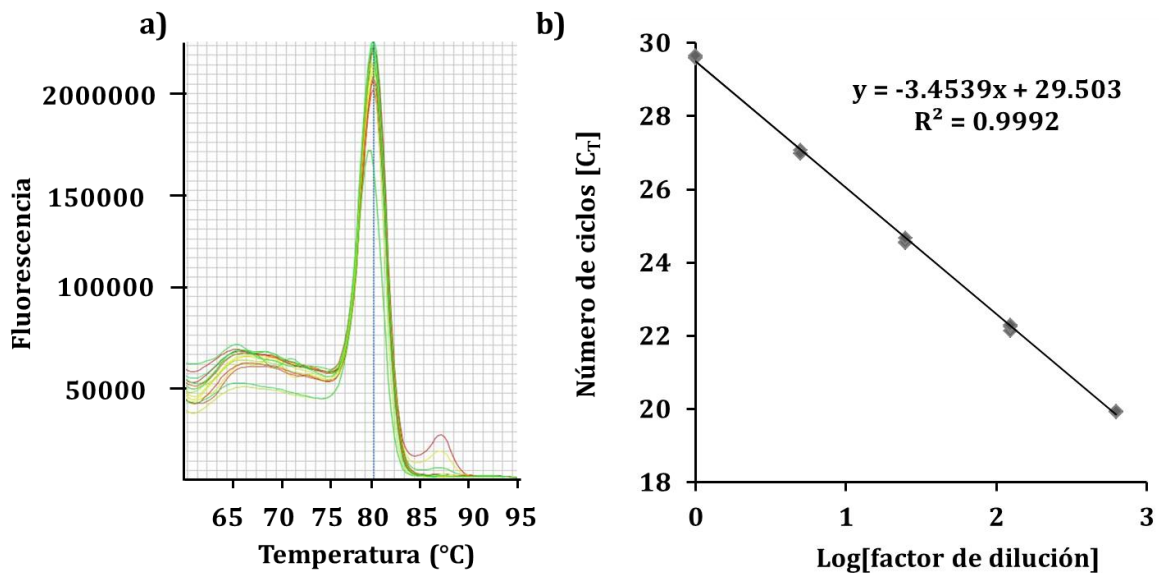


Figura 29. Validación de la cuantificación de GAPDH.

a) Curva de disociación. b) Curva de validación.

7.1.2 Validación la reacción para cuantificar al gen CNPasa

El gen CNPasa usado como gen de expresión de mielina presentó un valor de disociación MELT de 78 °C, (Tabla 6). Así como, una curva de disociación que mostró un solo pico de desnaturalización (Fig. 30A). La curva de validación dió como resultado una regresión lineal de $r^2=0.9994$, con un valor de pendiente de -3.3409 (Fig. 30B), que equivale a una eficiencia de **99%**, es decir que la eficiencia de reacción se encuentra dentro del límite para validar el método entre 90-110%.

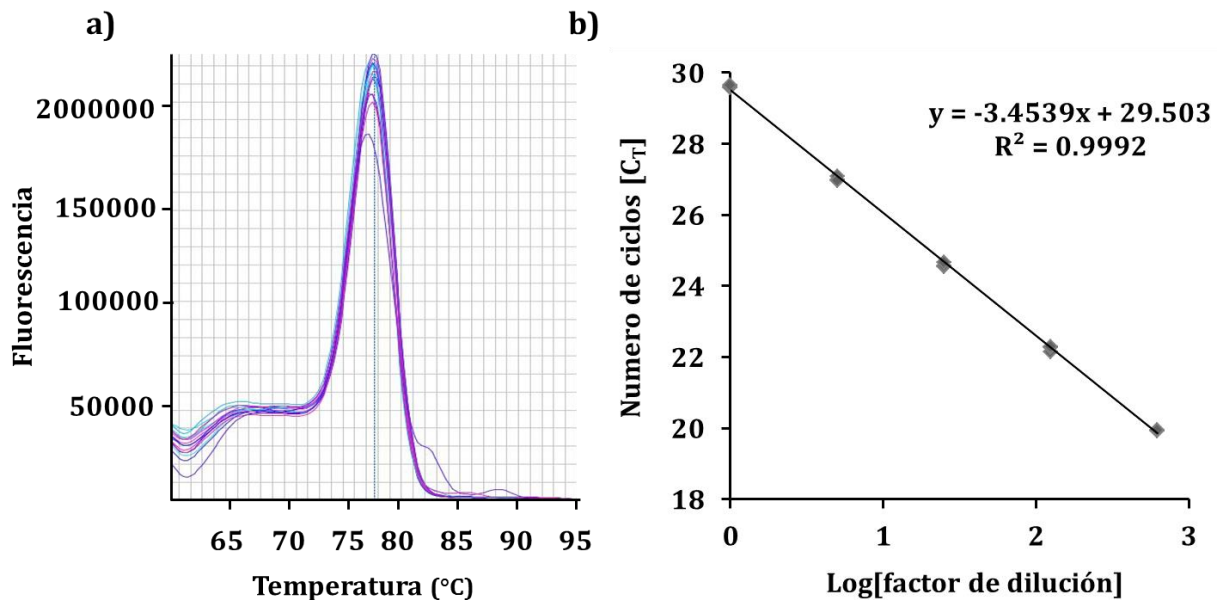


Figura 30. Validación de la cuantificación de CNPasa

a) Curva de disociación. b) Curva de validación.

7.1.3 Validación la reacción para cuantificar al gen MBP

El gen MBP usado como gen de expresión de mielina presentó un valor de disociación MELT de 78°C, ver Tabla 6. Así como una curva de disociación que mostró un solo pico de desnaturalización (Figura 31A). La curva de validación dio como resultado una regresión lineal de $r^2=0.9985$, con un valor de pendiente de -3.2185 (Fig. 31B), que equivale a una eficiencia de **105%**, es decir que la eficiencia de reacción se encuentra dentro del límite para validar el método entre 90-110%.

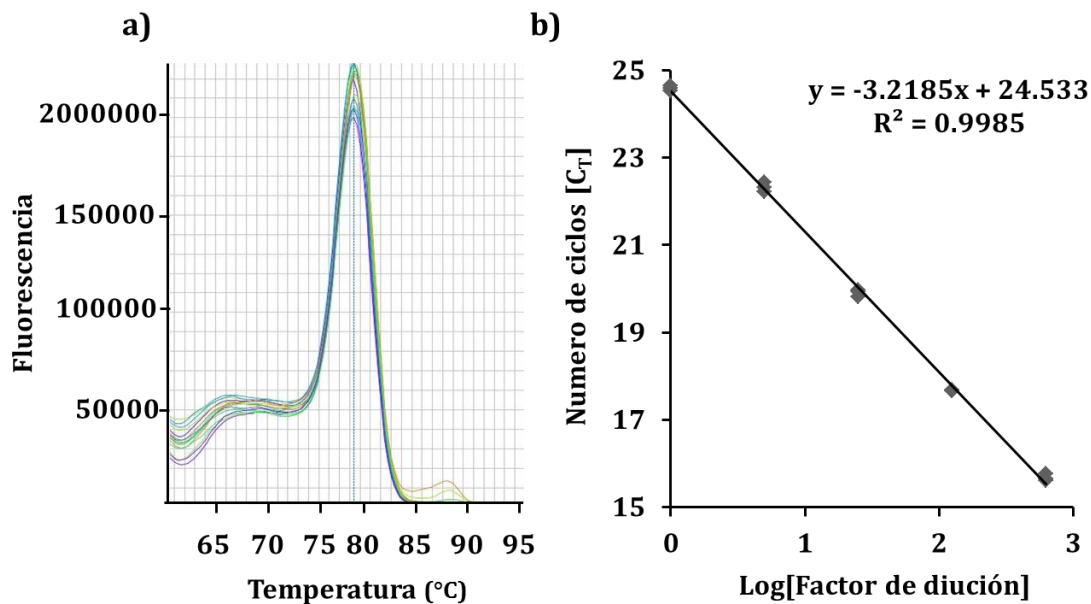


Figura 31. Validación de la cuantificación de MBP.

a) Curva de disociación. b) Curva de validación.

7.1.4 Validación la reacción para cuantificar al gen MOG

El gen MOG usado como gen de expresión de mielina presentó un valor de disociación MELT de 78°C, ver Tabla 6. Así como, una curva de disociación que mostró un solo pico de desnaturalización (Fig. 32A). La curva de validación dió como resultado una regresión lineal de $r^2=0.9913$, con un valor de pendiente de -3.2998 (Fig. 32B), que equivale a una eficiencia de **101%**, es decir que la eficiencia de reacción se encuentra dentro del límite para validar el método entre 90-110%.

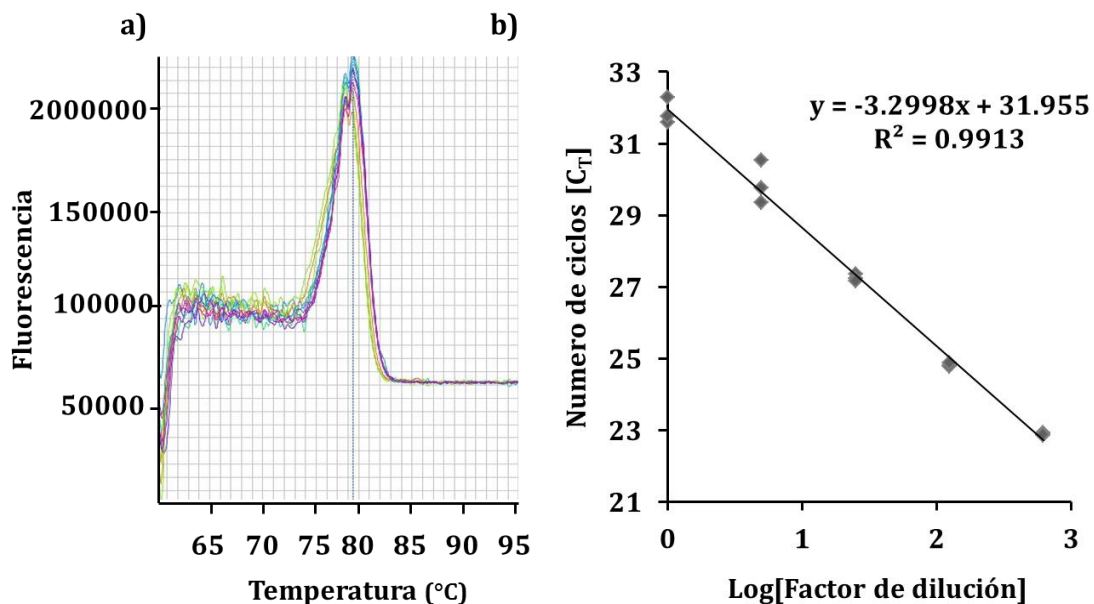


Figura 32. Validación de la cuantificación de MOG.

a) Curva de disociación. b) Curva de validación



7.2 Efecto de BAY 73-6691 sobre la expresión de genes y proteínas de mielina.

Se observó que la concentración óptima de estudio en que las células oligodendrogliales expresaron menos efectos citotóxicos, fue de 40 μM , en comparación con el grupo con etanol, a la misma concentración que las tratadas con BAY 73-6691. Por lo que se utilizó, la dosis de 40 μM para evaluar el efecto de BAY-73-6691 en la expresión de genes de mielina, a los días 1, 3, 6 y 10 de cultivo, mediante PCR-Tiempo Real. Así como, para evaluar el efecto en la expresión relativa de proteínas de mielina, al 3° de cultivo, mediante inmunofluorescencia indirecta.

7.2.1 Efecto de BAY 73-6691 en la expresión del gen de mielina CNPasa.

En las células oligodendrogliales tratadas con 40 μM de BAY 73-6691, observamos una disminución en la expresión relativa de CNPasa, los días 3 y 7 de cultivo, con una reducción del 15% ($p=0.0001$) y 44% ($p=0.0001$) respectivamente, con respecto al control (Fig. 33).

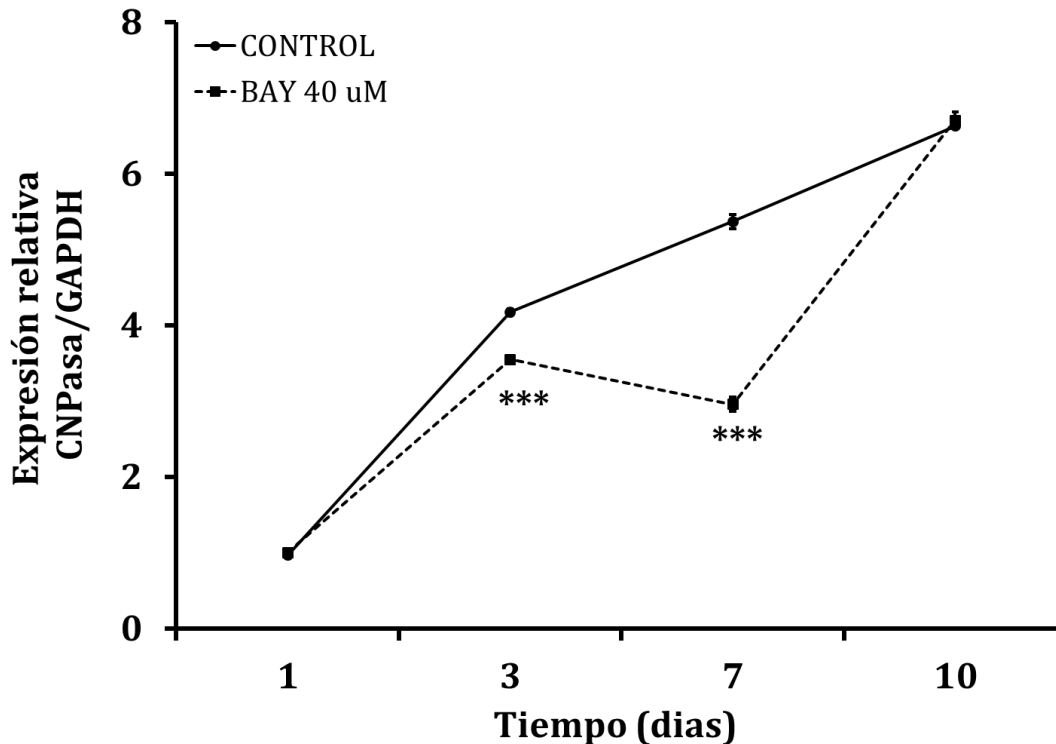


Figura 33. Curva de expresión del gen CNPasa en células oligodendrogliales tratados con BAY 73-6691 durante un curso temporal.

Las células oligodendrogliales fueron tratadas con una dosis de 40 μM de BAY 73-6691 o etanol (control), los días 1, 3, 7 y 10 de cultivo. El RNA extraído fue utilizado para sintetizar cDNA por transcripción reversa, y posteriormente se cuantifico por PCR en tiempo real las concentraciones con respecto a la expresión de GAPDH. *** $p<0.0001$ (prueba múltiple de Tukey).

7.2.2 Efecto de BAY 73-6691 en la expresión del gen de mielina MBP.

En las células oligodendrogliales tratadas con 40 μM de BAY 73-6691, observamos una disminución en la expresión relativa de MBP, el día 7 de cultivo, correspondiendo al 53.9 % ($p=0.0001$), con respecto al control (Fig. 34).

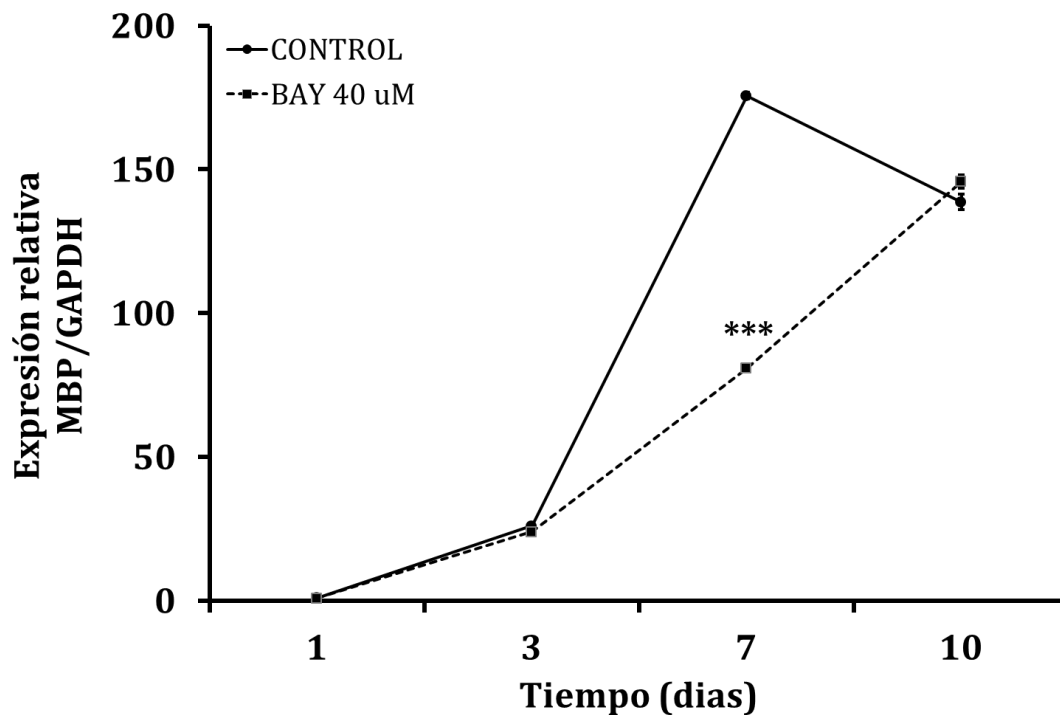


Figura 34. Grafica 6. Curva de expresión del gen MBP en células oligodendrogliales tratados con BAY 73-6691 durante un curso temporal.

Las células oligodendrogliales fueron tratadas con una dosis de 40 μM de BAY 73-6691 o etanol (control), los días 1, 3, 7 y 10 de cultivo. El RNA extraído fue utilizado para sintetizar cDNA por transcripción reversa, y posteriormente se cuantificó por PCR en tiempo real las concentraciones con respecto a la expresión de GAPDH. *** $p<0.0001$ (prueba múltiple de Tukey).

7.2.3 Efecto de BAY 73-6691 en la expresión del gen de mielina MOG.

En las células oligodendrogiales tratadas con 40 μM de BAY 73-6691, observamos una disminución en la expresión relativa de MOG, el día 7 de cultivo, correspondiendo al 70.4 % ($p=0.0001$), con respecto al control (Fig. 35).

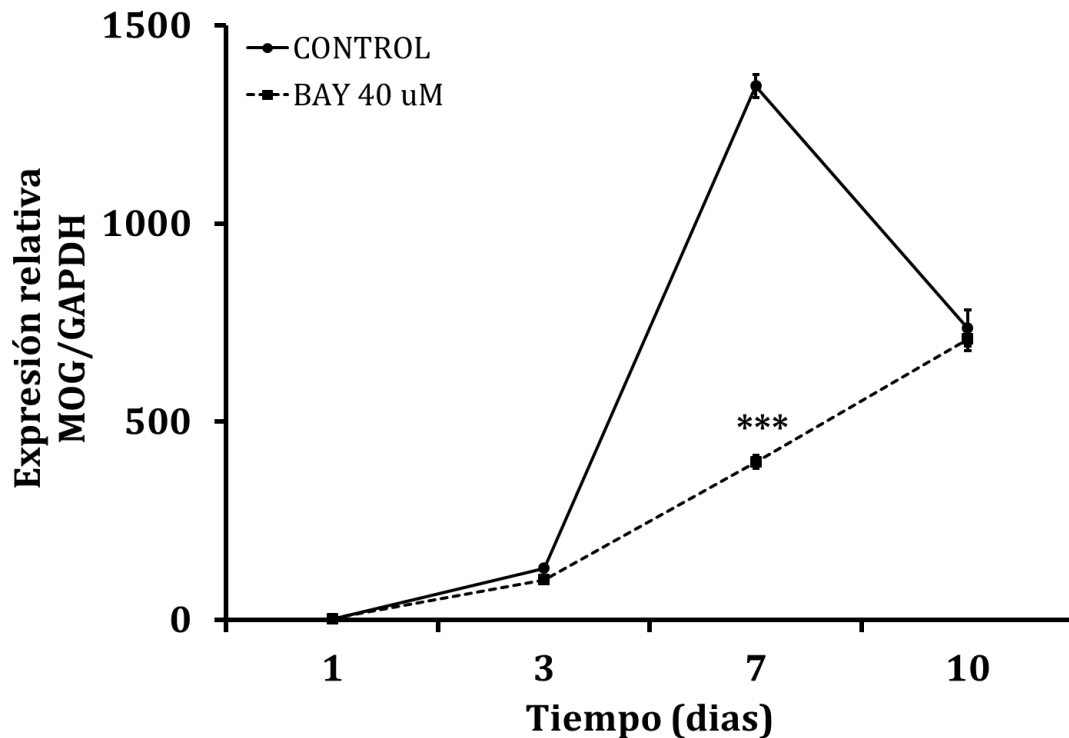


Figura 35. Curva de expresión del gen MOG en células oligodendrogiales tratados con BAY 73-6691 durante un curso temporal.

Las células oligodendrogiales fueron tratadas con una dosis de 40 μM de BAY 73-6691 o etanol (control), los días 1, 3, 7 y 10 de cultivo. El RNA extraído fue utilizado para sintetizar cDNA por transcripción reversa, y posteriormente se cuantifico por PCR en tiempo real las concentraciones con respecto a la expresión de GAPDH. *** $p<0.0001$ (prueba múltiple de Tukey).

7.2.4 Efecto de BAY 73-6691 en la expresión de gen regulador Hes1.

En las células oligodendrogliales tratadas con 40 μ M de BAY 73-6691, observamos una disminución en la expresión relativa de Hes1, el día 10 de cultivo, correspondiendo al 66.43% ($p=0.001$), con respecto al control (Fig. 36).

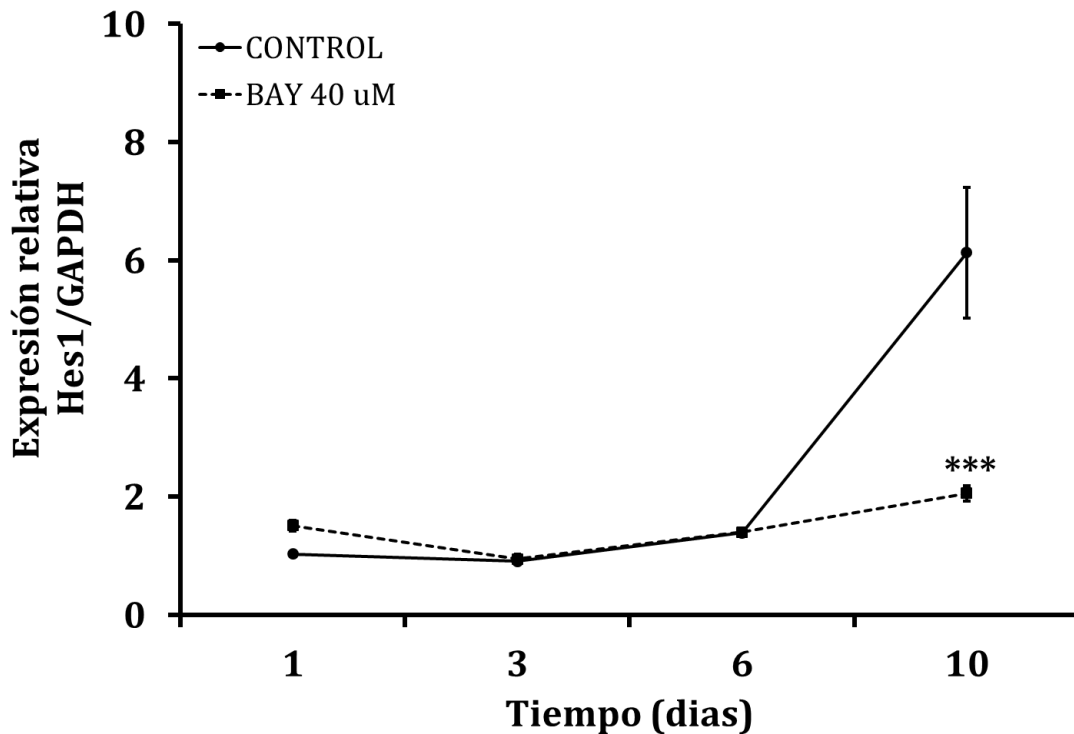


Figura 36. Curva de expresión del gen regulador Hes1 en células oligodendrogliales tratados con BAY 73-6691 durante un curso temporal.

Las células oligodendrogliales fueron tratadas con una dosis de 40 μ M de BAY 73-6691 o etanol (control), los días 1, 3, 6 y 10 de cultivo. El RNA extraído fue utilizado para sintetizar cDNA por transcripción reversa, y posteriormente se cuantificó por PCR en tiempo real las concentraciones con respecto a la expresión de GAPDH.

*** $p<0.001$ (prueba múltiple de Tukey).

7.2.5 Efecto de BAY 73-6691 en la expresión de gen regulador Hes5.

En las células oligodendrogliales tratadas con 40 μ M de BAY 73-6691, observamos un aumento en la expresión relativa de Hes5, el día 10 de cultivo, correspondiendo al 22.21% ($p=0.001$), con respecto al control (Fig. 37).

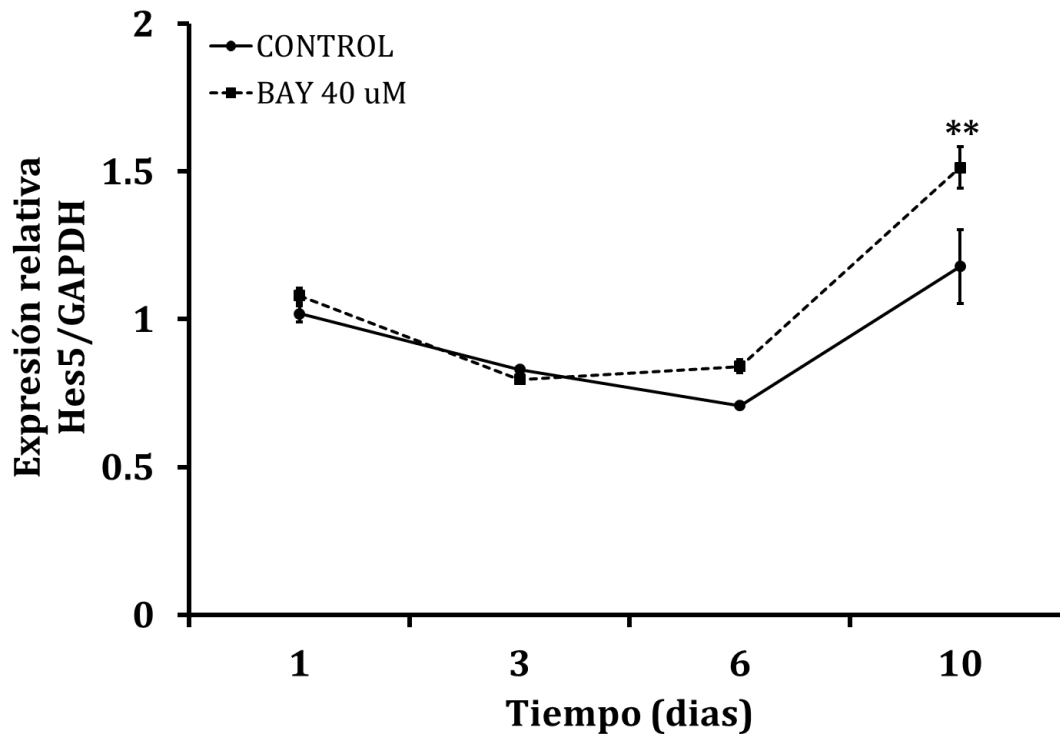


Figura 37. Curva de expresión del gen regulador Hes5 en células oligodendrogliales tratados con BAY 73-6691 durante un curso temporal.

Las células oligodendrogliales fueron tratadas con una dosis de 40 μ M de BAY 73-6691 o etanol (control), los días 1, 3, 6 y 10 de cultivo. El RNA extraído fue utilizado para sintetizar cDNA por transcripción reversa, y posteriormente se cuantificó por PCR en tiempo real las concentraciones con respecto a la expresión de GAPDH. ** $P<0.001$ (prueba múltiple de Tukey).

7.2.6 Efecto de BAY 73-6691 en la expresión de gen regulador Rock2.

En las células oligodendrogliales tratadas con 40 μ M de BAY 73-6691, observamos una disminución en la expresión relativa de Rock2, el día 6 de cultivo, correspondiendo al 22.8% ($p=0.0001$). Así como, un aumento en la expresión relativa de Rock2, el día 10 de cultivo, correspondiendo al 45.71% ($p=0.0001$), con respecto al control (Fig. 38).

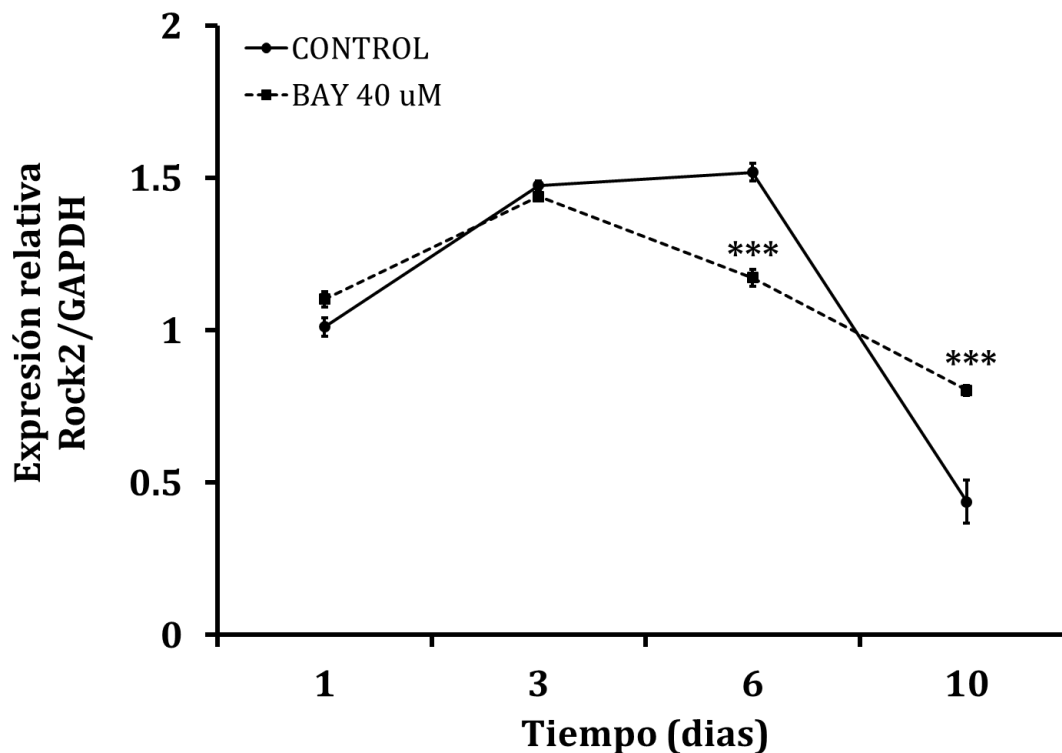


Figura 38, Curva de expresión del gen regulador Rock2 en células oligodendrogliales tratados con BAY 73-6691 durante un curso temporal.

Las células oligodendrogliales fueron tratadas con una dosis de 40 μ M de BAY 73-6691 o etanol (control), los días 1, 3, 6 y 10 de cultivo. El RNA extraído fue utilizado para sintetizar cDNA por transcripción reversa, y posteriormente se cuantificó por PCR en tiempo real las concentraciones con respecto a la expresión de GAPDH. *** $P<0.001$ (prueba múltiple de Tukey).

7.2.7 Efecto de BAY 73-6691 en la expresión de gen regulador Id2.

En las células oligodendrogliales tratadas con 40 μ M de BAY 73-6691, observamos un aumento en la expresión relativa de Id2, el día 6 de cultivo, correspondiendo al 33.1% ($p=0.0001$), con respecto al control (Fig. 39).

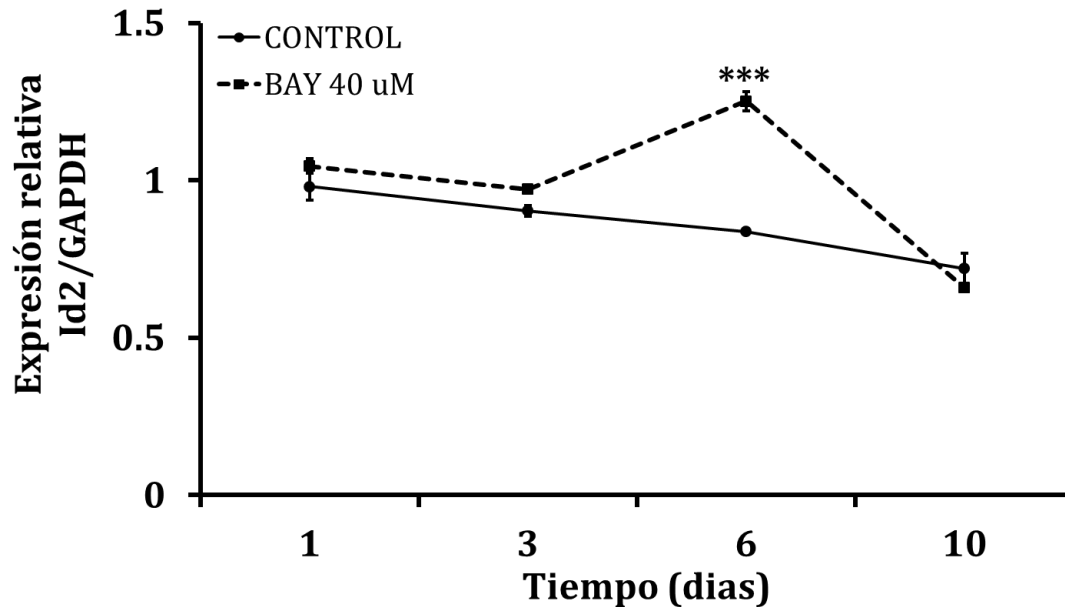


Figura 39. Curva de expresión del gen regulador Id2 en células oligodendrogliales tratados con BAY 73-6691 durante un curso temporal.

Las células oligodendrogliales fueron tratadas con una dosis de 40 μ M de BAY 73-6691 o etanol (control), los días 1, 3, 6 y 10 de cultivo. El RNA extraído fue utilizado para sintetizar cDNA por transcripción reversa, y posteriormente se cuantificó por PCR en tiempo real las concentraciones con respecto a la expresión de GAPDH.

*** $p<0.001$ (prueba múltiple de Tukey).

7.2.8 Efecto de BAY 73-6691 en la expresión de gen regulador Id4.

En las células oligodendrogliales tratadas con 40 μ M de BAY 73-6691, observamos una disminución en la expresión relativa de Id4, el día 10 de cultivo, correspondiendo a 90.4% ($p=0.0001$), con respecto al control (Fig. 40).

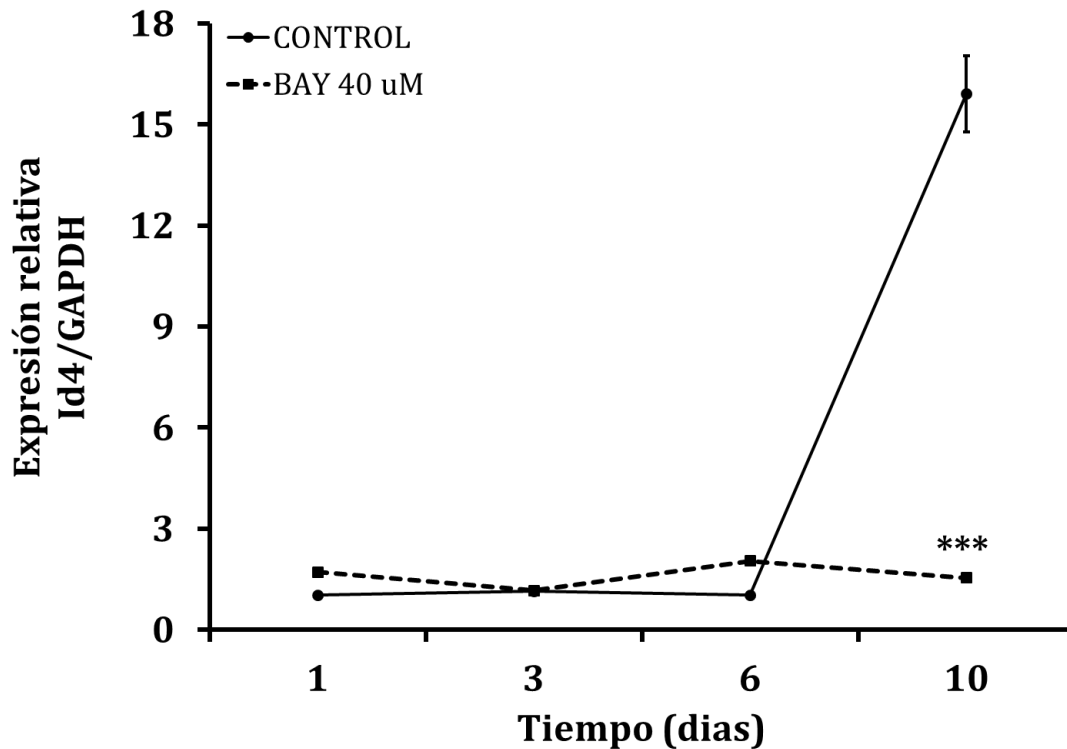


Figura 40. Curva de expresión del gen regulador Id4 en células oligodendrogliales tratados con BAY 73-6691 durante un curso temporal.

Las células oligodendrogliales fueron tratadas con una dosis de 40 μ M de BAY 73-6691 o etanol (control), los días 1, 3, 7 y 10 de cultivo. El RNA extraído fue utilizado para sintetizar cDNA por transcripción reversa, y posteriormente se cuantificó por PCR en tiempo real las concentraciones con respecto a la expresión de GAPDH. *** $P<0.001$ (prueba múltiple de Tukey).

7.2.9 Efecto de BAY 73-6691 en la expresión de proteína de mielina CNPasa.

Al cuantificar la expresión relativa de la proteína CNPasa por inmunofluorescencia indirecta, en las células oligodendrogiales tratadas con 40 μ M de BAY 73-9961, observamos la disminución en la expresión de CNPasa, al 3^o día de cultivo, correspondiendo al 16.9 % ($p=0.001$), con respecto al control (Fig. 41).

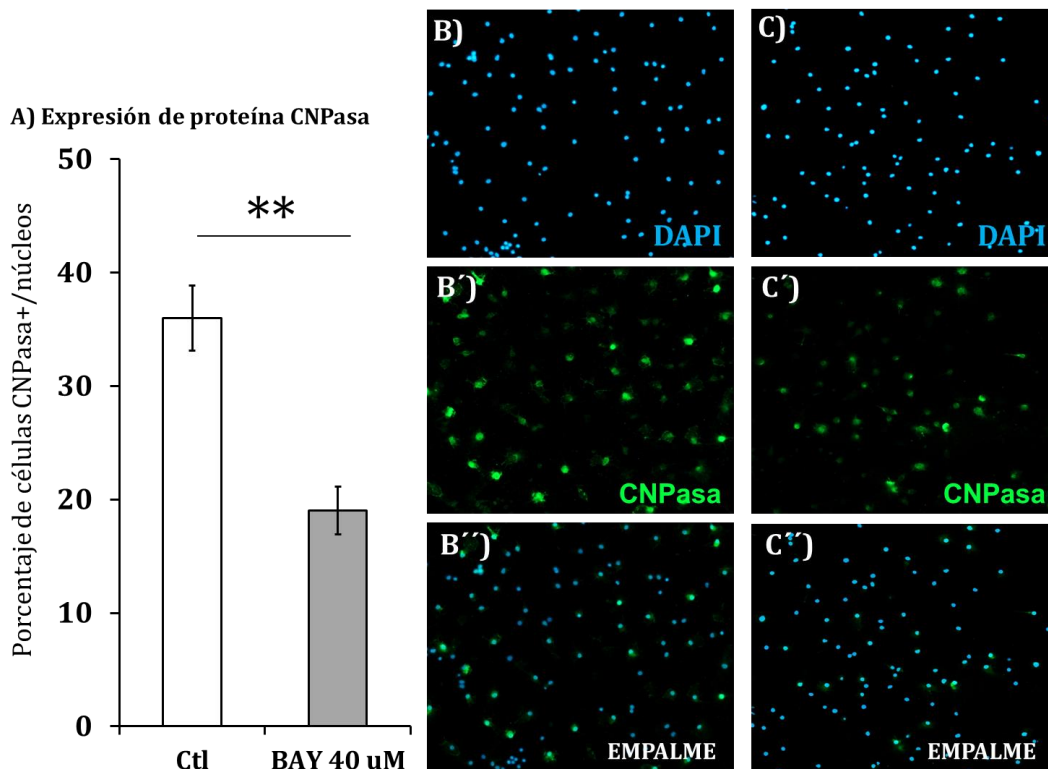


Figura 41. Efecto de BAY 73-6691 en la expresión de proteína de mielina CNPasa en oligodendrocitos.

A) Porcentaje de expresión de la proteína CNPasa con respecto al número de núcleos, de células tratadas con BAY 73-6691 40 μ M con respecto al control etanol (** $p<0.001$, prueba T de student). B) Células oligodendrogiales del control marcadas con DAPI; B') marcadas con anti-CNPasa-Alexa 488; B'') Empalme de ambas microfotografías. C) Células oligodendrogiales tratadas con BAY 73-6691 marcadas con DAPI; C') marcadas con anti-CNPasa-Alexa 488; C'') Empalme de ambas microfotografías.

7.2.10 Efecto de BAY 73-6691 en la expresión de proteína de mielina MBP.

Al cuantificar la expresión relativa de la proteína CNPasa por inmunofluorescencia indirecta, en las células oligodendrogliales tratadas con 40 μ M de BAY 73-9961, observamos la disminución en la expresión de MBP, al 3° día de cultivo, correspondiendo al 50 % ($p=0.001$), con respecto al control (Fig. 42).

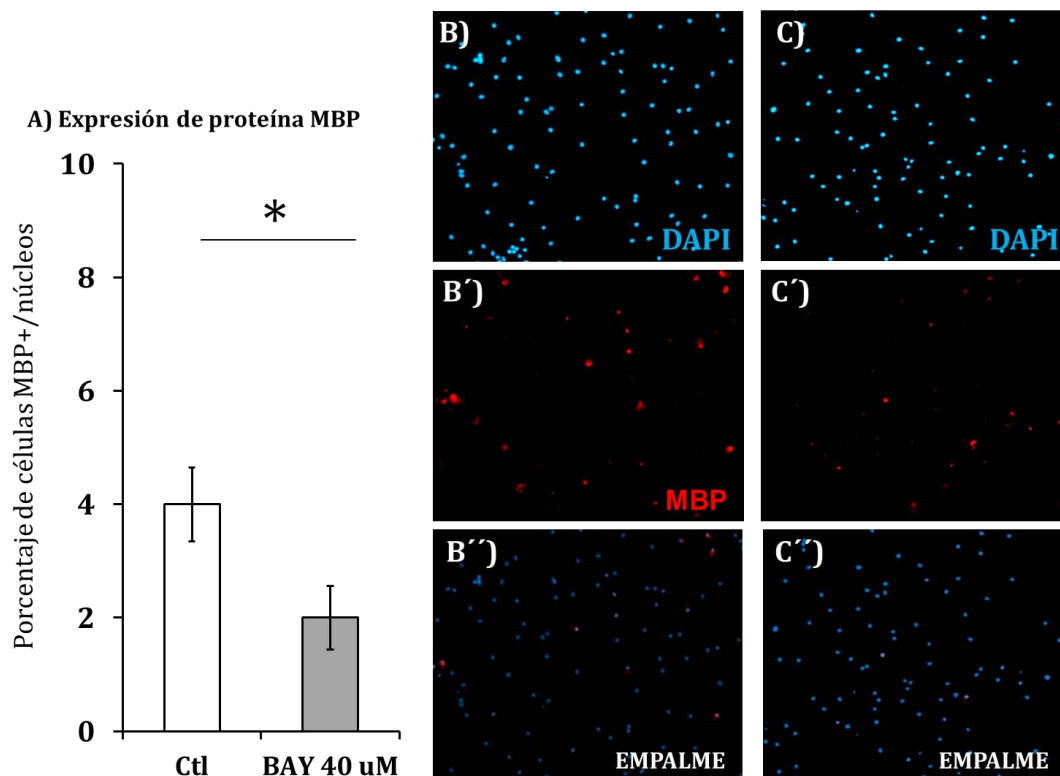


Figura 42. Efecto de BAY 73-6691 en la expresión de proteína de mielina MBP en oligodendrocitos.

A) Porcentaje de expresión de la proteína MBP con respecto al número de núcleos, de células tratadas con BAY 73-6691 40 μ M con respecto al control etanol ($*p < 0.01$, prueba T de student). B) Células oligodendrogliales del control marcadas con DAPI; B') marcadas con anti-MBP-Alexa 594; B'') Empalme de ambas microfotografías. C) Células oligodendrogliales tratadas con BAY 73-6691 40 μ M marcadas con DAPI; C') marcadas con anti-MBP-Alexa 594; C'') Empalme de ambas microfotografías.



7.3 Efecto de sildenafil sobre la expresión de genes y proteínas de mielina.

Se observó que la concentración óptima de estudio en que las células oligodendrogliales expresaron menos efectos citotóxicos, fue de 50 μM , en comparación con el grupo con etanol, a la misma concentración que las tratadas con Sildenafil. Por lo que se utilizó, la dosis de 50 μM para evaluar el efecto de Sildenafil en la expresión de genes, a los días 1, 3, 6 y 10 de cultivo, mediante PCR-Tiempo Real. Así como, para evaluar el efecto en la expresión relativa de proteínas de mielina, al 3° de cultivo, mediante inmunofluorescencia indirecta.

7.3.1 Efecto del citrato de sildenafil en la expresión del gen de mielina CNPasa.

En las células oligodendrogliales tratadas con 50 μM de sildenafil, observamos una disminución en la expresión relativa de CNPasa, los días 3, 6 y 10 de cultivo, correspondiendo al 31.5% ($p=0.0001$), 28.3% ($p=0.0001$) y 62.3% ($p=0.0001$) respectivamente, con respecto al control (Fig. 43).

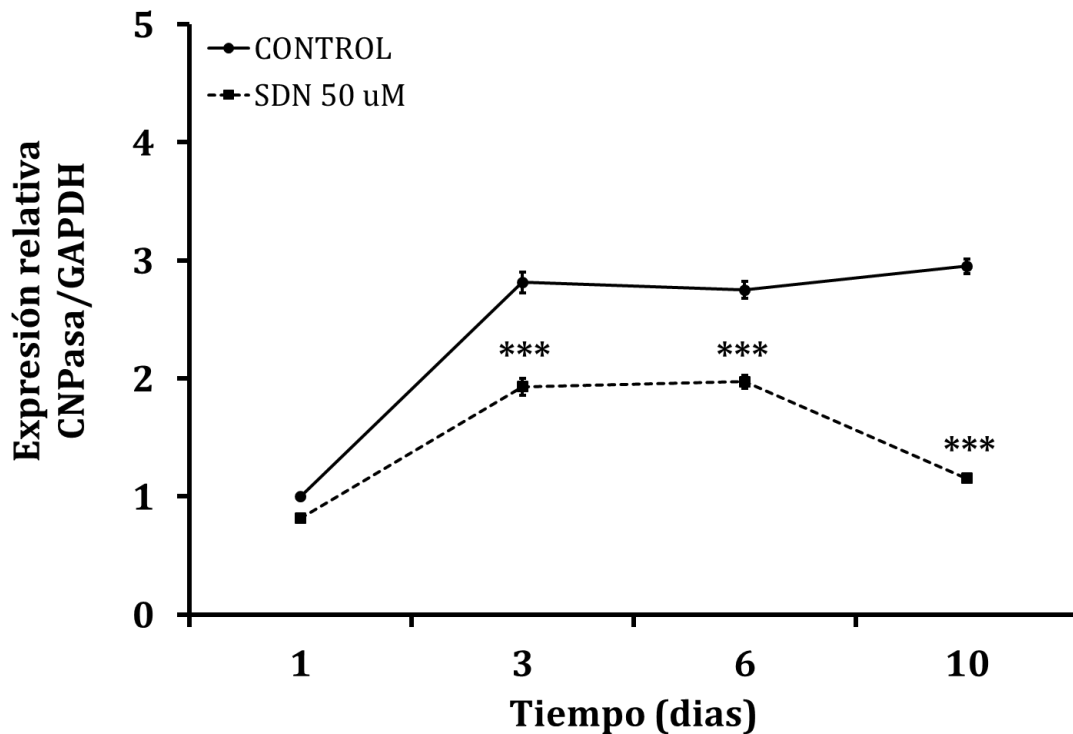


Figura 43. Curva de expresión del gen CNPasa en células oligodendrogliales tratados con Sildenafil durante un curso temporal.

Las células oligodendrogliales fueron tratadas con una dosis de 50 μM de Citrato de Sildenafil o etanol (control), los días 1, 3, 7 y 10 de cultivo. El RNA extraído fue utilizado para sintetizar cDNA por transcripción reversa, y posteriormente se cuantificó por PCR en tiempo real las concentraciones con respecto a la expresión de GAPDH. * $p<0.05$ *** $p<0.0001$ (prueba múltiple de Tukey).

7.3.2 Efecto del citrato de sildenafil en la expresión del gen de mielina MBP.

En las células oligodendrogiales tratadas con 50 μ M de sildenafil, observamos una disminución en la expresión relativa de MBP, los días 3, 6 y 10 de cultivo, correspondiendo al 52.5% ($p=0.001$), 61% ($p=0.0001$) y 82% ($p=0.0001$) respectivamente, con respecto al control (Fig. 44).

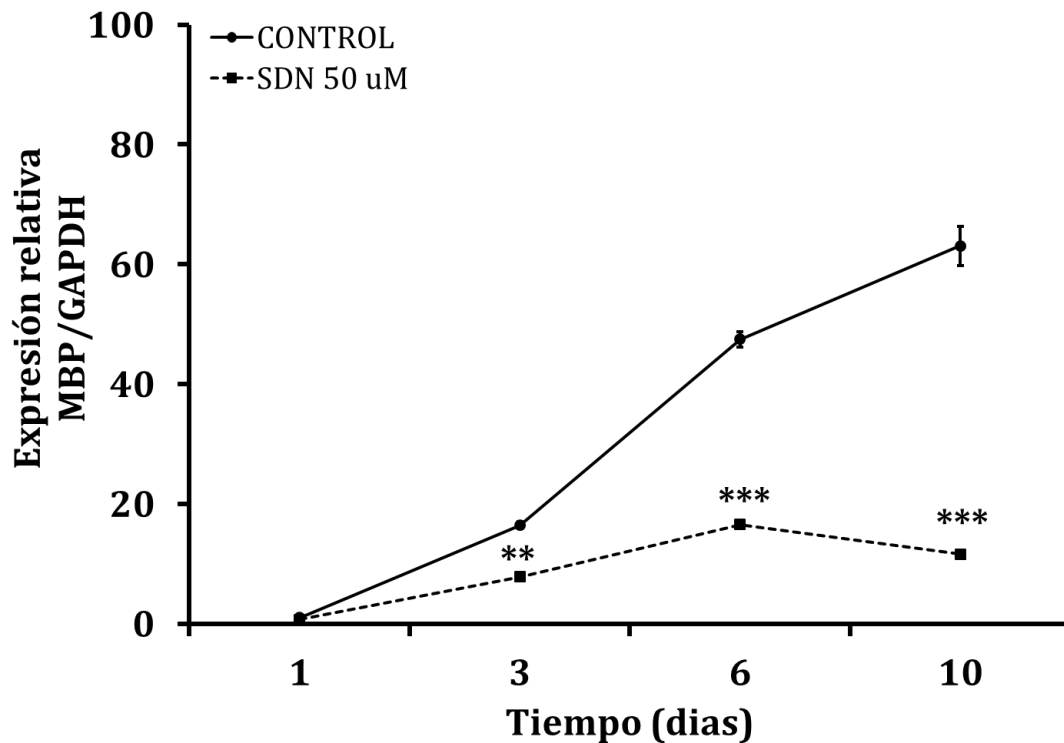


Figura 44. Curva de expresión del gen MBP en células oligodendrogiales tratados con Sildenafil durante un curso temporal.

Las células oligodendrogiales fueron tratadas con una dosis de 50 μ M de Citrato de Sildenafil o etanol (control), los días 1, 3, 7 y 10 de cultivo. El RNA extraído fue utilizado para sintetizar cDNA por transcripción reversa, y posteriormente se cuantifico por PCR en tiempo real las concentraciones con respecto a la expresión de GAPDH. Diferencias entre grupos, ** $p<0.001$, *** $p<0.0001$ (prueba múltiple de Tukey).

7.3.3 Efecto del citrato de sildenafil en la expresión del gen de mielina MOG.

En las células oligodendrogliales tratadas con 50 μM de sildenafil, observamos una disminución en la expresión relativa de MOG, los días 3, 6 y 10 de cultivo, correspondiendo al 64.1% ($p=0.001$), 78.4% ($p=0.0001$) y 91.6% ($p=0.0001$) respectivamente, con respecto al control (Fig. 45).

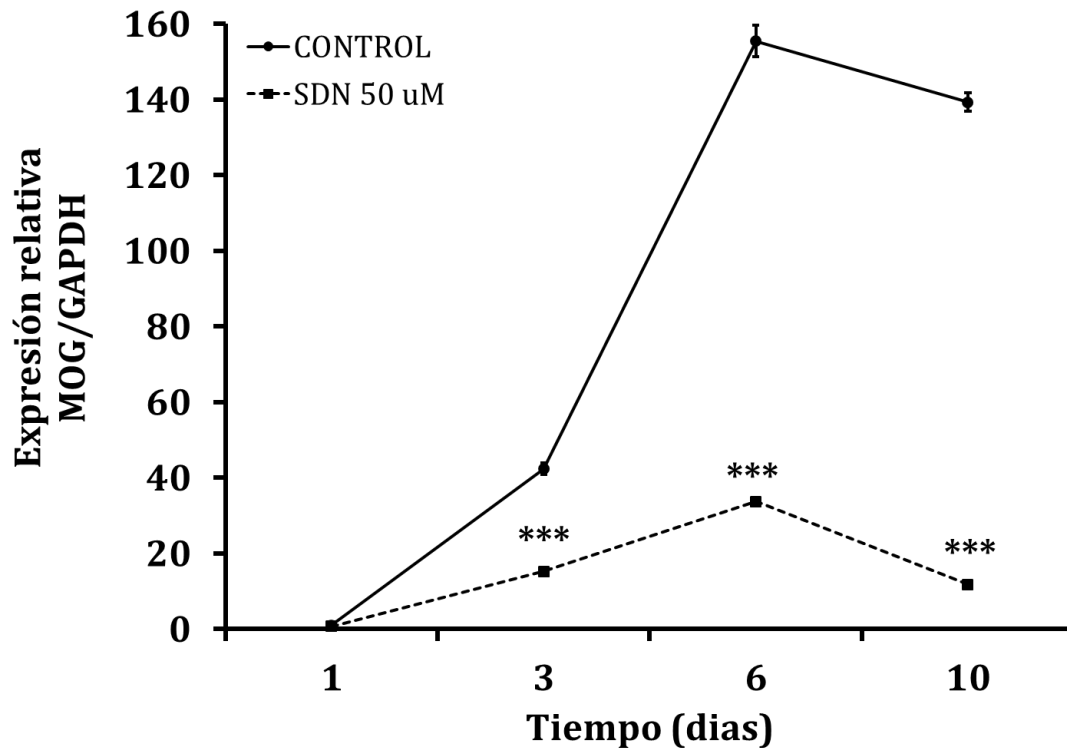


Figura 45. Curva de expresión del gen MOG en células oligodendrogliales tratados con Sildenafil durante un curso temporal.

Las células oligodendrogliales fueron tratadas con una dosis de 50 μM de Citrato de Sildenafil o etanol (control), los días 1, 3, 7 y 10 de cultivo. El RNA extraído fue utilizado para sintetizar cDNA por transcripción reversa, y posteriormente se cuantifico por PCR en tiempo real las concentraciones con respecto a la expresión de GAPDH. *** $p<0.0001$ (prueba múltiple de Tukey).

7.3.4 Efecto del citrato de sildenafil en la expresión del gen regulador Hes1.

En las células oligodendrogliales tratadas con 50 μM de sildenafil, observamos un aumento en la expresión relativa de Hes1, al día 10 de cultivo, correspondiendo al 27.3% ($p=0.001$) respectivamente, con respecto al control (Fig. 46).

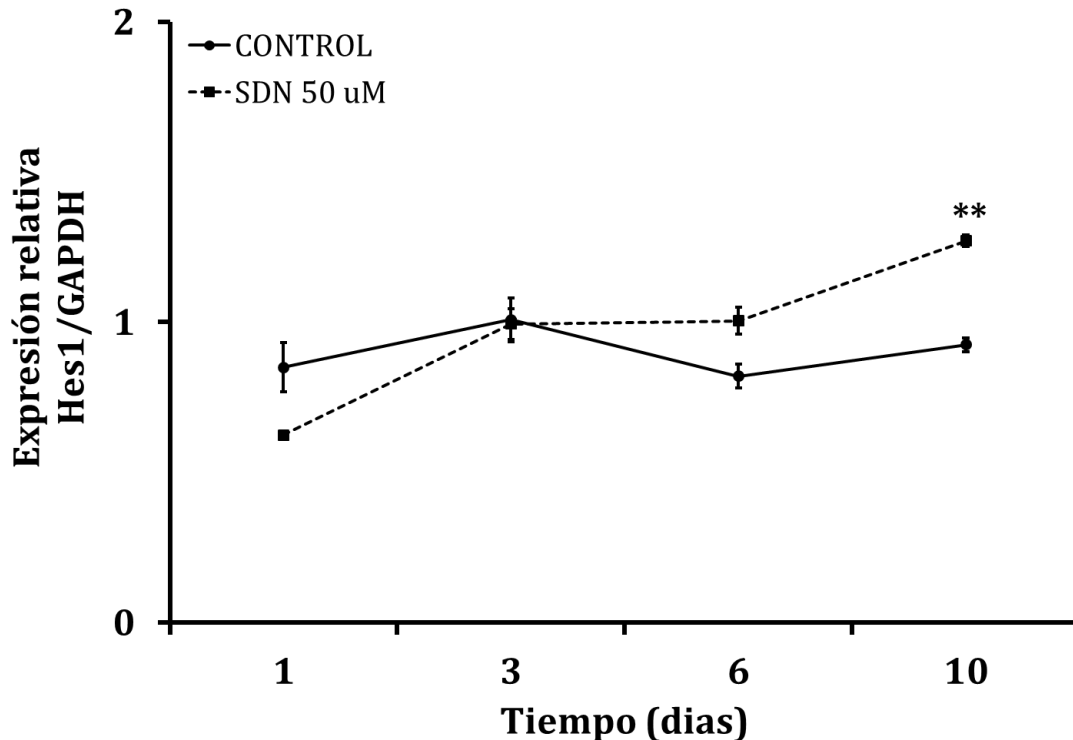


Figura 46. Curva de expresión del gen Hes1 en células oligodendrogliales tratados con Sildenafil durante un curso temporal.

Las células oligodendrogliales fueron tratadas con una dosis de 50 μM de Citrato de Sildenafil o etanol (control), los días 1, 3, 7 y 10 de cultivo. El RNA extraído fue utilizado para sintetizar cDNA por transcripción reversa, y posteriormente se cuantificó por PCR en tiempo real las concentraciones con respecto a la expresión de GAPDH. ** $p<0.001$ (prueba múltiple de Tukey).

7.3.5 Efecto del citrato de sildenafil en la expresión del gen regulador Hes5.

En las células oligodendrogliales tratadas con 50 μ M de sildenafil, observamos un aumento en la expresión relativa de Hes5, al día 10 de cultivo, correspondiendo al 35.3% ($p=0.001$) respectivamente, con respecto al control (Fig. 47).

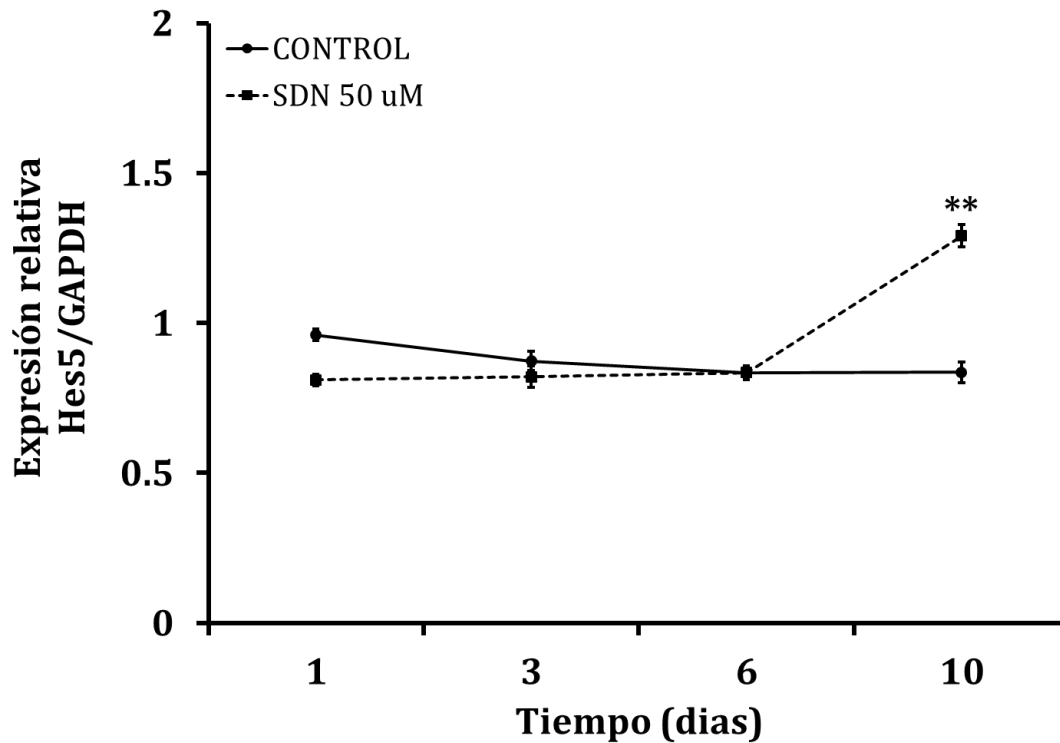


Figura 47. Curva de expresión del gen Hes5 en células oligodendrogliales tratados con Sildenafil durante un curso temporal.

Las células oligodendrogliales fueron tratadas con una dosis de 50 μ M de Citrato de Sildenafil o etanol (control), los días 1, 3, 7 y 10 de cultivo. El RNA extraído fue utilizado para sintetizar cDNA por transcripción reversa, y posteriormente se cuantificó por PCR en tiempo real las concentraciones con respecto a la expresión de GAPDH. ** $p<0.001$ (prueba múltiple de Tukey).

7.3.6 Efecto del citrato de sildenafil en la expresión del gen regulador Rock2.

En las células oligodendrogliales tratadas con 50 μM de sildenafil, observamos una disminución en la expresión relativa de Rock2, a los días 3 y 10 de cultivo, correspondiendo al 22.1% ($p=0.001$) y al 14.6% ($p=0.001$) respectivamente, con respecto al control (Fig. 48).

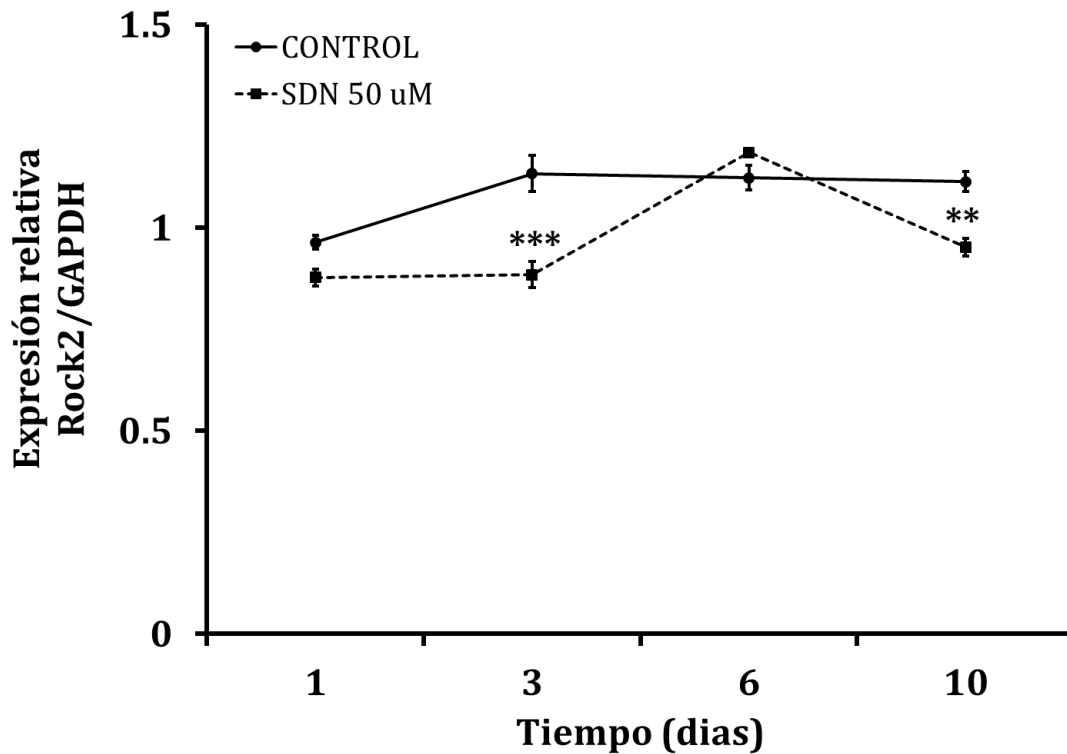


Figura 48. Curva de expresión del gen Rock2 en células oligodendrogliales tratados con Sildenafil durante un curso temporal.

Las células oligodendrogliales fueron tratadas con una dosis de 50 μM de Citrato de Sildenafil o etanol (control), los días 1, 3, 7 y 10 de cultivo. El RNA extraído fue utilizado para sintetizar cDNA por transcripción reversa, y posteriormente se cuantificó por PCR en tiempo real las concentraciones con respecto a la expresión de GAPDH. ** $p<0.001$, *** $p<0.0001$ (prueba múltiple de Tukey).

7.3.7 Efecto del citrato de sildenafil en la expresión del gen regulador Id2.

En las células oligodendrogliales tratadas con 50 μ M de sildenafil, observamos un aumento en la expresión relativa de Id2, a los días 3, 6 y 10 de cultivo, correspondiendo al 27.4% ($p=0.0001$), 64.8% ($p=0.0001$) y al 62.5% ($p=0.0001$) respectivamente, con respecto al control (Fig. 49).

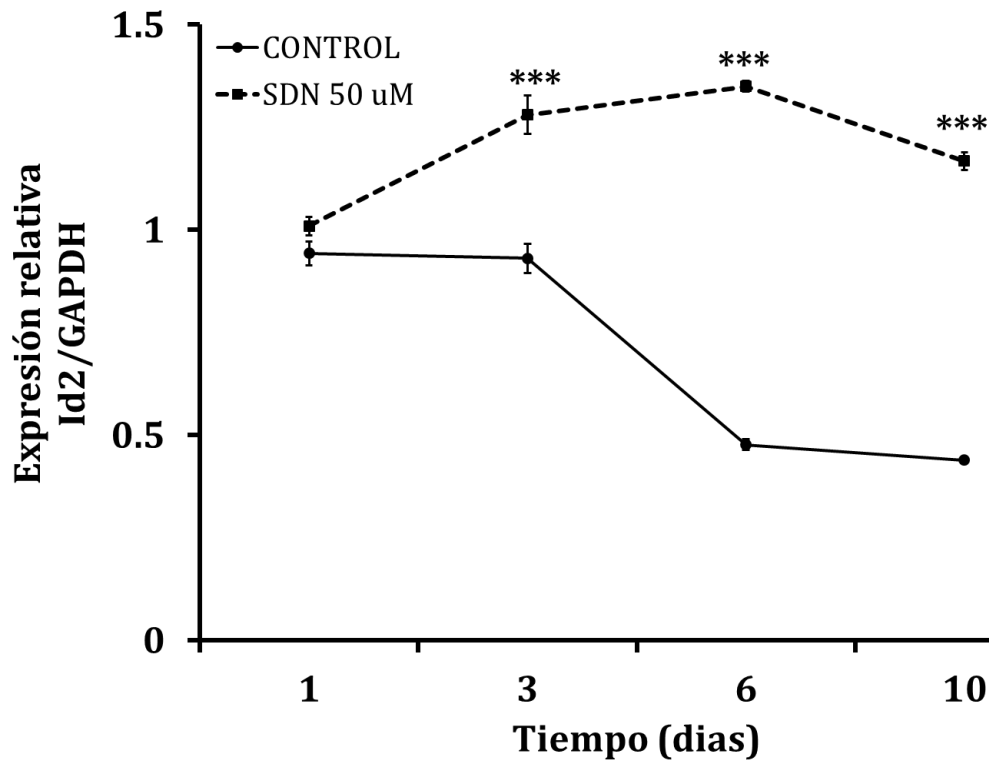


Figura 49. Curva de expresión del gen Id2 en células oligodendrogliales tratados con Sildenafil durante un curso temporal.

Las células oligodendrogliales fueron tratadas con una dosis de 50 μ M de Citrato de Sildenafil o etanol (control), los días 1, 3, 7 y 10 de cultivo. El RNA extraído fue utilizado para sintetizar cDNA por transcripción reversa, y posteriormente se cuantificó por PCR en tiempo real las concentraciones con respecto a la expresión de GAPDH. *** $p<0.0001$ (prueba múltiple de Tukey).

7.3.8 Efecto del citrato de sildenafil en la expresión del gen regulador Id4.

En las células oligodendrogliales tratadas con 50 μ M de sildenafil, observamos un aumento en la expresión relativa de Id4, a los días 3, 6 y 10 de cultivo, correspondiendo al 38 % ($p=0.0001$), 68.2% ($p=0.0001$) y al 61.7% ($p=0.0001$) respectivamente, con respecto al control (Fig. 50).

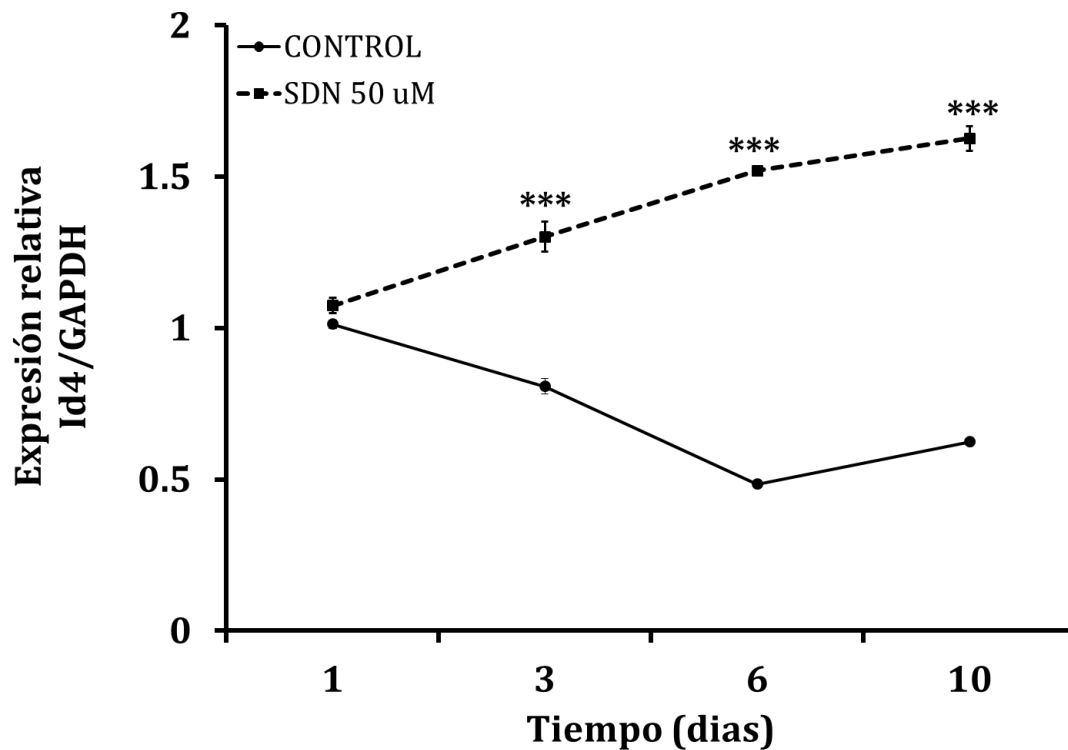


Figura 50. Curva de expresión del gen Id4 en células oligodendrogliales tratados con Sildenafil durante un curso temporal.

Las células oligodendrogliales fueron tratadas con una dosis de 50 μ M de Citrato de Sildenafil o etanol (control), los días 1, 3, 7 y 10 de cultivo. El RNA extraído fue utilizado para sintetizar cDNA por transcripción reversa, y posteriormente se cuantifico por PCR en tiempo real las concentraciones con respecto a la expresión de GAPDH. *** $p<0.0001$ (prueba múltiple de Tukey).

7.3.9 Efecto del citrato de sildenafil en la expresión de proteína de mielina CNPasa.

Al cuantificar la expresión relativa de la proteína CNPasa por inmunofluorescencia indirecta, en las células oligodendrogliales tratadas con 50 μ M de sildenafil, observamos la disminución en la expresión de CNPasa, al 3° día de cultivo, correspondiendo al 53.4% ($p=0.001$), con respecto al control (Fig. 51).

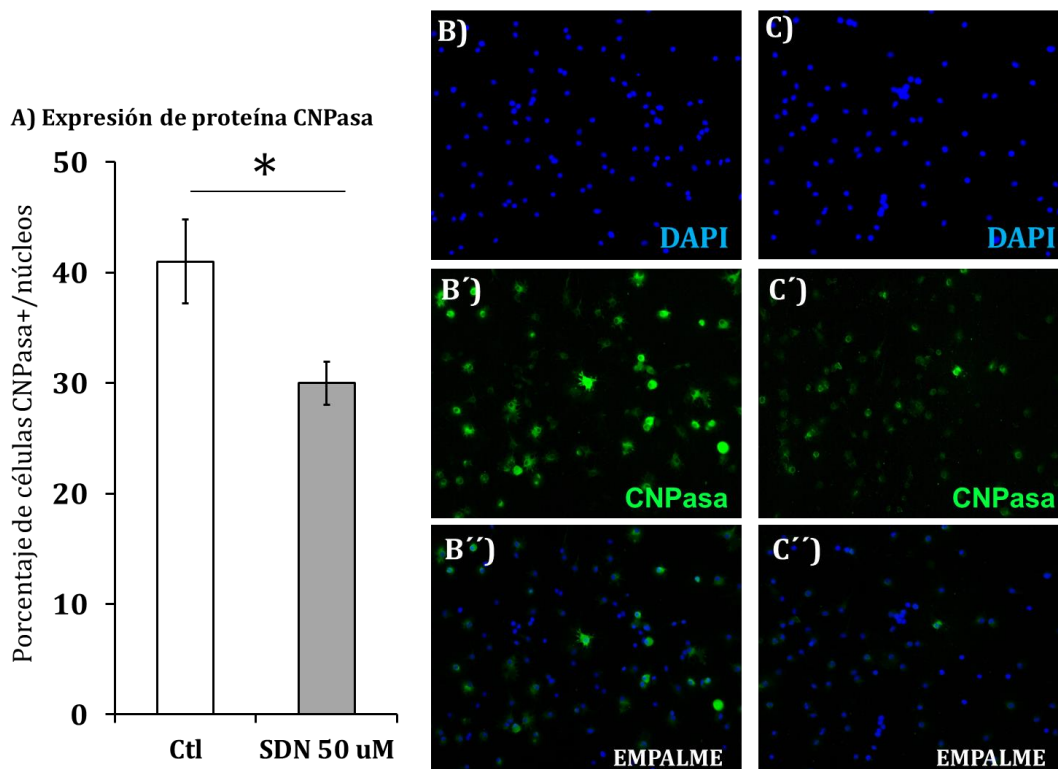


Figura 51. Efecto de sildenafil en la expresión de proteína CNPasa en oligodendrocitos.

A) Porcentaje de expresión de la proteína CNPasa con respecto al número de núcleos, de células tratadas con Sildenafil 50 μ M con respecto al control etanol ($*p < 0.01$, prueba T de student). **B)** Células oligodendrogliales del control marcadas con DAPI (azul); **B')** marcadas con anti-MBP-Alexa 488 (verde); **B'')** Empalme de ambas microfotografías. **C)** Células oligodendrogliales tratadas con Sildenafil 50 μ M marcadas con DAPI; **C')** marcadas con anti-MBP-Alexa 488 (verde); **C'')** Empalme de ambas microfotografías.

7.3.10 Efecto del citrato de sildenafil en la expresión de proteína de mielina MBP.

Al cuantificar la expresión relativa de la proteína MBP por inmunofluorescencia indirecta, en las células oligodendrogliales tratadas con 50 μM de sildenafil, observamos la disminución en la expresión de MBP, al 3° día de cultivo, correspondiendo al 45.5% ($p=0.001$), con respecto al control (Fig. 52).

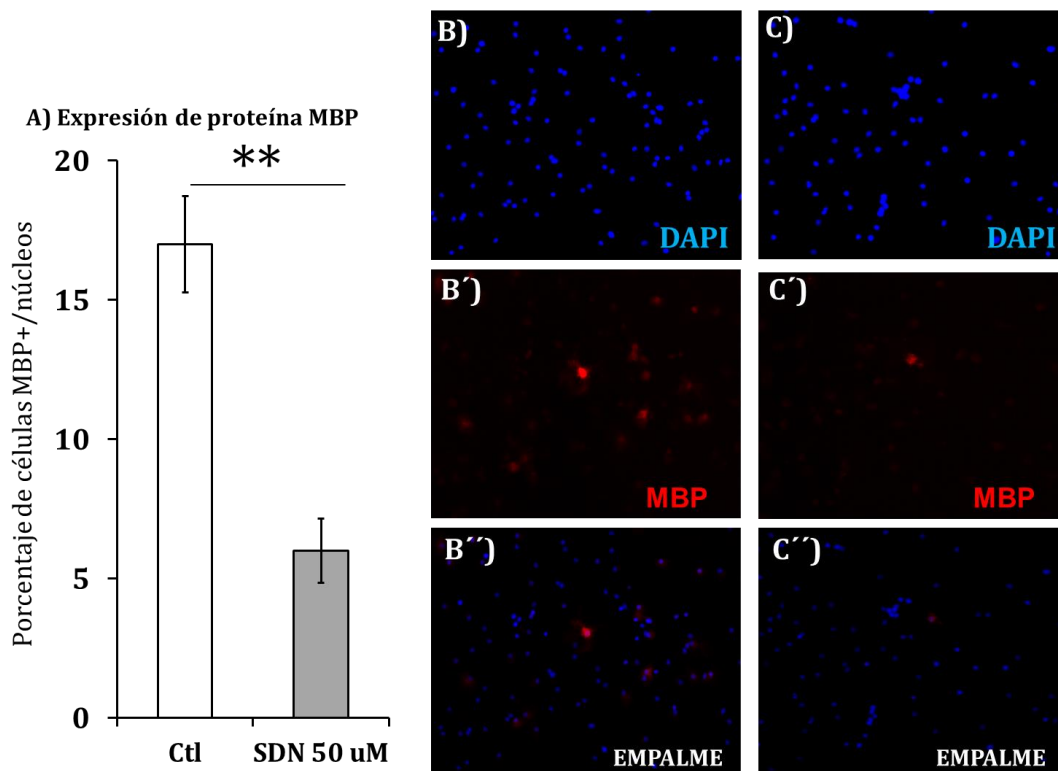


Figura 52. Efecto de sildenafil en la expresión de proteína MBP en oligodendrocitos.

A) Expresión de proteína MBP, porcentaje de expresión de la proteína MBP con respecto al número de núcleos, de células tratadas con Sildenafil 50 μM con respecto al control etanol (** $p<0.001$, prueba T de student). **B)** Células oligodendrogliales del control marcadas con DAPI; **B')** marcadas con anti-MBP-Alexa 594; **B'')** Empalme de ambas microfotografías. **C)** Células oligodendrogliales tratadas con Sildenafil 50 μM marcadas con DAPI; **C')** marcadas con anti-MBP-Alexa 594; **C'')** Empalme de ambas microfotografías.



8 DISCUSIÓN

Durante un ensayo de validación se mide la eficiencia de la reacción. Cuando se realiza un cambio de reactivo (marca, tipo de primers, oligonucleótidos), es necesario realizar una nueva curva de validación. Por esa razón, realizamos la validación de las técnicas de cuantificación relativa de los genes de mielina y el gen de referencia GAPDH. Los resultados obtenidos de cada uno de nuestros genes se encuentran dentro del valor de r^2 , dentro del porcentaje de eficiencia esperado y tienen un valor de pendiente cercana a -3.3. Por esta razón, nuestro método se encuentra validado, por lo tanto con buena reproducibilidad, de tal manera concluimos que es un método eficiente y confiable.

Los inhibidores de fosfodiesterasas BAY 73-6691 y citrato de sildenafil, no promueven la síntesis de mielina, contrariamente a lo planteado en la hipótesis del estudio.

❖ En el caso de BAY 73-6691:

La concentración utilizada fue de 40 μ M. Posteriormente, realizamos por triplicados cursos temporales (días 1, 3, 7 y 10 de cultivo) para medir por PCR en tiempo real posibles diferencias en la expresión relativa de genes de mielina CNPasa, MBP y MOG. De esta forma observamos que las células tratadas con Bay 73-6691 disminuyen hasta un 44% con respecto al control, la expresión relativa de CNPasa el día 7 de cultivo. Pero esta disminución parece ser transitorio dado que para el día 10 de cultivo, esta diferencia se pierde. Este mismo efecto se observó en los otros dos genes de mielina, MBP y MOG. La disminución de la expresión de los tres genes de mielina, mediados por BAY 73-6691, podría indicarnos que algún mecanismo mediado por este inhibidor de fosfodiesterasa estaría interfiriendo en la síntesis de mielina en lugar de promoverla, algo que ya se había documentado con otro inhibidor de fosfodiesterasas, la



vinpocetina [74]. Entonces, es posible que al igual que la vinpocetina, algunos reguladores negativos de la síntesis de mielina pudieran estar incrementados por efecto de BAY 73-6691, lo que podría tener alguna relación con la disminución de la síntesis de mielina. Por esta razón, medimos a los reguladores negativos Hes1, Hes5, Rock2, Id2 e Id4, que ya se habían visto relacionados en la inhibición de la síntesis de mielina mediada por vinpocetina. Así, encontramos que en los oligodendrocitos tratados con Bay 73-6691, los genes Hes5, Rock2 e Id2 tuvieron diferencias estadísticamente significativas en sus niveles de expresión, pero con valores muy cercanos a los controles. En cambio, Hes1 e Id4 disminuyen su expresión el día 10 de cultivo de forma considerable, lo que podría estar relacionado con la recuperación de los niveles de mielina el día 10.

Para determinar si la síntesis de mielina también era afectada en la cantidad de proteína, realizamos tinciones de inmunofluorescencia indirecta para evaluar la expresión de CNPasa y MBP en el día 3 de cultivo y encontramos que en ambos casos hay una disminución en el número de células que expresan ambas proteínas cuando son tratadas con BAY 73-6691, es decir, que esta disminución es afectada tanto a nivel de expresión de RNA, como a nivel de síntesis de proteínas.



❖ En el caso de citrato de sildenafil.

La concentración óptima de trabajo fue de 50 μ M. Posteriormente realizamos por triplicado cursos temporales (días 1, 3, 7, 10 de cultivo) para medir por PCR en tiempo real posibles diferencias en la expresión relativa de genes de mielina CNPasa, MBP y MOG. De esta forma observamos que las células tratadas con citrato de sildenafil disminuye hasta un 91.3% la expresión relativa de MOG con respecto al control, el día 10 de cultivo. Pero esta disminución se presenta en los días 3, 6 y 10. Siendo el día 10 de cultivo el más disminuido. Este mismo efecto se observó en los otros dos genes de mielina, CNPasa y MBP. La disminución de la expresión de los tres genes de mielina, mediados por sildenafil, podría indicarnos que algún mecanismo mediado por este inhibidor de fosfodiesterasa estaría interfiriendo en la síntesis de mielina en lugar de promoverla, como mencionado anteriormente, un efecto similar ocasionado por la vinpocetina. Es posible que al igual que la vinpocetina algunos reguladores negativos de la síntesis de mielina pudieran estar incrementados por efecto de sildenafil, lo que podría tener alguna relación con la disminución de la síntesis de mielina. Por esta razón, medimos a los reguladores negativos Hes1, Hes5, Rock2, Id2 e Id4, que ya se habían visto relacionados en la inhibición de la síntesis de mielina mediada por vinpocetina. Así, encontramos que Hes1 y Rock2 tuvieron diferencias estadísticamente significativas en sus niveles de expresión, pero con valores muy cercanos a los controles. En cambio, Hes5, Id2 e Id4 aumenta su expresión por efecto de Sildenafil los días 3, 6 y 10 de cultivo de forma considerable, lo que podría estar relacionado con la disminución de los niveles de mielina los días 3, 6 y 10.



Para determinar si la síntesis de mielina también era afectada en la cantidad de proteína, realizamos tinciones de inmunofluorescencia indirecta para evaluar la expresión de CNPasa y MBP en el día 3 de cultivo y encontramos que ambos casos hay una disminución en el número de células que expresan ambas proteínas cuando son tratadas con Sildenafil. Por lo tanto, esta disminución es afectada tanto a nivel de expresión de RNA, como a nivel de síntesis de proteínas.

9 CONCLUSIONES

Con este estudio logramos identificar dos fármacos inhibidores de fosfodiesterasas, Bay 73-6691 y citrato de sildenafil, que inhiben la síntesis de mielina, contrario a las referencias que promueven su uso en enfermedades desmielinizantes. Es posible que las vías por las cuales se inhibe la síntesis de mielina estén relacionadas, dado que tres inhibidores de tres fosfodiesterasas distintas tienen un mismo efecto inhibitorio de la síntesis de mielina. En este momento no podemos señalar una vía específica, pero abre un campo de análisis a futuro. Nuestra recomendación es que estos fármacos no sean utilizados en pacientes hasta que sean realizados estudios más profundos en modelos *in vivo*, para determinar los posibles efectos en la síntesis de mielina.



10 PERSPECTIVAS

- ❖ Analizar las concentraciones intracelulares de los nucleótidos cíclicos, ya que es posible que las concentraciones de AMPc o GMPc no se afectaron o fueron insuficientes para originar otra respuesta.
- ❖ Identificar la vía de señalización por la cual la inhibición de la síntesis de mielina ocurre. Es importante, determinar si otros genes reguladores están involucrados, dado que nuestro estudio estuvo limitado a sólo 5 de los casi 30 que existen reportados.
- ❖ Analizar si la vía de IKK está involucrada, dado que otro inhibidor de fosfodiesterasa, la vinpocetina, se ha relacionado con la inhibición de la síntesis de mielina a través de esta vía.



11 INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Las subdivisiones y los componentes del sistema nervioso central. _____ 4

Figura 2. Esquema de motoneurona en el asta anterior de la médula espinal. _____ 6

Figura 3. Ultraestructura de una sinapsis axodendrítica [6]. _____ 8

Figura 4. Tipos de neuronas [7]. _____ 9

Figura 5. Tipos de células de la neuroglia [7]. _____ 10

Figura 6. Distintas etapas del linaje oligodendroglial [11] _____ 13

Figura 7. Señalización Axón-oligodendrocitos _____ 15

Figura 8. Transmisión de señales por Fyn Cinasa. _____ 16

Figura 9. Vía de señalización del AMPc y del GMPc [34]. _____ 18

Figura 10. AMPc y GMPc promueven la expresión de genes. _____ 20

Figura 11. Interacción de señales extracelulares y factores epigenéticos en el control de la diferenciación de oligodendrocitos. _____ 23

Figura 12. Mielinización en el sistema nervioso central. _____ 24

Figura 13. Conducción saltatoria _____ 26

Figura 14. Diagrama compuesto que resume las características de la mielina del SNC. _____ 27

Figura 15. Interacciones axon-glial que regulan la mielinización. _____ 30

Figura 16. Vías de señalización axón-glía en la mielinización. _____ 31

Figura 17. Hidrolisis de los nucleótidos cíclicos por fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos . _____ 37

Figura 18. Señalización de nucleótidos cíclicos y regulación. _____ 38

Figura 19. Estructura y organización de dominios de las 11 familias de PDE de mamíferos. _____ 40

Figura 20. Diagrama esquemático de la PCR en Tiempo Real [68]. _____ 46

Figura 21. Ensayos de PCR [69]. _____ 48

Figura 22. Cuatro métodos diferentes para la etapa de cebado de transcripción inversa en los ensayos de dos pasos de RT-PCR tiempo real [69]. _____ 49

Figura 23. Actividad del inhibidor de RNAsa sobre transcriptasas inversas. _____ 51

Figura 24. Diseño del primer para el paso PCR tiempo real de RT-PCR tiempo real. _____ 52



Figura 25. Método no específico de union de SYBR Green. _____	54
Figura 26. Curva de disociación o curva Melt _____	59
Figura 27. Curva de amplificación de PCR en tiempo real. _____	60
Figura 28. Esquema de la curva estándar. _____	61
Figura 29. Validación de la cuantificación de GAPDH. _____	73
Figura 30. Validación de la cuantificación de CNPasa _____	74
Figura 31. Validación de la cuantificación de MBP. _____	75
Figura 32. Validación de la cuantificación de MOG. _____	76
Figura 33. Curva de expresión del gen CNPasa en células oligodendrogiales tratados con BAY 73-6691 durante un curso temporal. _____	78
Figura 34. Grafica 6. Curva de expresión del gen MBP en células oligodendrogiales tratados con BAY 73-6691 durante un curso temporal. _____	79
Figura 35. Curva de expresión del gen MOG en células oligodendrogiales tratados con BAY 73-6691 durante un curso temporal. _____	80
Figura 36. Curva de expresión del gen regulador Hes1 en células oligodendrogiales tratados con BAY 73-6691 durante un curso temporal. _____	81
Figura 37. Curva de expresión del gen regulador Hes5 en células oligodendrogiales tratados con BAY 73-6691 durante un curso temporal. _____	82
Figura 38. Curva de expresión del gen regulador Rock2 en células oligodendrogiales tratados con BAY 73-6691 durante un curso temporal. _____	83
Figura 39. Curva de expresión del gen regulador Id2 en células oligodendrogiales tratados con BAY 73-6691 durante un curso temporal. _____	84
Figura 40. Curva de expresión del gen regulador Id4 en células oligodendrogiales tratados con BAY 73-6691 durante un curso temporal. _____	85
Figura 41. Efecto de BAY 73-6691 en la expresión de proteína de mielina CNPasa en oligodendrocitos. _____	86
Figura 42. Efecto de BAY 73-6691 en la expresión de proteína de mielina MBP en oligodendrocitos. _____	87
Figura 43. Curva de expresión del gen CNPasa en células oligodendrogiales tratados con Sildenafil durante un curso temporal. _____	89
Figura 44. Curva de expresión del gen MBP en células oligodendrogiales tratados con Sildenafil durante un curso temporal. _____	90
Figura 45. Curva de expresión del gen MOG en células oligodendrogiales tratados con Sildenafil durante un curso temporal. _____	91



Figura 46. Curva de expresión del gen Hes1 en células oligodendrogliales tratados con Sildenafil durante un curso temporal. _____ 92

Figura 47. Curva de expresión del gen Hes5 en células oligodendrogliales tratados con Sildenafil durante un curso temporal. _____ 93

Figura 48. Curva de expresión del gen Rock2 en células oligodendrogliales tratados con Sildenafil durante un curso temporal. _____ 94

Figura 49. Curva de expresión del gen Id2 en células oligodendrogliales tratados con Sildenafil durante un curso temporal. _____ 95

Figura 50. Curva de expresión del gen Id4 en células oligodendrogliales tratados con Sildenafil durante un curso temporal. _____ 96

Figura 51. Efecto de sildenafil en la expresión de proteína CNPasa en oligodendrocitos. _____ 97

Figura 52. Efecto de sildenafil en la expresión de proteína MBP en oligodendrocitos. _____ 98



12 INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de enzimas fosfodiesterasas de la Clase I. _____	41
Tabla 2. Familias de PDEs en la que el citrato de sildenafil y BAY 73-6691 son inhibidores. _____	42
Tabla 3. Componentes del master mix High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit _____	68
Tabla 4. Componentes de master mix iTAQ Universal SYBR GREEN Supermix _____	69
Tabla 5. Diluciones de trabajo de anticuerpos. _____	70
Tabla 6. Valores obtenidos por la validación de los genes. _____	72

13 REFERENCIAS

- [1] E. Martín Cuenca, 2006. *Fundamentos de Fisiología*. Madrid, España: Thomson Editores, pp. 18–20.
- [2] G. Perea and A. Araque, “New information pathways in the nervous system: communication between astrocytes and neurones,” *Rev. Neurol.*, vol. 36, no. 2, pp. 137–44.
- [3] S. I. Fox, 2011. *Fisiología Humana*, 12th ed. Madrid, España: McGraw-Hill-Interamericana, pp. 160–170.
- [4] D. Purves, G. J. Augustine, D. Fitzpatrick, L. C. Katz, A.-S. LaMantia, J. O. McNamara, and S. M. Williams, 2001. *Neuroscience*, 2nd ed. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- [5] D. E. Haines, 2013. *Principios de neurociencia: Aplicaciones básicas y clínicas*, 4th ed. Madrid, España: S.A. Elsevier España.
- [6] M. J. Turlough FitzGerald, G. Gruener, and E. Mtui, 2012. *Neuroanatomía clínica y neurociencia*, 6° edición. Elsevier España, S.L.
- [7] D. P. Cardinali, 2007. *Neurociencia aplicada: sus fundamentos*, 1° ed. Buenos Aires, Argentina: Medica Panamericana.
- [8] L. Ariza Vázquez, 2010. Estudio de la vía de señalización de NRG1typeIII en el desarrollo de la neuropatía diabética (Tesis Doctoral). Universitat Autònoma de Barcelona.
- [9] K. Pérez Capote, 2006. Respuesta de las células gliales al daño neuronal In Vitro (Tesis Doctoral), Universitat de Barcelona.
- [10] V. Alfaro, J. Blasco, T. Carbonell, J. Gutiérrez, I. Navarro, T. Pagés, L. Palacios, J. Palomeque, J. Planas, M. Riera, M. P. Sáiz, R. Torrela, and G. Viscor, 2005. *Fisiología Animal. Volumen 1*. España: Publicaciones de la Universitat de Barcelona, p. 45.
- [11] R. S. Snell, 2007. *Neuroanatomía clínica*, 6° Edición. España: Editorial Medica Panamericana.
- [12] H. Kumamaru, H. Saiwai, K. Kobayakawa, K. Kubota, N. van Rooijen, K. Inoue, Y. Iwamoto, and S. Okada, “Liposomal clodronate selectively eliminates microglia from primary astrocyte cultures,” *J. Neuroinflammation*, vol. 9, p. 116. 2012.
- [13] A. V. Molofsky, R. Krencik, R. Krenick, E. M. Ullian, E. Ullian, H. Tsai, B. Deneen, W. D. Richardson, B. A. Barres, and D. H. Rowitch, “Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective,” *Genes Dev.*, vol. 26, no. 9, pp. 891–907, 2012.
- [14] C. Blázquez Ortiz, 2004. Cetogénesis en Astrocitos: Caracterización, regulación y posible papel citoprotector (Tesis Doctoral). Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.
- [15] H. Kettenmann, U.-K. Hanisch, M. Noda, and A. Verkhratsky, “Physiology of microglia,” *Physiol. Rev.*, vol. 91, no. 2, pp. 461–553, 2011.
- [16] A. Bribián and F. de Castro, “Oligodendrocytes: their embryonic origin, migration and therapeutic implications,” *Rev. Neurol.*, vol. 45, no. 9, pp. 535–46.



- [17] S. L. Fyffe-Maricich, J. C. Karlo, G. E. Landreth, and R. H. Miller, "The ERK2 mitogen-activated protein kinase regulates the timing of oligodendrocyte differentiation.," *J. Neurosci.*, vol. 31, no. 3, pp. 843–50, 2011.
- [18] N. Baumann and D. Pham-Dinh, "Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system.," *Physiol. Rev.*, vol. 81, no. 2, pp. 871–927, 2001.
- [19] M. Bradl and H. Lassmann, "Oligodendrocytes: biology and pathology.," *Acta Neuropathol.*, vol. 119, no. 1, pp. 37–53, 2010.
- [20] B. El Waly, M. Macchi, M. Cayre, and P. Durbec, "Oligodendrogenesis in the normal and pathological central nervous system.," *Front. Neurosci.*, vol. 8, p. 145, 2014.
- [21] J. R. Patel and R. S. Klein, "Mediators of oligodendrocyte differentiation during remyelination.," *FEBS Lett.*, vol. 585, no. 23, pp. 3730–7, 2011.
- [22] D. Clemente, M. C. Ortega, C. Melero-Jerez, and F. de Castro, "The effect of glia-glia interactions on oligodendrocyte precursor cell biology during development and in demyelinating diseases.," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 7, p. 268, 2013.
- [23] R. H. Miller, "Regulation of oligodendrocyte development in the vertebrate CNS.," *Prog. Neurobiol.*, vol. 67, no. 6, pp. 451–67, 2002.
- [24] A. Verkhratsky and A. M. Butt, 2013. *Glial physiology and pathophysiology: a handbook*. Wiley-Blackwell John Wiley & Sons, Ltd, p. 560.
- [25] J. Zhang, E. G. Kramer, S. Mahase, D. J. Dutta, V. Bonnamain, A. T. Argaw, and G. R. John, "Targeting oligodendrocyte protection and remyelination in multiple sclerosis.," *Mt. Sinai J. Med.*, vol. 78, no. 2, pp. 244–57.
- [26] J. M. Rodgers, A. P. Robinson, and S. D. Miller, "Strategies for protecting oligodendrocytes and enhancing remyelination in multiple sclerosis.," *Discov. Med.*, vol. 16, no. 86, pp. 53–63, 2013.
- [27] J. T. Ahrends and W. Macklin, "Signaling mechanisms regulating myelination in the central nervous system.," *Neurosci. Bull.*, vol. 29, no. 2, pp. 199–215, 2013.
- [28] C. Taveggia, M. L. Feltri, and L. Wrabetz, "Signals to promote myelin formation and repair.," *Nat. Rev. Neurol.*, vol. 6, no. 5, pp. 276–87, 2010.
- [29] R. White and E.-M. Krämer-Albers, "Axon-glia interaction and membrane traffic in myelin formation.," *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 7, p. 284, 2014.
- [30] L.-J. Chew, W. Coley, Y. Cheng, and V. Gallo, "Mechanisms of regulation of oligodendrocyte development by p38 mitogen-activated protein kinase.," *J. Neurosci.*, vol. 30, no. 33, pp. 11011–27, 2010.
- [31] C. Lugnier, "Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agents," *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 109, no. 3, pp. 366–398, 2006.
- [32] M. Berridge, 2013. *Cell Signalling Biology*. London: Portland Press on behalf of the Biochemical Society, 2014, pp. Cap. 2, 2–10.



- [33] E. Reyes Irisarri, 2007. Fosfodiesterasas del AMPc y del GMPc en el cerebro: Expresión en procesos neuroinflamatorios y neurodegenerativos (Tesis Doctoral). Universitat de Barcelona.
- [34] A. E. Medina, "Therapeutic utility of phosphodiesterase type I inhibitors in neurological conditions," *Front. Neurosci.*, vol. 5, p. 21, 2011.
- [35] F. S. Afshari, A. K. Chu, and C. Sato-Bigbee, "Effect of cyclic AMP on the expression of myelin basic protein species and myelin proteolipid protein in committed oligodendrocytes: differential involvement of the transcription factor CREB," *J. Neurosci. Res.*, vol. 66, no. 1, pp. 37–45, 2001.
- [36] B. Buller, M. Chopp, Y. Ueno, L. Zhang, R. L. Zhang, D. Morris, Y. Zhang, and Z. G. Zhang, "Regulation of serum response factor by miRNA-200 and miRNA-9 modulates oligodendrocyte progenitor cell differentiation," *Glia*, vol. 60, no. 12, pp. 1906–14, 2012.
- [37] T. L. Wood, K. K. Bercury, S. E. Cifelli, L. E. Mursch, J. Min, J. Dai, and W. B. Macklin, "mTOR: a link from the extracellular milieu to transcriptional regulation of oligodendrocyte development," *ASN Neuro*, vol. 5, no. 1, 2013.
- [38] A. P. Robinson, J. M. Rodgers, G. E. Goings, and S. D. Miller, "Characterization of oligodendroglial populations in mouse demyelinating disease using flow cytometry: clues for MS pathogenesis," *PLoS One*, vol. 9, no. 9, 2014.
- [39] M. Podbielska and E. L. Hogan, "Molecular and immunogenic features of myelin lipids: incitants or modulators of multiple sclerosis?," *Mult. Scler.*, vol. 15, no. 9, pp. 1011–29, 2009.
- [40] M. Podbielska, N. L. Banik, E. Kurowska, and E. L. Hogan, "Myelin recovery in multiple sclerosis: the challenge of remyelination," *Brain Sci.*, vol. 3, no. 3, pp. 1282–324, 2013.
- [41] O. Jahn, S. Tenzer, and H. B. Werner, "Myelin proteomics: molecular anatomy of an insulating sheath," *Mol. Neurobiol.*, vol. 40, no. 1, pp. 55–72, 2009.
- [42] P. E. Bermejo Velasco, M. R. Blasco Quílez, A. J. Sánchez López, and A. García Merino, "Enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central. Concepto, clasificación y epidemiología," *Med. - Programa Form. Médica Contin. Acreditado*, vol. 10, no. 75, pp. 5065–5068, 2011.
- [43] J. A. Mendoza Bernal, M. E. Jiménez González, E. Chiquete, and I. F. González Hernández, "Relevancia de la pérdida de volumen cerebral en la esclerosis múltiple e impacto de las terapias modificadoras de la enfermedad en la reducción de la pérdida de volumen cerebral," *Rev. Mex. Neurocienc.*, vol. 14, no. 6, pp. 341–348, 2013.
- [44] V. Hall, N. Murillo, and M. Quesada, 2001. *Esclerosis múltiple y su tratamiento. Eficacia clínica del interferón beta*. Costa Rica: Centro de Información de Medicamentos. Facultad de Farmacia. Universidad de Costa Rica, pp. 2–10.
- [45] J. L. Carretero Ares, W. Bowakim Dib, and J. M. Acebes Rey, "Actualización: esclerosis múltiple," *Medifam*, vol. 11, no. 9, pp. 516–529, 2001.
- [46] D. A. Hafler, J. M. Slavik, D. E. Anderson, K. C. O'Connor, P. De Jager, and C. Baecher-Allan, "Multiple sclerosis," *Immunol. Rev.*, vol. 204, pp. 208–31, 2005.
- [47] R. Dutta and B. D. Trapp, "Relapsing and progressive forms of multiple sclerosis: insights from pathology," *Curr. Opin. Neurol.*, vol. 27, no. 3, pp. 271–8, 2014.



- [48] A. Rubio Jareño, 2002. Inmunogenética de la esclerosis múltiple: estudios de asociación y ligamento en la población española (Tesis Doctoral). Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
- [49] T. Iannitti, B. J. Kerr, and B. K. Taylor, "Mechanisms and pharmacology of neuropathic pain in multiple sclerosis.," *Curr. Top. Behav. Neurosci.*, vol. 20, pp. 75-97, 2014.
- [50] L. S. Mendez Serrano, 2005. Esclerosis múltiple: un problema neuroinmunológico. Facultad de Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana.
- [51] R. Domínguez Moreno, M. Morales Esponda, N. L. Rossiére Echazarreta, R. Olan Triano, and J. L. Gutiérrez Morales, "Esclerosis múltiple : revisión de la literatura médica," *Rev. la Fac. Med. la UNAM*, vol. 55, no. 5, pp. 26-35, 2012.
- [52] P. Pifarré, M. Gutierrez-Mecinas, J. Prado, L. Usero, C. Roura-Mir, M. Giralt, J. Hidalgo, and A. García, "Phosphodiesterase 5 inhibition at disease onset prevents experimental autoimmune encephalomyelitis progression through immunoregulatory and neuroprotective actions.," *Exp. Neurol.*, vol. 251, pp. 58-71, 2014.
- [53] C. González-García, B. Bravo, A. Ballester, R. Gómez-Pérez, C. Eguiluz, M. Redondo, A. Martínez, C. Gil, and S. Ballester, "Comparative assessment of PDE 4 and 7 inhibitors as therapeutic agents in experimental autoimmune encephalomyelitis.," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 170, no. 3, pp. 602-13, 2013.
- [54] Y. A. Syed, A. Baer, M. P. Hofer, G. A. González, J. Rundle, S. Myrta, J. K. Huang, C. Zhao, M. J. Rossner, M. W. B. Trotter, G. Lubec, R. J. M. Franklin, and M. R. Kotter, "Inhibition of phosphodiesterase-4 promotes oligodendrocyte precursor cell differentiation and enhances CNS remyelination.," *EMBO Mol. Med.*, vol. 5, no. 12, pp. 1918-34, 2013.
- [55] O. A. H. Reneerkens, K. Rutten, H. W. M. Steinbusch, A. Blokland, and J. Prickaerts, "Selective phosphodiesterase inhibitors: a promising target for cognition enhancement.," *Psychopharmacology (Berl.)*, vol. 202, no. 1-3, pp. 419-43, 2009.
- [56] D. H. Maurice, H. Ke, F. Ahmad, Y. Wang, J. Chung, and V. C. Manganiello, "Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases.," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 13, no. 4, pp. 290-314, 2014.
- [57] M. F. Azevedo, F. R. Faucz, E. Bimpaki, A. Horvath, I. Levy, R. B. de Alexandre, F. Ahmad, V. Manganiello, and C. A. Stratakis, "Clinical and molecular genetics of the phosphodiesterases (PDEs).," *Endocr. Rev.*, vol. 35, no. 2, pp. 195-233, 2014.
- [58] D. Puzzo, S. Sapienza, O. Arancio, and A. Palmeri, "Role of phosphodiesterase 5 in synaptic plasticity and memory.," *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, vol. 4, no. 2, pp. 371-87, 2008.
- [59] K. S. Murthy, "Activation of phosphodiesterase 5 and inhibition of guanylate cyclase by cGMP-dependent protein kinase in smooth muscle.," *Biochem. J.*, vol. 360, no. Pt 1, pp. 199-208, 2001.
- [60] G. Chen, H. Wang, H. Robinson, J. Cai, Y. Wan, and H. Ke, "An insight into the pharmacophores of phosphodiesterase-5 inhibitors from synthetic and crystal structural studies.," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 75, no. 9, pp. 1717-28, 2008.
- [61] V. Boswell-Smith, D. Spina, and C. P. Page, "Phosphodiesterase inhibitors.," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 147 Suppl , pp. S252-7, 2006.



- [62] W. E. Knight and C. Yan, "Cardiac cyclic nucleotide phosphodiesterases: function, regulation, and therapeutic prospects," *Horm. Metab. Res.*, vol. 44, no. 10, pp. 766–75, 2012.
- [63] M. de J. R. Rosas Romero, R. Campos Cerda, and J. E. Morales Blanhir, "Sildenafil e inhibidores de fosfodiesterasa en hipertensión pulmonar," *Neumol. Cir. Torax*, vol. 65, no. 4, pp. 186–200, 2006.
- [64] P. Pifarre, J. Prado, M. A. Baltrons, M. Giralt, P. Gabarro, D. L. Feinstein, J. Hidalgo, and A. Garcia, "Sildenafil (Viagra) ameliorates clinical symptoms and neuropathology in a mouse model of multiple sclerosis.," *Acta Neuropathol.*, vol. 121, no. 4, pp. 499–508, 2011.
- [65] F. J. van der Staay, K. Rutten, L. Bärfaker, J. Devry, C. Erb, H. Heckroth, D. Karthaus, A. Tersteegen, M. van Kampen, A. Blokland, J. Prickaerts, K. G. Reymann, U. H. Schröder, and M. Hendrix, "The novel selective PDE9 inhibitor BAY 73-6691 improves learning and memory in rodents.," *Neuropharmacology*, vol. 55, no. 5, pp. 908–18, 2008.
- [66] F. H. da Silva, M. N. Pereira, C. F. Franco-Penteado, G. De Nucci, E. Antunes, and M. A. Claudino, "Phosphodiesterase-9 (PDE9) inhibition with BAY 73-6691 increases corpus cavernosum relaxations mediated by nitric oxide-cyclic GMP pathway in mice.," *Int. J. Impot. Res.*, vol. 25, no. 2, pp. 69–73.
- [67] F. Wunder, A. Tersteegen, A. Rebmann, C. Erb, T. Fahrigr, and M. Hendrix, "Characterization of the first potent and selective PDE9 inhibitor using a cGMP reporter cell line.," *Mol. Pharmacol.*, vol. 68, no. 6, pp. 1775–81, 2005.
- [68] C. F. Dos Santos, V. T. Sakai, M. A. de A. M. Machado, D. N. Schippers, and A. S. Greene, "Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry.," *J. Appl. Oral Sci.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–11, 2004.
- [69] S. Bustin, 2004. *IUL Biotechnology Series*. La Jolla, California: International University Line.
- [70] Ll. Technologies, 2013. *Introducción a la PCR en Tiempo Real*. Life technologies, pp. 3–22.
- [71] L. Tamay de Dios, C. Ibarra, and C. Velasquillo, "Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real," *Investig. en Discapac.*, vol. 2, pp. 70–78, 2013.
- [72] A. Chandelier, K. Ivors, M. Garbelotto, J. Zini, F. Laurent, and M. Cavalier, "Validation of a real-time PCR method for the detection of *Phytophthora ramorum*1," *EPPO Bull.*, vol. 36, pp. 409–414, 2006.
- [73] S. Broeders, I. Huber, L. Grohmann, G. Berben, I. Taverniers, M. Mazzara, N. Roosens, and D. Morisset, "Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 37, no. 2, pp. 115–126, 2014.
- [74] K. J. Torres, P. Göttle, D. Kremer, J. F. Rivera, L. Aguirre-Cruz, T. Corona, H.-P. Hartung, and P. Küry, "Vinpocetine inhibits oligodendroglial precursor cell differentiation.," *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 30, no. 3, pp. 711–22, 2012.