



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

**Validación de RT-PCR cuantitativa para genes de mielina y
reguladores negativos de mielina en células
oligodendrogliales de rata**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

Angélica Raquel Alor Vilchis



Cd. Mx., 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes

Vocal: Dr. Javier Andrés Juárez Díaz

Secretario: Dra. Klinty Julieta Torres Hernández

1er suplente: Dra. Verónica Garrocho Villegas

2do suplente: Dr. Alberto Ortega Vázquez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias INER. Ismael Cosío Villegas. Calz de Tlalpan 4502, Belisario Domínguez Sección XVI, 14080 Tlalpan, CDMX

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Klinty Julieta Torres Hernández

SUSTENTANTE:

Angélica Raquel Alor Vilchis

ÍNDICE

1. RESUMEN	6
2. ANTECEDENTES GENERALES	7
2.1. Células del Sistema Nervioso Central.....	7
2.1.1. Sistema Nervioso Central	7
2.1.2. Barrera hematoencefálica.....	9
2.1.3. Células y funciones del sistema nervioso central	10
2.1.3.1. Neuronas.....	11
2.1.3.2. Astrocitos.....	13
2.1.3.3. Oligodendrocitos.....	15
2.1.3.4. Microglía	19
2.1.3.5. Células endimarias	20
2.1.3.6. Pericito y células endoteliales.....	22
2.1.3.7. Células madre neurales.....	24
2.2. Mielina.....	26
2.2.1. Estructura y función de la mielina	26
2.2.2. Genes de mielina	28
2.2.3. Síntesis de Mielina.....	31
2.3. Genes reguladores de la expresión de mielina	33
2.3.1. Genes reguladores positivos	33
2.3.2. Genes reguladores negativos	35
2.4 Desmielinización viral	37
2.4.1. Desmielinización.....	37
2.4.2. Vías de entrada de los virus al SNC	39
2.4.3. Principales virus desmielinizantes	40
2.4.4. Expresión de genes de mielina en las infecciones virales	44
2.5. Desmielinización por Herpes Virus Humano-6 (HHV6).....	46
2.5.1. HHV6	46
2.5.2. Infección de oligodendrocitos por HHV6.....	50
2.5.3. Desmielinización asociada a HHV6	52
2.6. Validación por PCR en tiempo real	54
2.6.1. PCR en tiempo real	54
2.6.2. Diseño de cebadores.....	60
2.6.3. Sistemas de detección.....	62
2.6.4. Proceso de validación de PCR en tiempo real	64
2.6.4.1 Validar el diseño de los cebadores:.....	64
2.6.4.2 Optimizar la concentración de cada cebador:	65
2.6.4.3 Optimización de la temperatura de alineamiento de los primers.	66
2.6.4.4 Optimización de los componentes de la reacción.	67
2.6.4.5 Validación de la especificidad del ensayo por curva Melt y análisis de rendimiento por curva estándar.....	67
2.6.5. Criterios de validación	70
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	72
4. HIPÓTESIS.....	72

5. OBJETIVOS	73
5.1. General	73
5.2. Particulares	73
6. MATERIALES Y MÉTODOS	74
6.1 Desarrollo del proyecto	74
6.2 Animales de laboratorio y obtención de cerebros	74
6.3 Cultivo celular.....	75
6.4 Cultivo de HHV6	76
6.5 Infección de oligodendrocitos con HHV6.....	76
6.6 Extracción de RNA	76
6.7 Transcripción reversa	78
6.8 PCR en tiempo real (qPCR)	78
6.9 Cebadores y cálculo del tamaño de amplicón.....	78
6.10 Análisis estadístico	79
6.11 Panel de genes seleccionados para validación.....	79
7. RESULTADOS.....	81
7.1 Validación	81
7.1.1 Genes estándar.....	82
7.1.3 CNP.....	84
7.1.4 MBP	86
7.1.5 PLP	88
7.1.6 MOG.....	90
7.1.7 p57kip2.....	92
7.1.8. ID2.....	94
7.1.9 ID4.....	96
7.1.10 Hes 1	98
7.1.11 Hes 5.....	100
7.1.12 Rock 2.....	102
7.2 Resultados generales obtenidos de las curvas globales de validación.....	104
7.3 Análisis de los productos de qPCR obtenidos durante la validación mediante electroforesis en gel de agarosa.....	105
7.3. Muestras infectadas con HHV6 y controles	108
7.3.1 Análisis estadístico. Prueba de <i>t pareada</i>	112
8. DISCUSIÓN	113
8.1 Validación	113
8.1.1 Genes constitutivos	114
8.1.2 Genes de mielina.	115
8.1.3 Reguladores negativos de mielina	116
8.1.4 Análisis los productos amplificados por PCR obtenidos de la validación por electroforesis en gel de agarosa	118
8.2 Muestras infectadas con HHV6 y controles	118
9. CONCLUSIONES.....	119
10. PERSPECTIVAS.....	119
10. REFERENCIAS.....	120

11. ANEXOS	126
11.1 Índice de figuras	126
11.2 Índice de tablas	128

1. RESUMEN

Las infecciones virales en el sistema nervioso central son muy raras. Las inflamaciones agudas son los padecimientos más comunes asociados a los virus (encefalitis, mielitis y encefalomielitis virales). Sin embargo, la presencia de virus en enfermedades crónicas como la esclerosis múltiple, la epilepsia o Leucoencefalopatía multifocal progresiva, no señalan a los virus como agentes causales, sino como activadores de episodios de progresión de estas enfermedades.

La esclerosis múltiple es de naturaleza discapacitante, produce daño degenerativo crónico del sistema nervioso central que conlleva a parálisis muscular y en algunos casos, a demencia, dependencia familiar y finalmente a la muerte del paciente. Afecta tanto a hombres como mujeres en todo el mundo dentro de un intervalo amplio de edad. Aunque la etiología de estos padecimientos es multifactorial, con predominio de signos inmunológicos, se ha encontrado relación de agentes virales que incrementan los estados inflamatorios crónicos en el sistema nervioso central, que pueden estar implicados en el desarrollo de este tipo de enfermedades. En algunos pacientes con esclerosis múltiple, se han detectado partículas virales del virus Herpes Virus Humano-6 (HHV6) en líquido cefalorraquídeo y en muestras de cerebro. Sin embargo, particularmente se desconoce el efecto que tiene la infección de oligodendrocitos, células productoras de mielina, con HHV6 en la síntesis de genes de mielina y su impacto en el desarrollo de EM. Existen genes reguladores negativos de la expresión de mielina. La evaluación de estos genes se ha asociado a una menor producción de mielina cuando se sobreexpresan. El objetivo de este trabajo es estandarizar una metodología por PCR en tiempo real para la cuantificación de la expresión de los genes de mielina y los genes reguladores negativos en células oligodendrogiales infectadas con HHV6.

Para la validación de esta metodología se obtuvo RNA de oligodendrocitos de rata que fueron cultivados y purificados. Se realizaron ensayos de PCR en tiempo real para la cuantificación de los genes de mielina (*CNPasa*, *MBP*, *MOG*, *PLP*) y reguladores negativos (*Hes1*, *Hes5*, *Id2*, *Id4*, *rock2*, *p57Kip2*), además de dos genes de expresión constitutiva (*GAPDH* y *beta-tubulina*). *Gapdh*, *β tubulina*, *cnp*, *mbp*, *mog*, *hes 5*, *rock2* y *p57kip2* aprobaron la validación de la técnica permitiendo así, realizar futuros estudios en este modelo de infección que permitan conocer más sobre el mecanismo molecular de la infección tanto con HHV6 como otros virus de tropismo similar en células precursoras de oligodendrocitos.

2. ANTECEDENTES GENERALES

2.1. Células del Sistema Nervioso Central

2.1.1. Sistema Nervioso Central

El sistema nervioso es una red de estructuras especializadas en detectar estímulos tanto del ambiente interno y como el ambiente externo de un organismo. Controla y regula la función de los diversos órganos y sistemas presentes. Funcional y anatómicamente se divide en dos partes: el sistema nervioso periférico (SNP), formado por los nervios periféricos y el sistema nervioso central (SNC), el cual consta del encéfalo y la médula espinal (Nieuwenhuys et al. 2009).

El SNC es la unidad funcional y estructural del sistema nervioso y es capaz de integrar, de evaluar los impulsos neurales provenientes desde el SNP, y enviar una respuesta específica (Patton, 2015). Anatómicamente, el encéfalo se encuentra en la cavidad craneal y se divide en cuatro zonas generales (cerebro, cerebelo, tallo cerebral y diencefalo). La médula espinal se conecta desde el encéfalo al canal vertebral y se extiende hasta la segunda vértebra lumbar (Figura 1) (Purves y Williams; Nieuwenhuys et al. 2001). A su vez estructuralmente, la cavidad craneal se divide en cuatro ventrículos conectados entre sí (Figura 2). El sistema ventricular consta de dos ventrículos laterales localizados a lo largo de los hemisferios cerebrales derecho e izquierdo. El tercer y cuarto ventrículo se sitúan debajo del tálamo, entre el tronco cerebral y el cerebelo (Crossman, Neary y Crossman, no date; Purves y Williams, 2001).

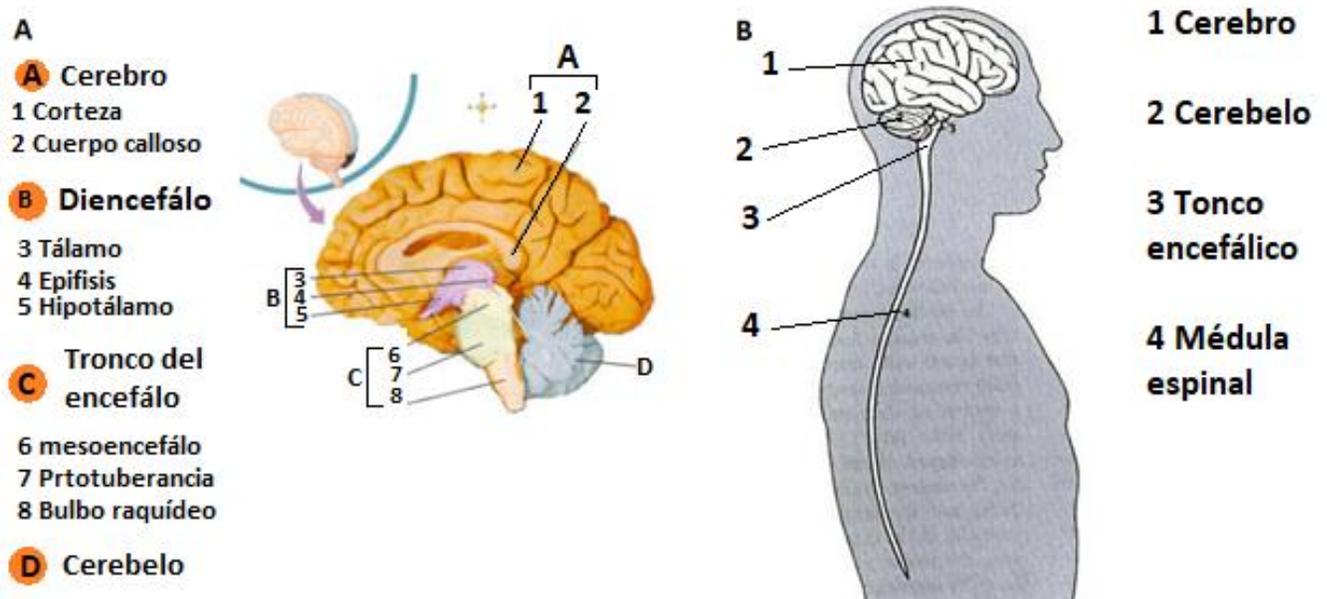


Figura 1. Anatomía del sistema nervioso central

Partes anatómicas del encéfalo. B) Encéfalo y médula espinal. Modificado de *Thibodeau GA, Patton KT. Anatomía y Fisiología 6a Ed. Madrid. Editorial Elsevier España, S.A 2007. p. 483*

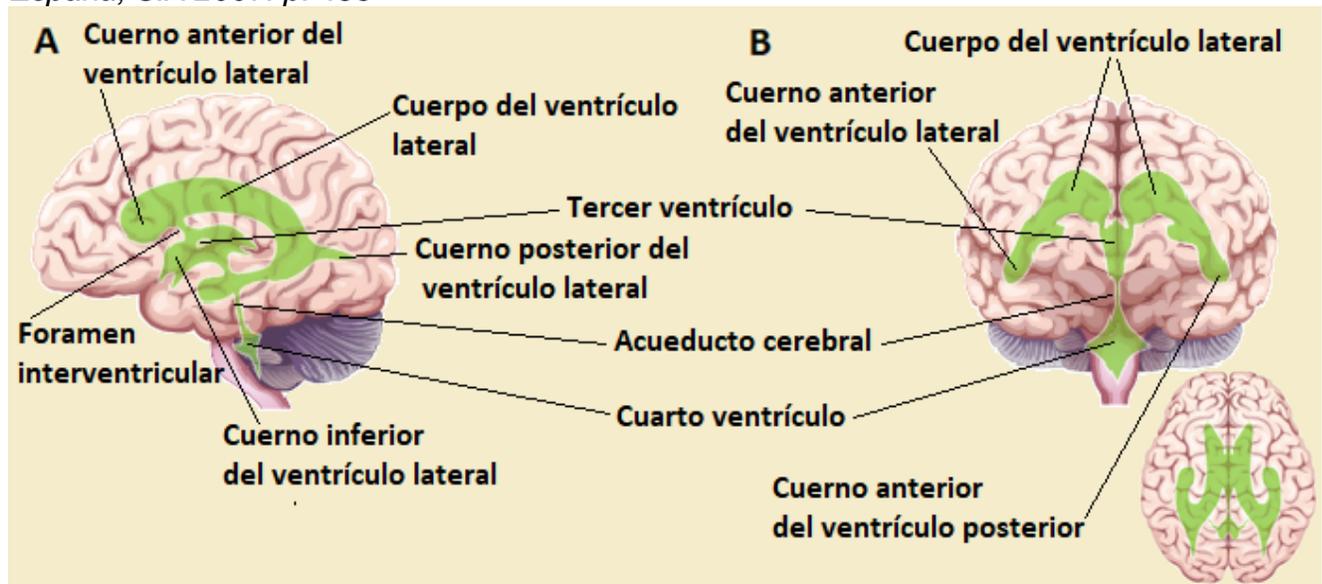


Figura 2. Diagrama del sistema ventricular cerebral

A) Vista frontal del sistema ventricular. B) Vista superior del sistema ventricular. Modificado de *Jallo, George I., James E. (James Edmond) Conway, and László Bognár. y. Neuroendoscopy of the Central Nervous System.*

2.1.2. Barrera hematoencefálica

La barrera hematoencefálica es una barrera fisiológica de protección presente en los vasos sanguíneos que vascularizan el SNC. Está conformada por astrocitos, células endoteliales microvasculares y pericitos (Al-Obaidi et al. 2018). Su principal función es controlar y regular selectivamente el movimiento de iones, nutrientes, moléculas y células entre la sangre y el encéfalo, garantizando un microambiente interno estable y óptimo para la correcta función de las células que forman el SNC (Abbott, Rönnbäck y Hansson, 2006). Adicionalmente, protege el tejido neural de toxinas y patógenos que pudieran presentarse en circulación sanguínea (Daneman y Prat, 2015). La permeabilidad tan restringida de la barrera hematoencefálica se debe, en parte, a la morfología de los vasos capilares que tienen contacto con el SNC que, a diferencia del resto, presentan uniones estrechas entre las células endoteliales formando una monocapa continua sin porosidades y a las asociaciones astrocito-endotelio vascular que forman estructuras tipo barrera alrededor de los capilares sanguíneos llamadas *pies de astrocitos* (Figura 3). Esto aumenta considerablemente la resistencia al paso de ciertas sustancias entre la sangre y el SNC (Abbott, Rönnbäck, y Hansson 2006; Davson, 1993). La barrera hematoencefálica mantiene un estricto control del flujo de moléculas que pueden ingresar y salir del SNC. Las vías de entrada de moléculas al SNC a través de la barrera hematoencefálica se clasifican en cinco principales, (Figura 3: (1) La ruta paracelular; (2) Ruta lipofílica transcelular; (3) Ruta por transporte de proteínas; (4) Ruta mediada por transcitosis y (5) Transcitosis adsorptiva). La ruta paracelular acuosa, donde exclusivamente moléculas de tamaño muy pequeño y solubles en agua pueden atravesar por adsorción entre célula y célula, esta ruta se encuentra bastante restringida que en el resto de los vasos capilares debido a las uniones estrechas entre las células endoteliales.

La ruta lipofílica transcelular, donde moléculas de tamaño pequeño y liposolubles pueden atravesar y difundir en la célula endotelial y llegar al SNC como son O₂, CO₂, etanol y algunos fármacos barbitúricos. Mediante transportadores específicos de proteínas que necesitan atravesar la barrera hematoencefálica desde la luz

vascular hacia el interior del SNC. Y por último, las rutas de transcitosis y transcitosis adsortiva consisten en la formación de vesículas como medio de transporte (Abbott, Rönnbäck y Hansson, 2006).

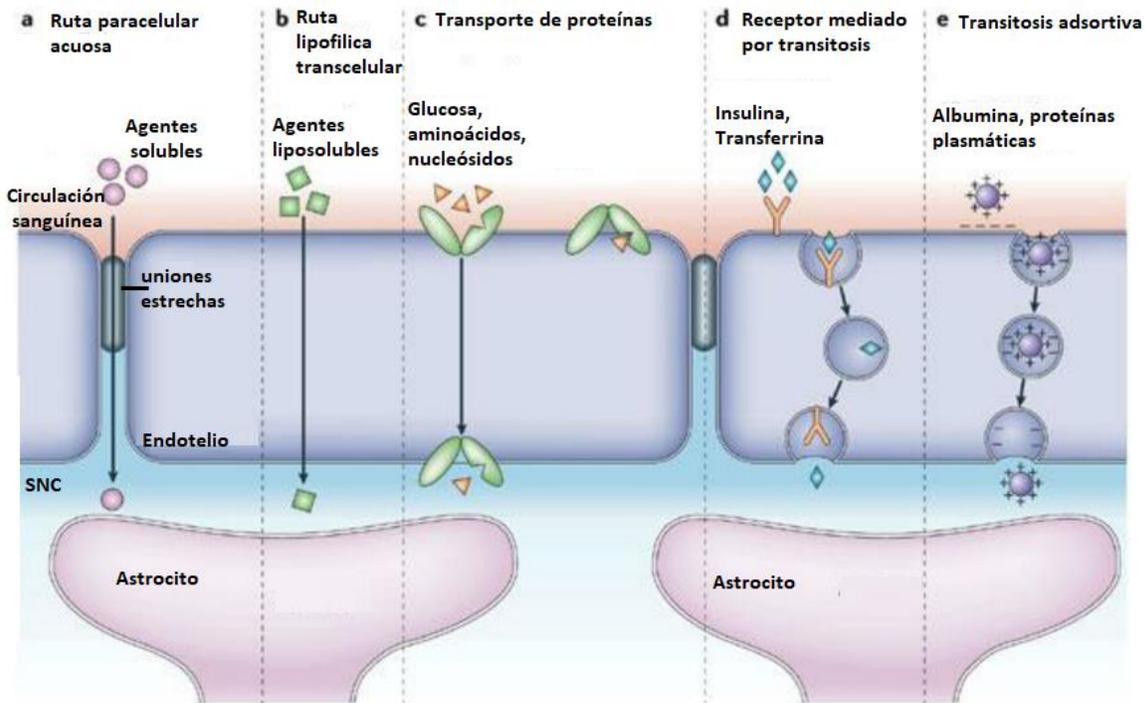


Figura 3. Estructura y vías de permeabilidad de la barrera hemato-encefálica

Modificado de Nature Reviews Neuroscience: Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006) *Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier*. Nat Rev Neurosci 7: 41-53

2.1.3. Células y funciones del sistema nervioso central

El SNC se compone de dos grandes grupos de células: las neuronas y las células de la glía. Las neuronas son capaces de recibir y procesar información mediante impulsos eléctricos. Constituyen cerca del 10% de la población celular del sistema nervioso (Ndubaku and de Bellard, 2008; Patton, 2015) mientras que las células de la glía se dividen en macroglía y microglía. La macroglía, también conocida como *neuroglía*, se compone de astrocitos, células endimarias y oligodendrocitos en el SNC (Armati y Mathey 2010; Patton 2015). La microglía, en contraste, son las células del sistema inmunológico encargadas de proteger y reparar el SNC (Jacobson y Marcus, 2009).

Las células madre neurales son las precursoras de las neuronas, los astrocitos y los oligodendrocitos, mientras que la microglía proviene de la línea mieloide que fueron integradas al SNC durante el desarrollo neural.

2.1.3.1. Neuronas

Las neuronas son, por excelencia, la base estructural y funcional del sistema nervioso debido a su capacidad de ser excitables mediante impulsos eléctricos. El papel de cada neurona es recibir, procesar y propagar los impulsos eléctricos a otra neurona. Anatómicamente, la neurona se puede dividir en tres zonas: (1) el cuerpo celular con un núcleo definido que contiene el DNA en sus cromosomas, (2) las dendritas, que son proyectadas desde el cuerpo celular al exterior, siendo cerca de diez mil por neurona y (3) finalmente, el axón, conformado por una prolongación desde el cuerpo celular hasta el polo opuesto a las dendritas (Figura 4). El axón permite transmitir los impulsos eléctricos de una neurona hasta otra gracias a que en su parte final cuenta con ramificaciones que se conectan a las dendritas de otras neuronas mediante los llamados botones sinápticos. (Patton, 2015).

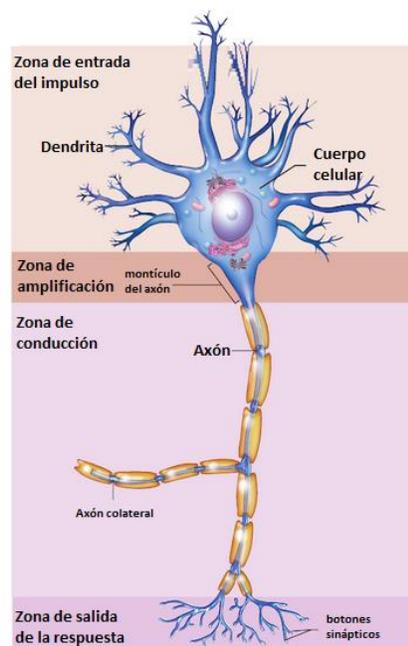


Figura 4. Estructura de la neurona.

Modificado de Patton, Kevin T. 2015. *Anatomy and Physiology*. Elsevier Health Sciences.

Las neuronas se pueden clasificar con base en su estructura, en su función o en el tipo de neurotransmisores que liberan. Para la clasificación por estructura se toma en cuenta la orientación del axón y las dendritas con referencia al cuerpo celular por lo que pueden ser multipolares, bipolares o pseudo unipolares (Figura 5). Cuando se clasifican por función, se tienen tres grupos: las neuronas motoras o eferentes, las neuronas sensibles o aferentes y las interneuronas. Las primeras son las encargadas de enviar la señal desde el SNC hasta los músculos para que realicen contracciones o relajamientos. Las neuronas sensoriales tienen la función de recabar información del ambiente interno y externo del organismo e informar de ello al SNC y, por último, las interneuronas, son las responsables de conectar la información recabada por las neuronas sensoriales y enviar la información a las células eferentes (Patton, 2015).

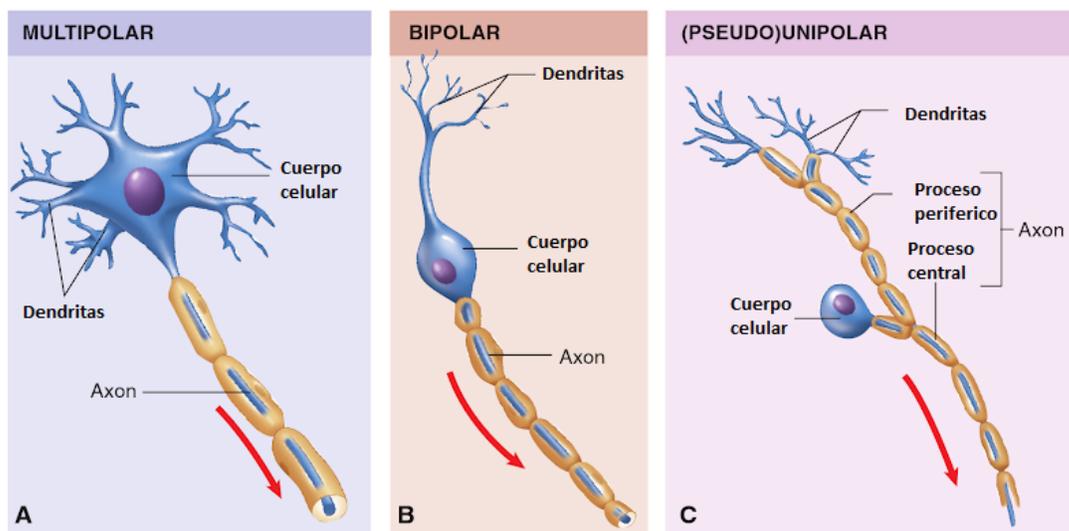


Figura 5. Clasificación estructural de las neuronas.

- A. Neurona multipolar, Cuenta con múltiples extensiones desde el cuerpo celular.
 - B. Neurona bipolar, Cuenta con exactamente dos extensiones desde el cuerpo ubicadas en polos opuestos.
 - C. Neurona unipolar, neurona que cuenta únicamente con una extensión a partir del cuerpo celular.
- Modificado de Patton, Kevin T. 2015. *Anatomy and Physiology*. Elsevier Health Sciences.

Las neuronas pueden liberar distintos neurotransmisores al ambiente sináptico. Por lo tanto, se pueden clasificar en cuatro tipos principales: colinérgicas, adrenérgicas, dopaminérgicas y gabaérgicas (Patton, 2015).

2.1.3.2. *Astroцитos*

Los astroцитos son las células de la macroglía más abundantes del SNC (Allen y Eroglu, 2017). Están ubicados en el espacio entre las neuronas y los capilares sanguíneos. Estructuralmente son células pequeñas que presentan forma de “estrella”, de ahí su nombre. Entre sus diversas funciones se encuentra permitir el flujo de glucosa desde la sangre hacia las neuronas, regular la concentración de iones, principalmente Na^+ y K^+ , del ambiente extracelular durante la actividad neuronal, coordinan la formación de nuevas neuronas y conexiones neuronales en el desarrollo del sistema nervioso. Además, forman vías de señalización entre astroцитos que les permiten enviar y procesar señales entre ellos (Patton, 2015). Adicionalmente, los astroцитos forman estructuras en forma de red alrededor de los vasos capilares que vascularizan al SNC conocidas como pies de astroцитos, formando parte de la barrera hematoencefálica (Figura 6) (Davson, 1993). Aunque todos los astroцитos comparten propiedades comunes, estudios recientes de perfiles fisiológicos y de expresión génica aseguran que los astroцитos son una población de células mucho más diversa de lo que se creía y presentan propiedades distintas según el estadio del desarrollo y la región del cerebro en la que se encuentren (Allen y Eroglu, 2017). Los astroцитos se clasifican en dos grupos principales de acuerdo con su morfología y ubicación (Allen y Eroglu, 2017). El primer grupo contiene a los astroцитos espesos presentes en la materia gris. Se encuentran altamente ramificados para permitirles rodear las neuronas sinápticas además de estar en contacto directo con los vasos sanguíneos a través de un compartimento celular especializado llamado fin de pie.

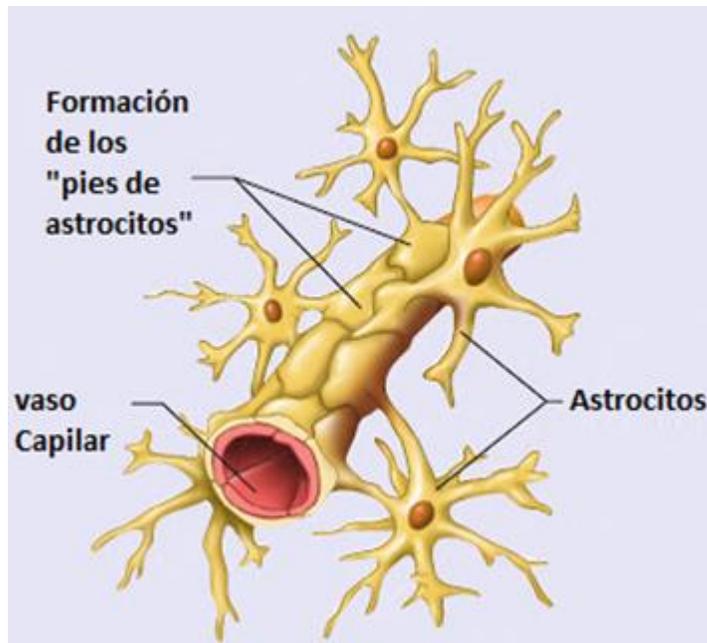


Figura 6. Pies de astrocitos formando parte de la barrera hemato-encefálica

Los Astrocitos presentan una morfología de “estrella” con varias protuberancias o ramificaciones proyectadas desde el cuerpo celular al exterior que utilizan para anclarse a diversos sitios sobre la pared de los vasos capilares del SNC. De esta manera proveen resistencia a la barrera hematoencefálica. Modificado de Patton, Kevin T. 2015. *Anatomy and Physiology*. Elsevier Health Sciences.

El segundo grupo, es el de los astrocitos fibrosos presentes en la materia blanca. Se encuentran asociados a axones mielinizados. Los astrocitos rodean los cuerpos celulares neuronales a la par de la vasculatura por lo que están estrechamente asociados a la sinapsis. Las interacciones astrocito-sinapsis es de suma importancia para el proceso de sinapsis en distintas regiones del SNC debido a que los astrocitos liberan señales sinaptogénicas que favorecen el número de interacciones neurona-neurona y la cantidad de sinapsis registradas. Estudios en roedores y otras especies como *C. elegans* y *D. melanogaster* demuestran el papel crucial de los astrocitos en la formación y en la fuerza de la sinapsis neuronal. Algunas señales de los astrocitos, como el colesterol dirigen la liberación de neurotransmisores críticos en la sinapsis (Allen y Eroglu, 2017).

2.1.3.3. Oligodendrocitos

Los oligodendrocitos son células más pequeñas que los astrocitos y son más abundantes que las neuronas en el SNC (Patton, 2015). Los oligodendrocitos maduros son capaces de producir mielina, una capa lipoproteica que recubre parte de la longitud axonal en forma de vainas espaciadas conocidas como vainas de mielina (Figura 7). Los oligodendrocitos se ubican en filas dentro de las fibras nerviosas de los axones donde establecen una interacción oligodendrocito-axón a través de internodos produciendo así, la mielinización axonal. Un oligodendrocito individual puede presentar cerca de sesenta segmentos internodales con los axones de varias neuronas a la vez (Armati y Mathey 2010; Patton, 2015). Los oligodendrocitos maduros se generan a partir de células progenitoras conocidas como precursores de oligodendrocitos (OPC), las cuales son células indiferenciadas presentes en el SNC tanto de roedores como de humanos desde el comienzo del desarrollo embrionario.

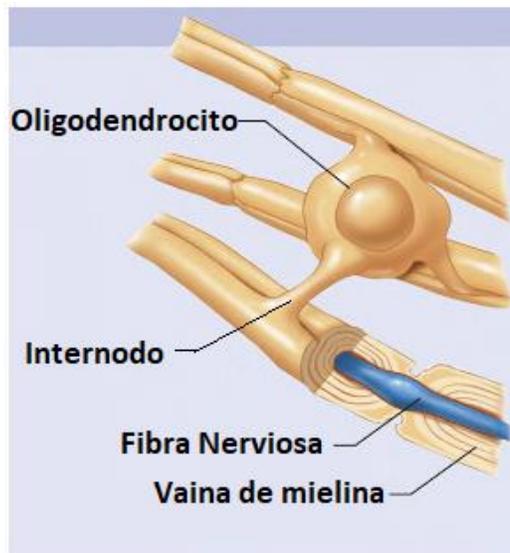


Figura 7. Interacción entre un oligodendrocito y la superficie axonal

Un oligodendrocito puede asociarse a distintos axones a través de sus ramificaciones formando internodos que le permiten construir las vainas de mielina en estos axones. La superficie libre entre cada vaina de mielina es conocida como nódulo de Ranvier. Modificado de Patton, Kevin T. 2015. *Anatomy and Physiology*. Elsevier Health Sciences.

Una vez que se producen los OPC dentro de lugares concretos en el tubo neural, estas células migran y se distribuyen por todo el SNC. Una vez en su sitio destino, comienzan las etapas de diferenciación oligodendrogliales claramente marcadas por cambios morfológicos y en su capacidad de migración, de proliferación y de diferenciación (Almazán *et al.*, 2001). Las fases de maduración se componen de cuatro estados: OPCs, pre oligodendrocitos, oligodendrocitos inmaduros y finalmente oligodendrocitos maduros (Figura 8). Los principales marcadores de cada etapa se resumen en la Tabla 1.

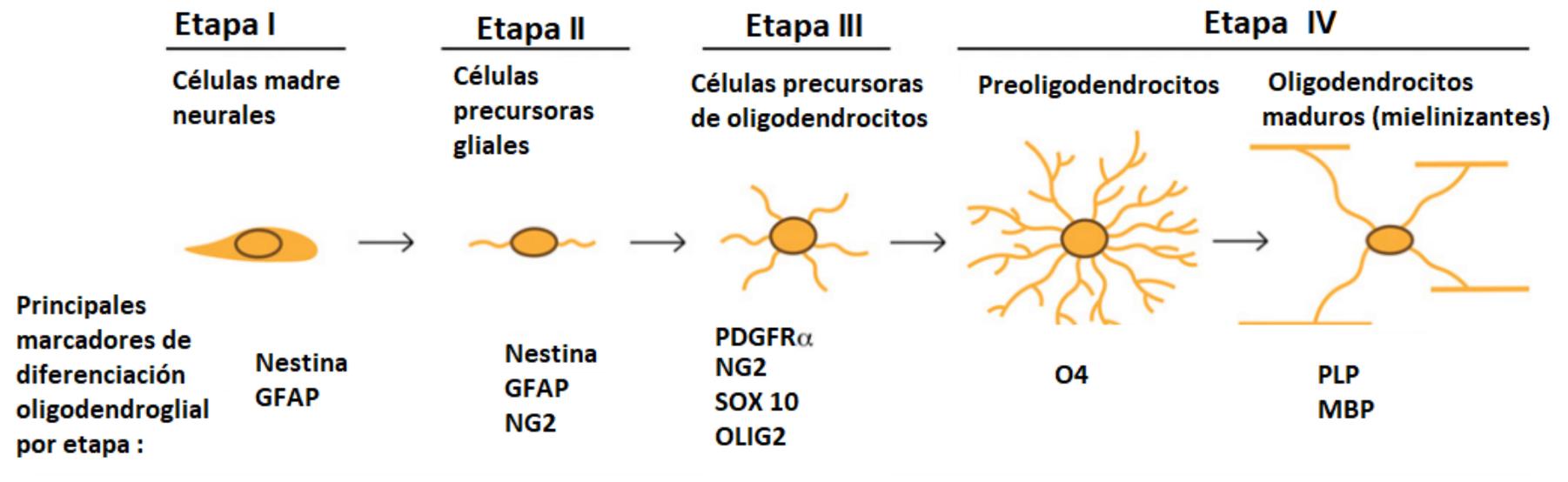


Figura 8. Etapas de diferenciación oligodendroglial y sus principales marcadores.

Las células madre neurales no presentan ramificaciones, expresan Nestina y GFAP. Mientras que las OPCs presentan una morfología bipolar con dos ramificaciones en cada polo. Los pre-oligodendrocitos comienzan a ser más ramificados, sin embargo, son ramificaciones escasas. Los oligodendrocitos inmaduros y maduros, presentan abundantes ramificaciones. *Modificado de Lee, Jae Young et al. 2017. "Overcoming Monocarboxylate Transporter 8 (MCT8)-Deficiency to Promote Human Oligodendrocyte Differentiation and Myelination.*

Tabla 1. Principales marcadores de maduración en las células oligodendrogliales.

Marcador	Etapa en la que se expresa	Referencias
Nestina	Precursores de células neurales	(Almazán <i>et al.</i> , 2001; Lee <i>et al.</i> , 2017; Patro, Naik y Patro, 2018)
proteína fibrilar ácida de la glia (GFAP)	Precursores de células neurales y astrocitos.	
B-III tubulina	Neuronas	
Proteína asociada a microtúbulos 2. (MAP2)	Neuronas	
Región determinante del sexo Y box 10 (SOX10)	Precursores de oligodendrocitos OPCs	
Factor de transcripción oligodendrocítico (OLIG2)	Precursores de oligodendrocitos OPCs	
receptor de tipo alfa para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR α)	Células precursoras gliales	
Antígeno glial neural 2 (NG2)	Células precursoras gliales Precursores de oligodendrocitos OPCs	
Cerebrósido sulfátido O4	Pre- oligodendrocitos	
Proteínas de mielina MBP y PLP	Oligodendrocitos maduros	

En las primeras dos etapas de maduración de los oligodendrocitos, las células aún conservan su capacidad migratoria y proliferativa; sin embargo, ambas se van perdiendo a medida que la célula se va diferenciando hacia un oligodendrocito maduro. Los OPC se caracterizan por la expresión del receptor tipo alfa para el factor de crecimiento derivado de plaquetas PDGFR α , el gangliósido A2B5 o el neuroglicano condroitín sulfato NG2. A partir de los OPC se forman primero los preoligodendrocitos que presentan más ramificaciones que los OPC pero son cortas. Expresan marcadores nuevos como el cerebrósido O4 y la proteína GPR17. A continuación, estos se diferencian a oligodendrocitos inmaduros que pierden la expresión de PDGFR α , A2B5, y NG2, pero continúan expresando O4. También comienzan a expresar GalC y CNPasa convirtiéndose en células postmitóticas con largas ramificaciones. Por último, se forman oligodendrocitos maduros que expresan componentes de mielina como PLP, MBP, MAG y MOG (Almazán *et al.*, 2001; Patro, Naik y Patro, 2018).

2.1.3.4. Microglía

Las células de la microglía son las células del sistema inmunológico pertenecientes al SNC. Los progenitores de las células microgliales (monocitos) tienen su origen en el mesodermo durante el desarrollo embrionario, a diferencia de los progenitores de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos, que provienen del ectodermo (Ndubaku y Bellard, 2008). Los monocitos que ingresan a el encéfalo durante el desarrollo neural, quedan atrapados después de la formación de la barrera hematoencefálica y atraviesan una fase intermediaria de diferenciación amoeboide microglial. Posteriormente, termina su maduración hacia células de la microglía. Las células de la microglía tienen la capacidad de activarse en macrófagos con MHC de clase I y convertirse en microglía reactiva como macrófagos con MHC de clase II con la capacidad de fagocitar agentes patógenos que amenacen el SNC (Jacobson y Marcus, 2007). Morfológicamente son las células gliales más pequeñas de todas las células de soporte y presentan un núcleo ovoide o triangular y pequeñas ramificaciones (Figura 9). Se clasifican en dos grupos con base en su localización. El primer grupo contiene a los conocidos como pericitos perivasculares y el segundo

grupo se conoce como parénquima. Los pericitos se encuentran asociados a los capilares vasculares de forma externa al endotelio y están envueltos en una lámina basal. El resto de las células de la microglía se encuentran distribuidas a lo largo de todo el SNC (Ndubaku y Bellard, 2008).

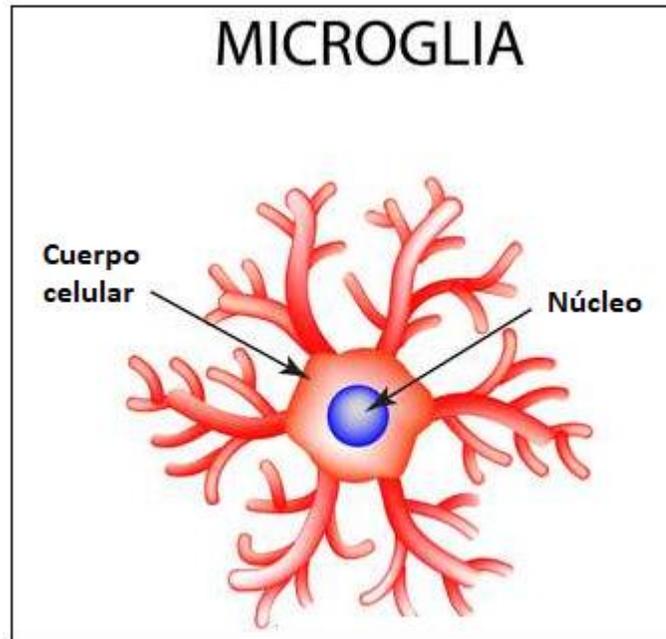


Figura 9. Células de la microglía.

Las células de la microglía son células generalmente estacionarias que se encuentran en el sistema nervioso central. Sin embargo, en el tejido cerebral dañado o inflamado pueden moverse, ramificarse al ser activadas y ser capaces de fagocitar patógenos o debris celular. Por lo cual defienden y reparan parte del SNC. Modificado de Patton, Kevin T. 2015. *Anatomy and Physiology*. Elsevier Health Sciences.

2.1.3.5. Células endimarias

Las células endimarias son células gliales que se asemejan a las células epiteliales del SNC. Su función es crear una barrera entre el flujo sanguíneo y el líquido encefalorraquídeo formando una capa continua y delgada que recubre las paredes de los ventrículos cerebrales (ventrículos laterales, tercer y cuarto ventrículo) y el conducto central de la médula espinal (Hammond, 2001). Su morfología es cilíndrica o cuboide (Figura 10), y en algunos casos pueden presentar

cilios móviles que mantienen el fluido circulando dentro de estas cavidades. Se dividen en dos secciones, una región apical en contacto con el líquido encefalorraquídeo y una región rica en microvellosidades en contacto con la capa basal (Hammond, 2001; Patton, 2015)

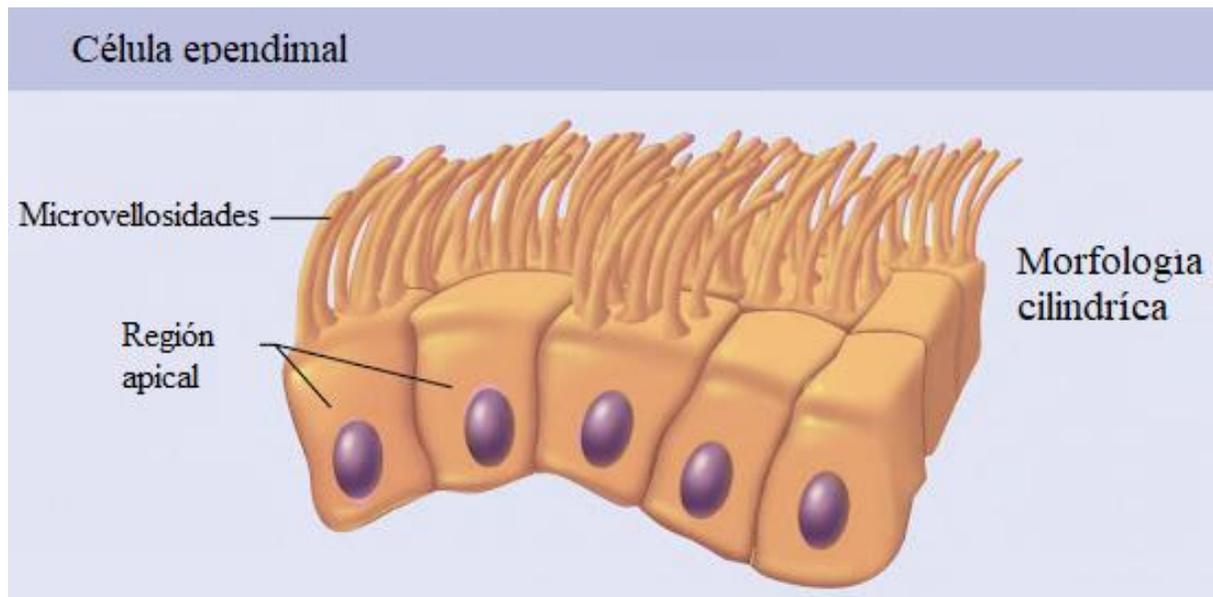


Figura 10. Células endoteliales

Células endoteliales presentan uniones estrechas unas con otras formando un tejido semipermeable que limita el contacto entre la circulación sistémica y el líquido encefalorraquídeo presente en el SNC. Modificado de Patton, Kevin T. 2015. Anatomy and Physiology. Elsevier Health Sciences.

Las células endoteliales se dividen en dos grupos principales: las células endoteliales, pertenecientes al plexo coroideo, situado en los ventrículos laterales; y las células endoteliales extracoroideas. Las primeras participan en la secreción y conservación de la composición química del líquido encefalorraquídeo, mientras que las células extracoroideas son aquellas que se sitúan fuera del plexo coroideo. Participan en la movilidad del líquido encefalorraquídeo y en la regulación de la actividad de las células de su polo basal por medio de señales liberadas al líquido cerebroespinal (Hammond, 2001).

2.1.3.6. *Pericito y células endoteliales*

Los pericitos, también llamados células perivasculares, son células con capacidad contráctil que se encuentran en la lámina basal rodeando el endotelio de tejido vascular en vasos pequeños. En el SNC pueden responder a la actividad neuronal controlando el flujo sanguíneo de manera local y están implicadas en el mantenimiento de la barrera hematoencefálica junto a la conexión neurovascular entre las diferentes células del SNC (Mishra *et al.*, 2016). Estudios *in vitro* demuestran que, en respuesta a estímulos externos, los pericitos expresan una cohorte de proteínas semejantes a las células madre de la médula ósea, y pueden llegar a madurar a células endoteliales y musculares lisas por lo cual se les ha considerado como células madre mesenquimales. Los pericitos asociados a endotelio de vasos pequeños presentan características plasmáticas similares a este tipo de células endoteliales; mientras que los pericitos asociados a vasos capilares mayores presentan características similares a células musculares lisas, lo cual determina el estado al que madurarán (Ross, Pawlina, y Negrete 2007).

A su vez, las células endoteliales se asocian entre sí a través de uniones célula – célula que pueden ser de tipo adhesivas, uniones estrechas o uniones gap formando una monocapa que recubre los vasos capilares llamada endotelio (Félétou, 2011). El endotelio está en contacto con el flujo sanguíneo por un lado y por el otro, está en contacto con los distintos tejidos del organismo formando una barrera selectiva que regula el paso y el transporte de moléculas entre ambos. Las células endoteliales, en conjunto con los pericitos y células de músculo liso, son el principal regulador de la formación (angiogénesis) y remodelación de los vasos capilares mediante la interacción con factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), la familia de angiopoyetinas (Ang) y algunas efrinas, además de participar en procesos como la coagulación o la fibrinólisis. La pérdida de la estructura de barrera en el endotelio conlleva a patologías como edema extracelular y fallas en la homeostasis vascular que pueden complicarse en trombosis, inflamación y ausencia de remodelación en la pared vascular y defectos en la

coagulación. En el SNC conlleva a la pérdida parcial de la barrera hematoencefálica (Michiels, 2003).

El endotelio de los vasos capilares que suministran el SNC presenta uniones estrechas y adhesivas entre las células endoteliales de tal forma que evita la presencia de poros en la monocapa (Figura 11), estableciendo una regulación más estricta en el paso de moléculas presentes en circulación sistémica hacia las células del SNC (Davson 1993; Michiels 2003).

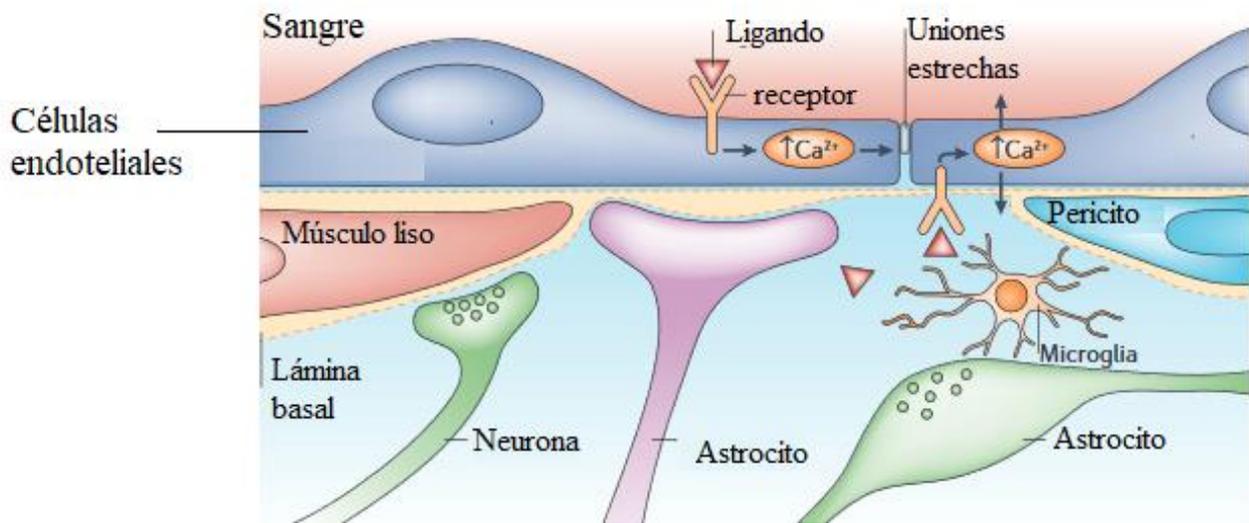


Figura 11. Endotelio en vasos capilares del sistema nervioso central

El endotelio que forma parte de la barrera hematoencefálica del sistema nervioso central cuenta con uniones bastante estrechas que restringen selectivamente la entrada de moléculas y nutrientes desde la circulación sistémica hacia el SNC. Entre la membrana basal y el endotelio se encuentran los pericitos con capacidad contráctil que regulan el flujo sanguíneo de manera local. Modificado de Nature Reviews Neuroscience: Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006) *Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier*. Nat Rev Neurosci 7: 41-53

2.1.3.7. Células madre neurales

Las células madre neurales (CMN) son células con capacidad por un lado de autorrenovarse por duplicación y por otro pueden diferenciarse en distintos linajes neurales maduros como neuronas (neurogénesis), astrocitos y oligodendrocitos (gliogénesis), a lo que se le conoce como multipotencialidad de las células madre. (Bottenstein, 2003). Tienen su origen en el ectodermo durante el desarrollo embrionario donde las células ectodérmicas son inducidas por diversos factores, como las vías Wnt para convertirse en el neuroectodermo y comenzar la neurulación (formación del tubo neural). En esta etapa, las CMN son de tipo neuroepiteliales con características de la glía creando un tapiz en el tubo neural (Bottenstein, 2003; Ndubaku y Bellard, 2008). En el cerebro adulto de mamíferos persiste la proliferación de CMN en la zona subventricular de las paredes del tercer ventrículo y la capa subgranular del giro dentado del hipocampo (Dávila, 2009) de donde pueden migrar hacia diversos sitios del SNC, expresan marcadores específicos como Nestina y GFAP. Para que la migración ocurra, las CMN dan lugar a neuroblastos que migran al bulbo olfativo, donde se terminan de diferenciar a nuevas neuronas (Lois y Alvarez-Buylla, 1994; Dávila, 2009; Faiz *et al.*, 2015).

El efecto de factores de crecimiento como FGF, EGF, neuregulinas, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento derivado del epitelio pigmentario (PEDF) y algunos neurotransmisores como GABA sobre la proliferación y diferenciación de las células madre neurales hacia progenitores de linajes específicos ha sido demostrado (Figura 12), (Almazán *et al.*, 2001). La familia de citocinas neuropoyéticas, particularmente LIF y CNTF, promueven el mantenimiento de las CMN en el adulto y pueden ser parte de las señales necesarias para la respuesta a lesiones neurales (Dávila, 2009).

Células madre neurales (NSCs)

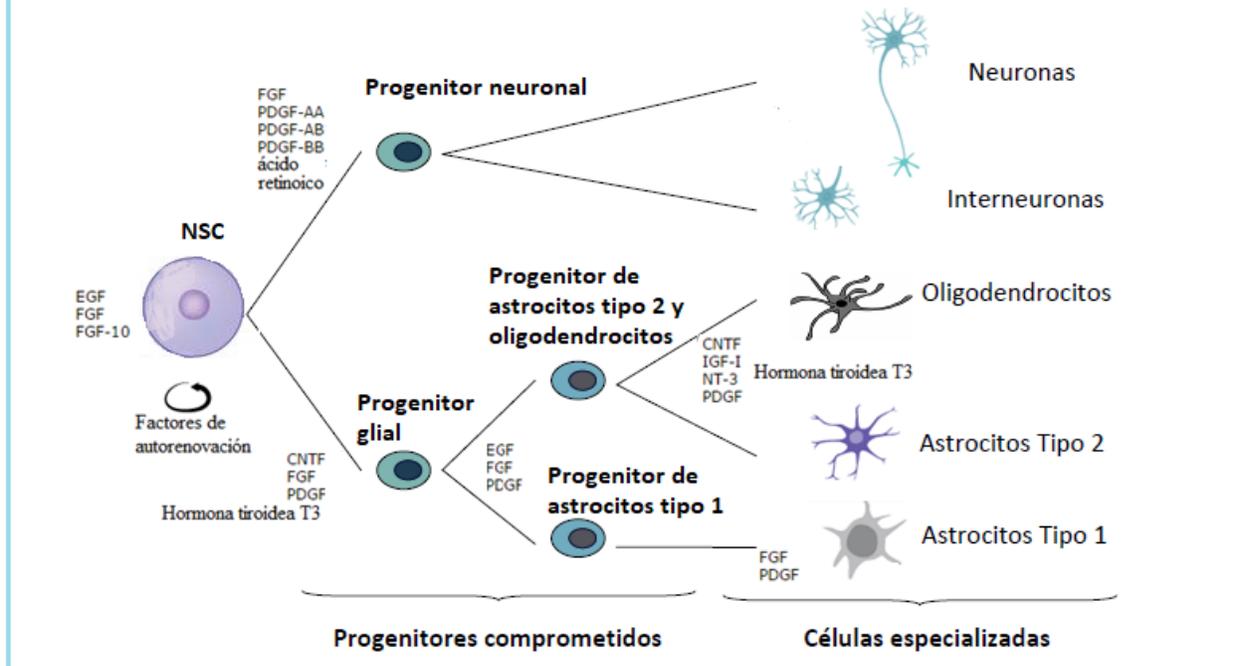


Figura 12. Vías de diferenciación de células madre neurales y marcadores específicos de cada linaje.

La señalización por factores de crecimiento es el principal mecanismo para regular la proliferación durante la diferenciación de células madre neurales tanto *in vivo* como en los cultivos de células madre neurales. Modificado de R&D Systems, INC 2014.

2.2. Mielina

2.2.1. Estructura y función de la mielina

Las funciones motoras, sensoriales y cognitivas del SNC requieren una rápida propagación de los impulsos nerviosos, que en los vertebrados se ve facilitada por el aislamiento de los axones con mielina (Nave y Werner, 2014). La mielina es una estructura lipoproteica que enrolla regiones relativamente extensas de las fibras nerviosas a lo largo de los axones en forma de vainas espaciadas que promueven un flujo más rápido y eficiente de la propagación de los impulsos eléctricos a lo largo de toda la fibra nerviosa (Emery *et al.*, 2009). En el SNC, los oligodendrocitos maduros son los encargados de la síntesis y la producción de las vainas de mielina sobre los axones neuronales, mientras que en el SNP son las células de Schwann (Martenson, 1992). Las vainas de mielina envuelven a los axones en forma de láminas enrolladas en espiral repetidas veces hasta formar una vaina completa y separada de la siguiente vaina por regiones libres de mielina conocidas como nódulos de Ranvier (Figura 13 A).

Las vainas de mielina están conformadas por un 80% de lípidos principalmente: fosfolípidos, glicolípidos y colesterol, y un 20% de proteínas. Los lípidos se ensamblan con las proteínas de membrana específicas de mielina formando un complejo lipoproteico. En dicho complejo, las proteínas más abundantes son la proteína proteolípica de membrana integral (PLP) y la proteína básica de mielina extrínseca (MBP), mientras que la glicoproteína asociada a mielina (MAG), la glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) y la 2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa (CNPasa) se encuentran en menor cantidad (Podbielska y Hogan, 2009). En la Figura 13 B se muestra el esquema de la distribución y de la estructura de la mielina.

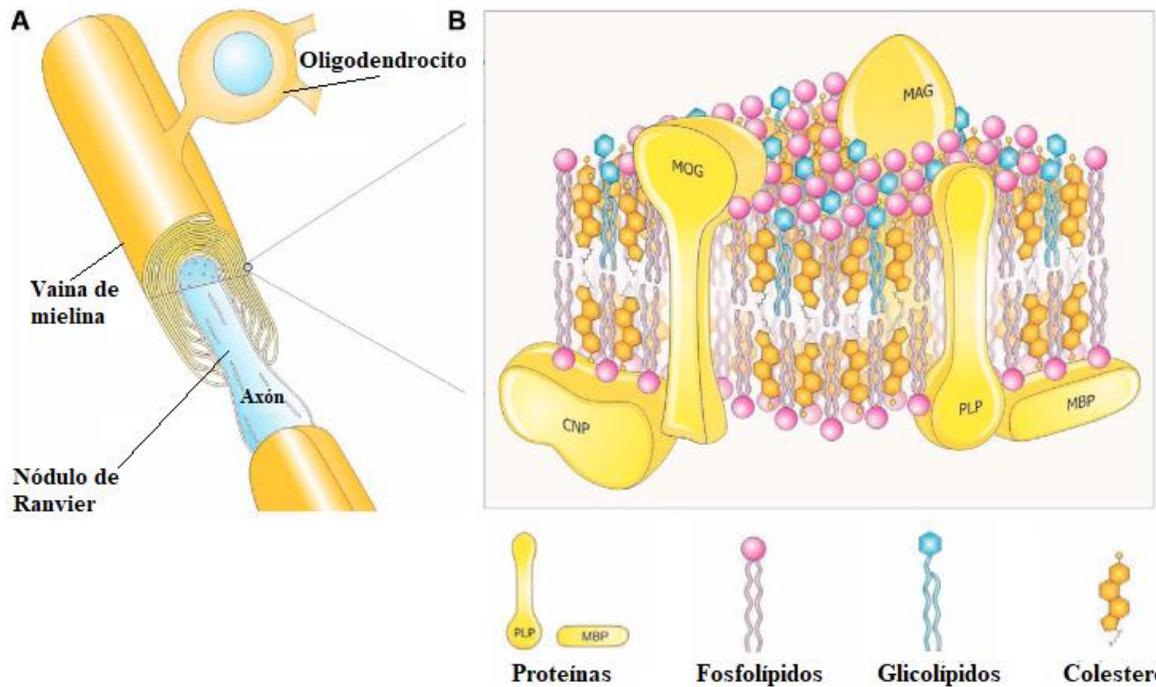


Figura 13. Estructura y conformación de la vaina de mielina sobre una fibra nerviosa.

A. En el SNC, un oligodendrocito puede formar vainas de mielina en más de un axón, cada vaina se encuentra separada por una región libre de mielina llamada *nódulo de Ranvier*, sitio donde ocurre el cambio de potencial de acción y esparcimiento del impulso nervioso. **B.** En el esquema se aprecia la distribución asimétrica de las proteínas específicas de mielina, empaquetadas dentro de los tres tipos de lípidos principales: Fosfolípidos, Glicolípidos y colesterol que forman una bicapa. Modificado de Podbielska, M. and EL Hogan. 2009. "Molecular and Immunogenic Features of Myelin Lipids: Incitants or Modulators of Multiple Sclerosis?" Multiple Sclerosis Journal 15(9):1011–29.

El complejo mielínico está compuesto por tres lípidos principales, que son el colesterol, los fosfolípidos y las galactosilceramidas en una proporción 2:2:1. Se agrupan en forma de bicapa, donde la región hidrofílica se encuentra al exterior y la región lipofílica se encuentra en el interior, comportándose de forma parecida a una membrana celular. Sin embargo, la composición lipídica es distinta, debido a que la cantidad de colesterol es mucho más alta en la bicapa de mielina que en una membrana celular. Esto le otorga características aislantes a la bicapa de mielina (Podbielska y Hogan, 2009).

La disminución o ausencia de las vainas de mielina en las fibras nerviosas desmielinizadas disminuye la eficiencia de la transmisión del impulso nervioso desembocando en parálisis y trastornos motores característicos de patologías como esclerosis múltiple o la enfermedad de Guillain Barré (Martenson, 1992; Goldenberg, 2012).

2.2.2. Genes de mielina

Como se mencionó en la sección anterior, la membrana de mielina es un complejo formado por cinco proteínas (CNPasa, MOG, MAG, PLP y MBP) asociadas a lípidos. La adecuada expresión de los genes de estas cinco proteínas dentro de los oligodendrocitos contribuye a una exitosa formación de la vaina de mielina sobre las fibras nerviosas (Podbielska y Hogan, 2009). Dentro del genoma humano, los genes de mielina se localizan en distintos cromosomas como se observa en la Figura 14. A continuación se resumen las funciones principales de cada uno de los genes de mielina.

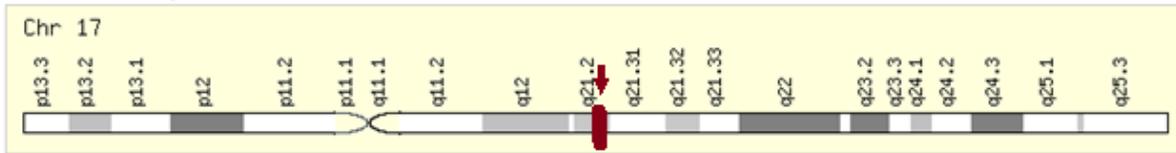
1. **Proteína CNPasa**. La enzima 2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa es una proteína de 421 aminoácidos codificada por el gen *cnp* ubicado el brazo largo del cromosoma 17. Se expresa en células mielinizantes y está involucrada en la conversión del 2',3'-cAMP a 2'-AMP durante la vía de obtención de adenosina. Contribuye al 4% de la proteína total que forma la mielina proporcionando estructura y resistencia (Verrier *et al.*, 2013).
2. **Proteína MOG**. La glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG) es una glicoproteína codificada por el gen *mog*, localizado en el brazo corto del cromosoma 6 y presenta una longitud de 203 aminoácidos. Contribuye al 6% de la proteína total de mielina y se ha asociado a enfermedades desmielinizantes mediante susceptibilidad autoinmune hacia la proteína MOG.

3. **Proteína MAG**. Es una glicoproteína asociada a mielina, codificada por el gen *mag*, ubicado en el brazo largo del cromosoma 19, con una longitud de 626 aminoácidos. Al igual que la proteína CNP y MOG, proporciona estructura y resistencia a la vaina de mielina.

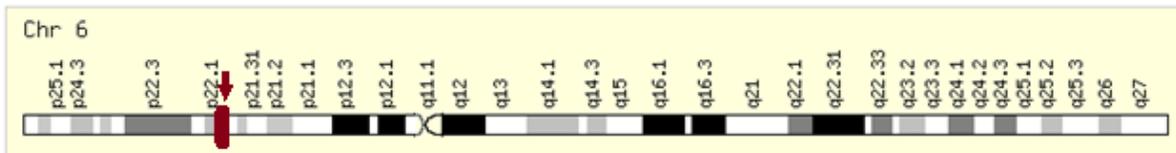
4. **Proteína PLP**. Es una proteína proteolipídica transmembranal codificada en el brazo largo del cromosoma X con una longitud de 277 aminoácidos. Es el principal componente estructural y de resistencia proteico de la mielina.

5. **Proteína MBP**. La proteína básica de mielina (MBP) es codificada por el gen *mbp* localizado en el brazo largo del cromosoma 18, su longitud es de 304 aminoácidos. Junto a la PLP es la proteína más abundante de la mielina, por lo que es ampliamente utilizada como marcador de mielina (Gene Cards).

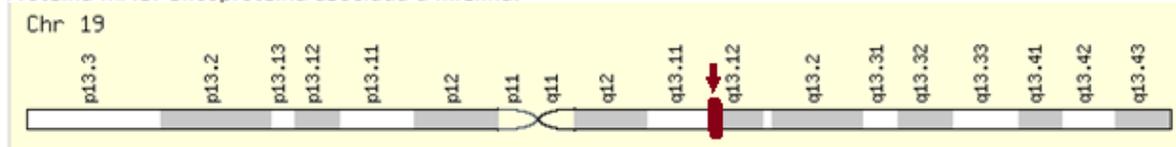
Banda Citogenética: 17q21.2
 CNPasa/CNP 2',3'-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa



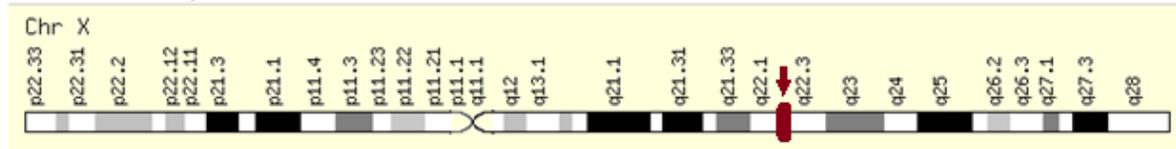
Banda Citogenética: 6p22.1
 Gene MOG. Glicoproteína oligodendrocítica de mielina



Banda citogenética: 19q13.12
 Proteína MAG. Glicoproteína asociada a mielina.



Banda citogenética: Xq22.2
 Proteína Proteolipídica de mielina PLP



Banda citogenética: 18q23
 Proteína MBP. Proteína Básica de Mielina

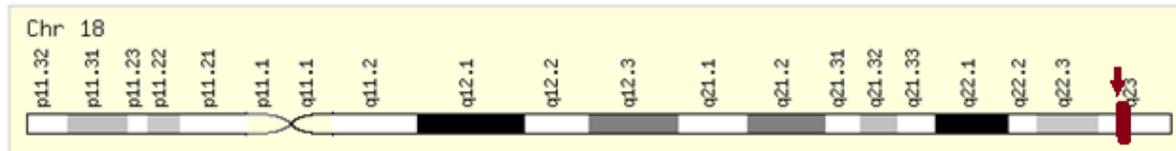


Figura 14. Localización cromosómica de los genes de mielina.

Los genes de las proteínas que forman la mielina se encuentran codificados en distintos cromosomas cada una. Se expresan únicamente en células mielinizantes maduras. modificado de Gene Cards.

2.2.3. Síntesis de Mielina

La síntesis de mielina se resume en cinco etapas generales (Figura 15 (1) contacto glial axonal; (2) selección del segmento a mielinizar; (3) polarización y expansión de la mielina; (4) compactación de la vaina de mielina y (5) cierre de incisión). A continuación se explica cada una.

Fase I: Contacto glial-axonal

Para que el proceso de mielinización ocurra en el SNC es necesario una interacción paracrina entre los astrocitos y los OPC en presencia de axones neuronales (Cardinali, 2007), promoviendo la unión del OPC y un axón. Una vez establecido el contacto, se establece una comunicación axoglial continua entre el OPC y el axón (Nave y Werner, 2014), activando señales promielina importantes, como es el factor de transcripción Krox-20 (Jessen y Mirsky, 2008) el cual es uno de los genes reguladores positivos de la expresión de mielina por excelencia debido a que es necesario para iniciar el proceso de mielinización.

Fase II: Selección del segmento a mielinizar

El siguiente paso del proceso es la selección del segmento en el axón que será mielinizado a través de una sinapsis entre ambas células. El oligodendrocito expresa la proteína MAG como proteína de reconocimiento y selección (Cardinali, 2007; Nave y Werner, 2014).

Fase III: Polarización y expansión de la mielina

Una vez establecido el contacto entre el axón y la célula mielinizante, se activa el transporte de mRNA de genes de mielina, ocurre una traducción local de proteínas y los elementos del citoesqueleto se reorganizan de tal forma que la célula mielinizante se polariza hacia el axón. La OPC se diferencia entonces hacia un oligodendrocito maduro capaz de formar mielina y comienza la fase de expansión, la cual ocurre en dos direcciones sobre la superficie axonal, radial y longitudinal. Dicha expansión se produce de forma simultánea a medida que se agrega continuamente nueva membrana mielínica en el centro (Fields, 2014; Nave y Werner, 2014).

Fase IV: Compactación de la vaina de mielina

A medida que se sintetiza mielina en el centro de la vaina, la capa más interna ejerce presión sobre la parte lateral formando una región altamente compactada que proporciona estructura y estabilidad a la vaina de mielina gracias a proteínas especializadas, tales como las proteínas MBP y PLP que funcionan como adhesivo y ejercen resistencia mecánica (Nave y Werner, 2014).

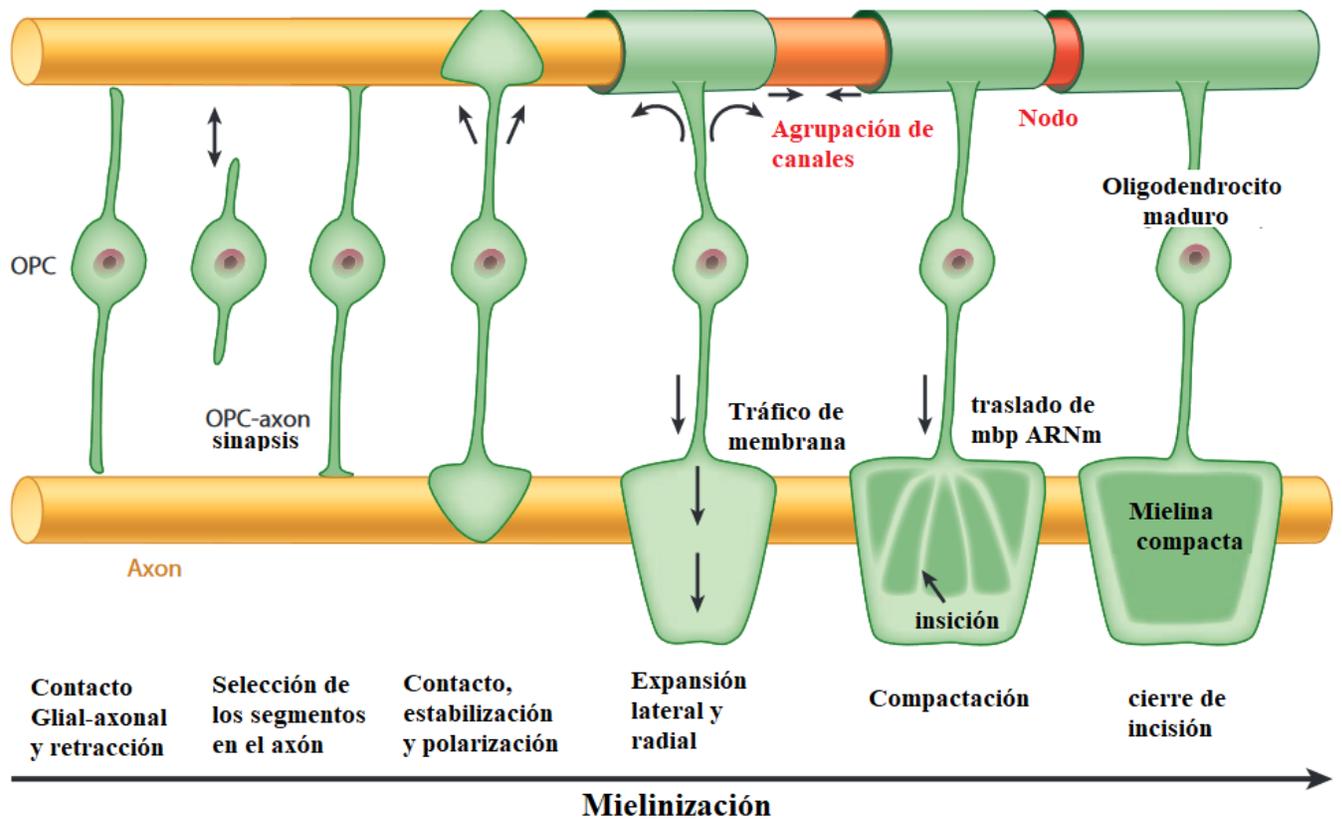


Figura 15. Proceso de síntesis de mielina en el SNC.

Modificado de Nave, Klaus-Armin and Hauke B. Werner. 2014. "Myelination of the Nervous System: Mechanisms and Functions." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 30(1):503–33.

Fase V: Cierre de incisión

Una vez formada la vaina de mielina se activan mecanismos mediados por genes reguladores negativos que detienen el proceso de mielinización local.

2.3. Genes reguladores de la expresión de mielina

La expresión de los genes de mielina dentro de la célula está controlada mediante genes reguladores tanto positivos como negativos en un equilibrio de funciones. Los genes reguladores positivos en conjunto en señales promielina (Krox-20, elevación de cAMP y señales de mielinización axonal), promueven la expresión de genes de mielina en oligodendrocitos maduros una vez que se encuentran unidos a un axón. Mientras tanto los reguladores negativos se encuentran expresados en el periodo anterior al proceso de mielinización y se regulan a la baja cuando comienza dicho proceso. Sin embargo, se ha observado que existe una reactivación en la expresión de estos genes acompañada de una desdiferenciación de las células mielinizantes después de perder contacto con axones de nervios lesionados. Esto contribuye a un efecto desmielinizante en la región dañada característico de las encefalopatías desmielinizantes (Jessen y Mirsky, 2008).

2.3.1. Genes reguladores positivos

Los genes reguladores positivos de mielina se encuentran inactivos en etapas tempranas de diferenciación celular de oligodendrocitos y células de Schwann y se activan en células maduras (Jessen y Mirsky, 2008). Los genes reguladores positivos son generalmente factores de transcripción que participan directa o indirectamente en diversas cascadas de señalización involucradas en la síntesis de mielina (Nave y Werner, 2014). Los principales genes reguladores positivos se enlistan en la Tabla 2.

Tabla 2. Principales reguladores positivos de la expresión de mielina.

Gene	Función biológica	Referencias
Krox-20	Es miembro de la familia de factores de transcripción Krox. suprime los marcadores de la inmadurez celular. Promueve resistencia a la apoptosis. Participa activamente en las células de Schwann.	(Jessen and Mirsky, 2008; Emery <i>et al.</i> , 2009; Nave and Werner, 2014)
Oct6 y Brn2	Controlan el momento de inicio de la mielinización. Estimulan la maduración de las células mielinizantes como respuesta a estímulos axonales.	
cAMP	Altas concentraciones de cAMP activan los genes de mielina y mimetiza las señales pro mielina axonales.	
Sox 10	Impulsa la generación de precursores de células de Schwann. Activa la expresión de Oct 6 y genes de mielina en células inmaduras	
NFκB	Este factor actúa como mediador de la señal de cAMP	
Neuregulina-1	Controla el proceso de sorting aleatorio y la interacción entre la célula mielinizante y el axón.	
MRF	Un regulador transcripcional crítico esencial para la maduración de oligodendrocitos y la mielinización del SNC.	

2.3.2. Genes reguladores negativos

Los genes reguladores negativos, pertenecen generalmente a familias de factores de transcripción. Sin embargo, cuando estos genes se activan, la expresión particular de los genes de mielina disminuye. Se encuentran activos en etapas tempranas de diferenciación tanto en oligodendrocitos como en las células de Schwann, ejerciendo un papel opuesto a las señales promielina evitando la mielinización en células inmaduras. Durante una lesión neural, en la que se rompe la comunicación entre el oligodendrocito y el axón, los genes reguladores negativos promueven un fenotipo de células maduras hacia estados inmaduros y el proceso de mielinización se detiene. (Jessen y Mirsky, 2008)

Las principales características que presentan los genes reguladores negativos son las siguientes:

- Inhiben la producción de mielina.
- Son miembros de familias de factores de transcripción.
- Complementan funcionalmente reguladores positivos como Krox-20.
- Están presentes en oligodendrocitos inmaduros y nervios neonatales.
- Su expresión se suprime a medida que se activan las señales pro-mielina.⁷
- Cuando se encuentran en altos niveles de expresión, suprimen las señales pro mielina.
- En células maduras con capacidad mielinizante su expresión es baja o nula.
- Sus niveles aumentan cuando se presenta un daño a nervio e impulsan la desdiferenciación de células mielinizantes que han perdido el contacto con el axón.

Los principales genes reguladores negativos se enlistan en la Tabla 3.

Tabla 3. Principales reguladores negativos de la expresión de mielina.

Gene	Función biológica	Referencias
<i>p57kip2</i> o <i>CDKN1C</i>	Factor inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 1C. Factor de transcripción involucrado en ciclo celular.	(Jessen y Mirsky, 2008) Gene Cards.
<i>id2</i>	Factor de transcripción de la familia HLH carente de un sitio de unión a DNA. A nivel embrionario, presenta un pico de expresión.	
<i>id4</i>	Factor de transcripción regulador negativo de la expresión de genes de mielina.	
<i>hes1</i>	Factor de transcripción. Miembro de la familia Hes supresora de la transcripción de genes de mielina.	
<i>hes5</i>	Factor de transcripción. Miembro de la familia Hes supresora de la transcripción de genes de mielina.	
Notch1	Receptor de membrana. Libera a citoplasma un dominio intracelular Notch (NICD) que actúa como factor de transcripción. Está involucrado en diferenciación de células y tejidos.	
<i>Rock2</i>	Cinasa de serina/treonina implicada en la regulación de la citocinesis en ciclo celular,	
Sox 2	Miembro de la familia de factores de transcripción SOX relacionados con el gen SRY.	
Pax 3	Pertenece a la familia de factores de transcripción PAX.	
Krox -24 (Egr 1) y Egr 3	Miembros de la familia de factores de transcripción Krox.	
c-Jun	Componente principal del complejo de transcripción AP-1, está involucrado en diversas funciones de ciclo celular.	

2.4 Desmielinización viral

2.4.1. Desmielinización

La desmielinización es la pérdida del recubrimiento mielínico en una región de las fibras nerviosas produciendo un daño o lesión visible (Figuras 16 y 17). Cuando se daña parcial o totalmente dicho recubrimiento, la capacidad de los nervios para conducir impulsos eléctricos desde y hacia el cerebro se ve seriamente afectada y, como consecuencia existe pérdida de la función motora y sensorial del individuo (Goldenberg, 2012). La desmielinización puede ser de tipo primaria, donde existe pérdida de mielina, pero se conservan relativamente en buen estado los axones o, de tipo secundaria, donde existe daño a las neuronas y/o axones con la consiguiente degradación de la mielina causando en ambos casos patologías discapacitantes. (Ryan, Ibrahim y Parmar, 2014). Los efectos y síntomas dependen de la gravedad de la lesión, la región y del tamaño del área afectada, siendo los más graves: los desórdenes neurológicos degenerativos, la parálisis parcial, las deficiencias y las alteraciones en las funciones autónomas como el latido cardiaco, la digestión, la respiración y finalmente, la muerte.

La causa por la que se desarrolla la pérdida de mielina y aparecen las lesiones ha sido relacionada a un estado de inflamación crónico y la presencia de títulos de anticuerpos inusualmente altos para virus comunes en líquido cefalorraquídeo (Gordon *et al.*, 2000). Existen reacciones cruzadas entre los antígenos de virus y algunos componentes principales de la mielina que conducen a un estado de autoinmunidad y degeneración de las vainas de mielina (Martínez-Cáceres y Montalbán, 2000; Owens *et al.*, 2011; Karussis, 2014).

Otra causa de la desmielinización es directamente la infección del SNC por virus líticos que presentan tropismo por células de la glía, principalmente oligodendrocitos (Owens *et al.*, 2011). Puede ocurrir una infección aguda en los primeros años de vida que continúe con una inflamación crónica responsable del daño neurológico posterior o, el caso de infecciones virales recurrentes que inducen la destrucción de la mielina en

forma inespecífica (Martínez-Cáceres y Montalbán, 2000; Owens *et al.*, 2011; Leibovitch y Jacobson, 2014).

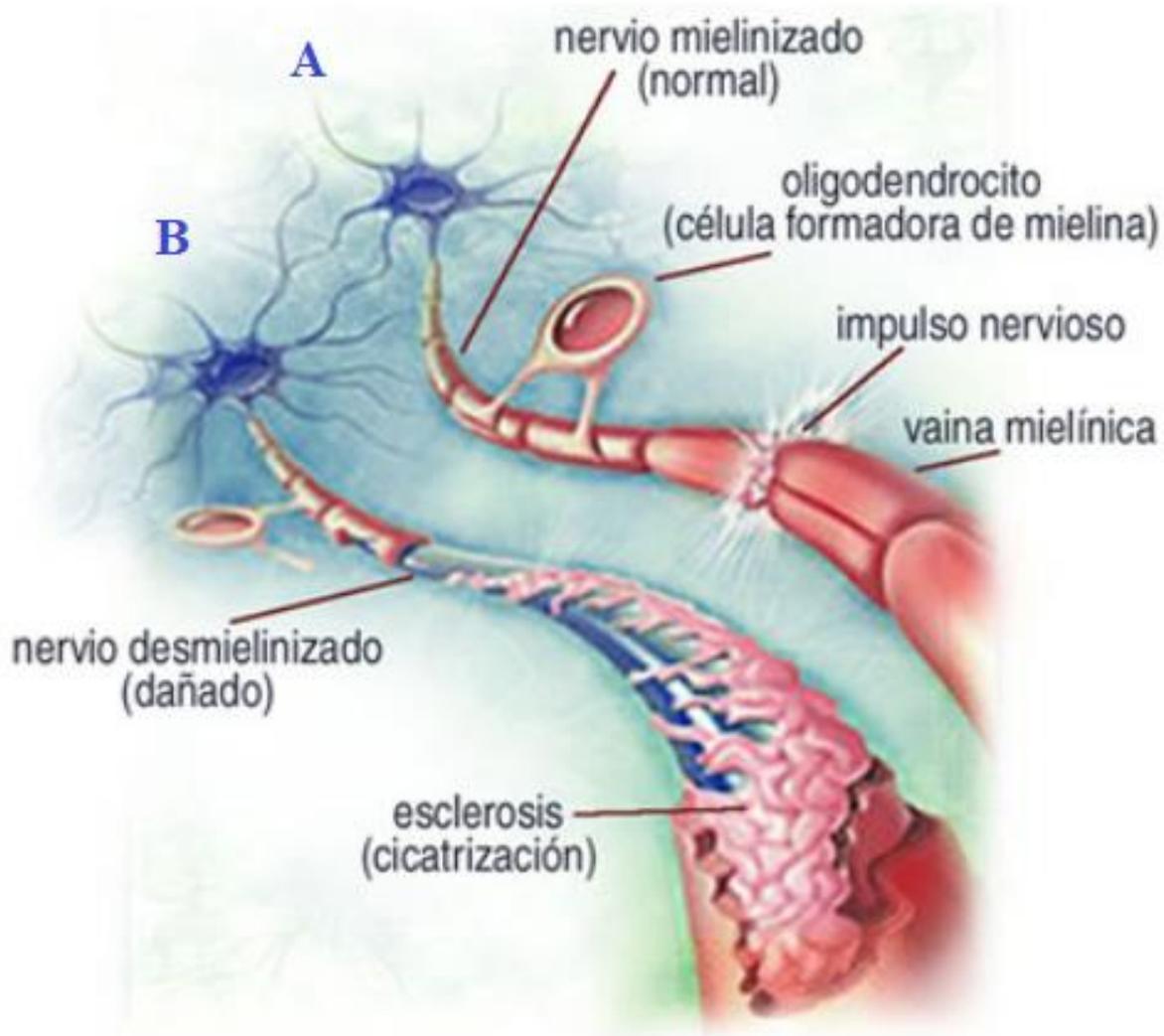
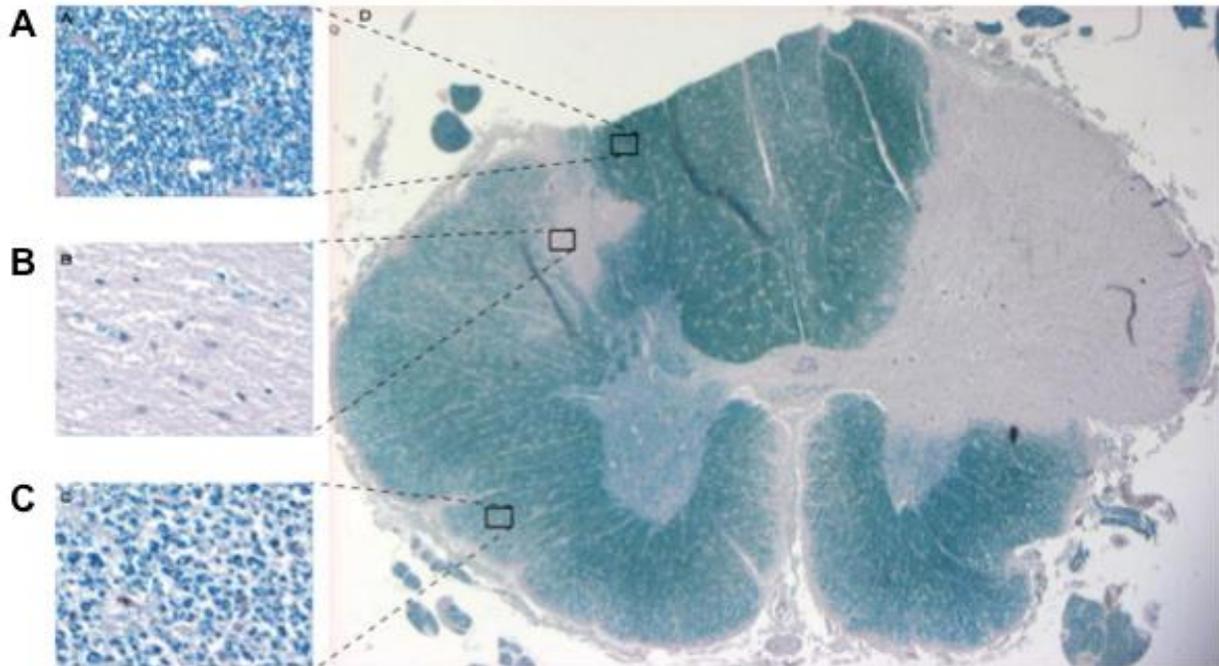


Figura 16. Desmielinización de una fibra nerviosa.

Fibra nerviosa normal. Se mantiene la estructura en forma de vaina de la mielina y por lo tanto el impulso nervioso se transmite correctamente. B. Fibra nerviosa con pérdida de mielina y daño axonal. Presenta una cicatrización o lesión debida a la perdida de mielina conocida como placa esclerótica característica de esclerosis múltiple, es incapaz de transmitir correctamente los impulsos nerviosos. Modificado de NCBI *pubmed*.



A. Mielinización normal. B. Desmielinización severa. C. Remielinización.

Figura 17. Corte de médula espinal teñida con azul de Luxol. Grados de desmielinización en la médula espinal.

Se muestra el un corte transversal de la médula espinal de un paciente con EM. Se puede apreciar los distintos grados de desmielinización que presentan distintas zonas en el corte. A) Muestra una zona con mielinización normal. B) Se observa una desmielinización severa. C) Representa una desmielinización moderada. Modificado de *Radial diffusivity predicts demyelination in ex vivo multiple sclerosis spinal cords*. Klawiter EC, et al. Neuroimage. 2011 April 15; 55(4): 1454–1460. Bockbrader K, et al. Future Neurol. 2008; 3(6): 655–668.

2.4.2. Vías de entrada de los virus al SNC

Las infecciones virales del SNC se clasifican dependiendo del sitio anatómico de infección y de la entrada del agente patógeno y suelen ir seguidas de una fuerte respuesta inflamatoria del huésped, se clasifican en meningitis si ocurre en la región de las meninges, si es en el encéfalo se conoce como encefalitis y si ocurre en la médula espinal se refiere a una mielitis (Dahm *et al.*, 2016). Para que un virus logre una infección del SNC es necesario que evada las principales barreras protectoras (i.e. la barrera hematoencefálica y la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo).

Los principales mecanismos que los agentes patógenos utilizan para ingresar al SNC son la vía transcelular, paracelular y de “caballo de Troya” (Al-Obaidi et al., 2018). Los virus que migran transcelularmente, como el virus herpes simple virus-1 (HSV-1) penetran y atraviesan las células endoteliales que forman la barrera, mientras que los patógenos que entran paracelularmente lo realizan a través de la disrupción de las uniones estrechas célula-célula o mediante mecanismos de señalización entre la célula huésped y la partícula viral. La estrategia conocida como caballo de Troya es la más utilizada por muchos neuro virus. Consiste en que el virus infecte directamente células que pueden atravesar la barrera, por ejemplo, células del sistema inmunológico, generalmente monocitos y macrófagos. Una vez dentro se propaga la infección hacia otras células del sistema nervioso. Cabe mencionar que algunos virus están mejor adaptados para invadir el SNC a través de los nervios periféricos, tales como los poliovirus, o a través de neuronas sensoriales olfativas, como en el caso de HSV-1 (Al-Obaidi et al., 2018; Dahm et al., 2016).

2.4.3. Principales virus desmielinizantes

La relación entre las patologías desmielinizantes del SNC y varios agentes virales se ha establecido al observar una expresión alta de proteínas y la presencia de DNA y ARN virales en tejido encefálico junto a un aumento del título de anticuerpos virales específicos en líquido cefalorraquídeo de pacientes con esclerosis múltiple (Owens et al., 2011). Además, en una infección viral persistente se produce un ambiente inflamatorio crónico.

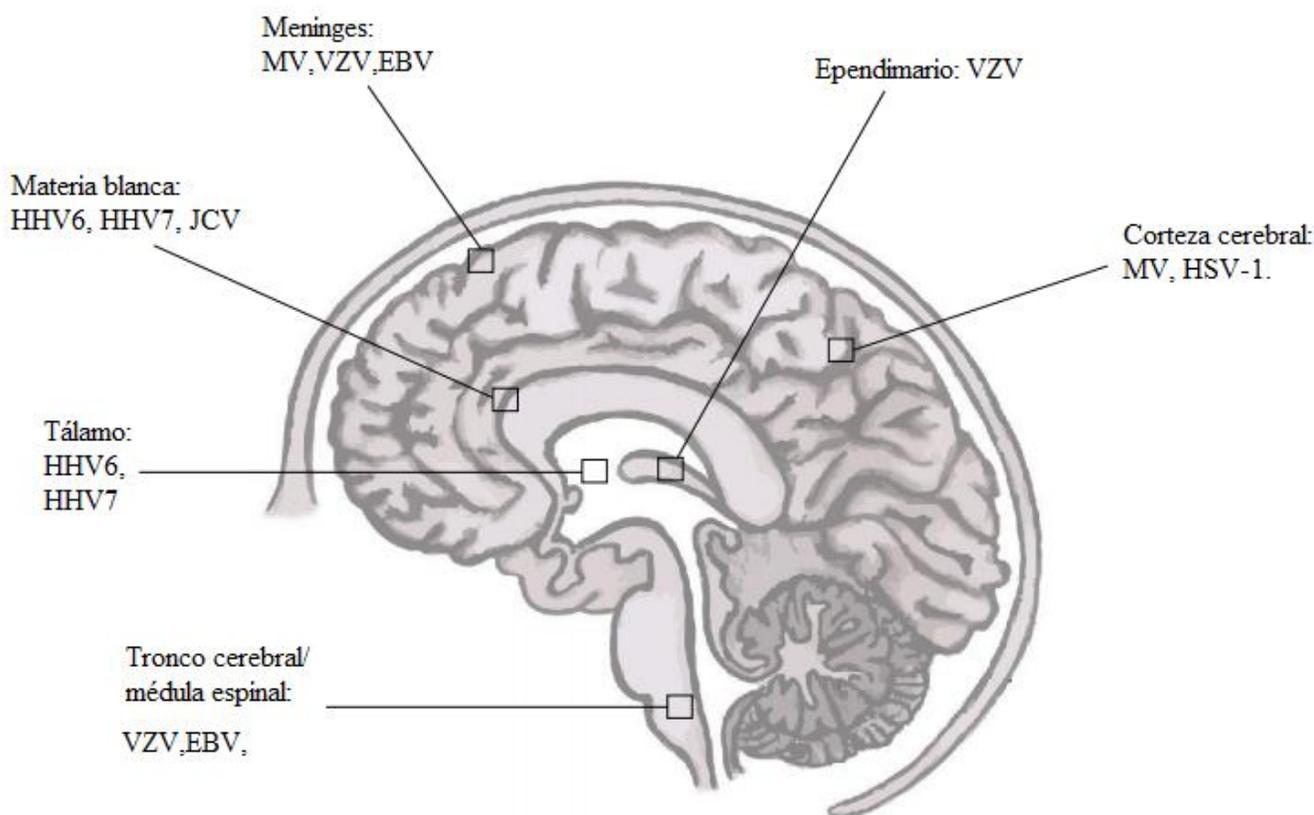


Figura 18. Principales regiones cerebrales donde se presenta infección de virus desmielinizantes.

Modificado de Dahm, Tobias, Henriette Rudolph, Christian Schwerk, Horst Schroten, and Tobias Tenenbaum. 2016. "Neuroinvasion and Inflammation in Viral Central Nervous System Infections." *Mediators of Inflammation* 2016

Dentro de los principales virus con características desmielinizantes del SNC se conocen el virus John Cunningham (JC) , Varicela zoster (VZV), Virus de sarampión (MV) y varios tipos de herpes virus como Herpes simple virus-1 (HSV-1), Epstein-Barr, HHV6 y HHV7 (Owens *et al.*, 2011; Reynaud *et al.*, 2014). En la Figura 18, se señalan los sitios de mayor ocurrencia de infección para cada virus. En la Tabla 4 se enlistan las principales características de estos virus.

Para el caso del Herpes Virus Humano 6 (HHV6) los primeros estudios que informaron niveles más altos de DNA, RNAm y proteínas virales específicamente en las placas desmielinizadas de tejido encefálico de pacientes con esclerosis múltiple en contraste con tejido de cerebro normal como control, confirman que este virus

presenta un neurotropismo importante asociado a un reservorio en el SNC. Estos resultados son fundamentales para la hipótesis de que el HHV6 puede ser un impulsor de la patogénesis en la esclerosis múltiple, aunque los mecanismos moleculares implicados aún no se conocen del todo (Leibovitch y Jacobson, 2014).

Tabla 4. Características de los principales virus desmielinizantes en el sistema nervioso central

Familia viral	Nombre de la especie	Tipo de Genoma	Regiones del SNC que afecta	Vía de entrada	Patologías asociadas	Referencias
<i>Polyomaviridae</i>	Virus JC (JCV)	dsDNA	Materia blanca subcortical	BHE	Esclerosis múltiple (MS) Encefalopatía multifocal progresiva fatal (EMP)	(Owens <i>et al.</i> , 2011; Leibovitch y Jacobson, 2014; Pinto y Dobson, 2014; Agut, Bonnafous and Gautheret-Dejean, 2015; Dahm <i>et al.</i> , 2016)
<i>Paramyxoviridae</i>	Sarampión (MV)	(-) ssRNA	Meninges, corteza cerebral	BHE	Meningitis, panencefalitis esclerosante subaguda, Esclerosis múltiple (MS)	
<i>Herpesviridae</i>	Virus varicela zoster (VZV)	dsDNA	Tronco encefálico y vasos sub-ependimarios	BHE	Esclerosis múltiple (MS)	
	Epstein Barr (EBV)	dsDNA	Meninges, médula espinal y nervios periféricos.	BHE	Esclerosis múltiple (MS)	
	Herpes simple virus-1 (HSV-1)	dsDNA	Corteza cerebral	BHE	Esclerosis múltiple (MS)	
	Herpes virus humano-6 (HHV6)	dsDNA	Lóbulo frontal, tálamo, materia blanca	BHE	Encefalitis Esclerosis múltiple (MS)	
	Herpes virus humano-7 (HHV7)	dsDNA	Lóbulo frontal, tálamo, materia blanca	BHE	Esclerosis múltiple (MS)	

2.4.4. Expresión de genes de mielina en las infecciones virales

En la mayoría de las infecciones virales del SNC se han observado alteraciones en los patrones de expresión en los genes de mielina. Estas alteraciones pueden estar mediadas por diversos factores, tales como el tipo de virus, tropismo hacia células de la glía, principalmente oligodendrocitos y la etapa del desarrollo neural en la que ocurra la infección (Gordon *et al.*, 2000).

Uno de los primeros modelos utilizado para estudiar estos cambios de expresión en los genes de mielina durante las infecciones virales es el cultivo de oligodendrocitos caninos infectados con el virus de moquillo canino CDV (Graber *et al.*, 1995; Vandeveld y Zurbriggen, 2005). Otros virus que están relacionados a alteraciones en la expresión de genes de mielina son e de la influenza en infección prenatal (Fatemi *et al.*, 2009), Coronavirus (Jordan *et al.*, 1989) y el virus JCV (Gordon *et al.*, 2000). Los principales genes que muestran alteraciones en los patrones de expresión durante una infección viral son *plp*, *mag* y *mbp*, mostrando por lo regular una reducción significativa en los niveles de expresión tanto de la transcripción como de la traducción (Fatemi *et al.*, 2009). En consecuencia, las células infectadas ya no son capaces de sintetizar todos los compuestos de membrana necesarios para la producción y el mantenimiento de la vaina de mielina sobre los axones nerviosos ocasionando un estado de desmielinización que puede conducir a una patología mayor.

En la Figura 19 se contrasta el patrón temporal de expresión para los genes *plp*, *mbp* y *mag* durante la infección con CDV contra el control, donde se puede apreciar que en presencia del virus existe una marcada disminución de los niveles de mRNA de los genes evaluados.

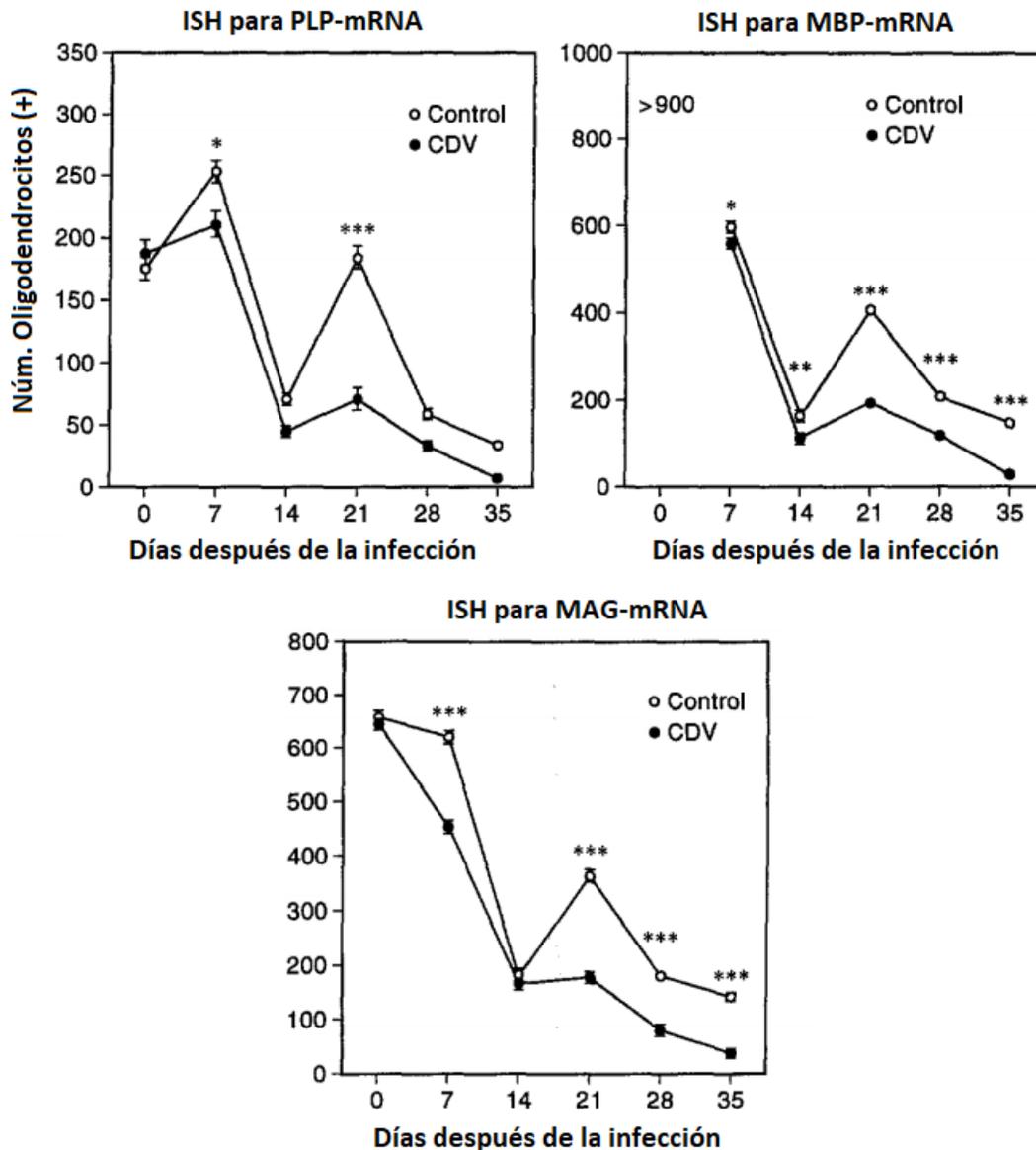


Figura 19. Perfiles de expresión de los principales genes de mielina en infección con CDV mediante hibridación in situ.

El número total de oligodendrocitos que expresan el ARNm de PLP, MBP y MAG mostró dos máximos, uno a los 7 y otro a los 21 días posteriores a la infección. La infección por CDV redujo significativamente el número de oligodendrocitos positivos para el mRNA de PLP, MBP y MAG. El efecto de CDV fue en aumento durante el período de observación. El recuento de oligodendrocitos en los cultivos infectados con CDV y de control difirieron significativamente desde los 7 días posteriores a la infección.

Modificado de raber, H. U., C. F. Miller, M. Vandeveld, and A. Zurbriggen. 1995. "Restricted Infection with Canine Distemper Virus Leads to Down-Regulation of Myelin Gene Transcription in Cultured Oligodendrocytes." Acta Neuropathologica 90(3):312-18

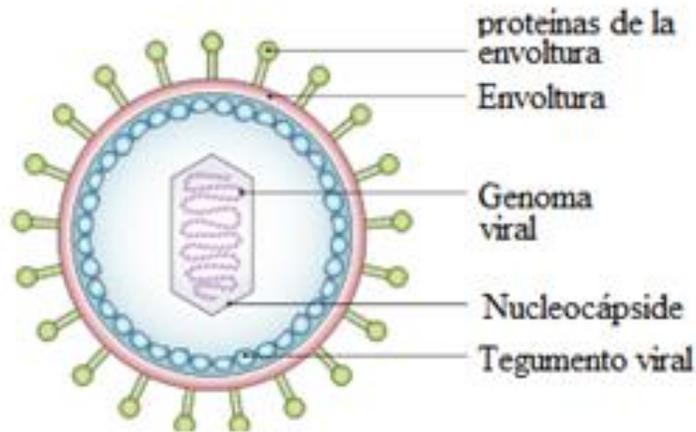
2.5. Desmielinización por Herpes Virus Humano-6 (HHV6)

2.5.1. HHV6

El Herpes Virus Humano-6 (HHV6) es un virus envuelto icosaédrico de DNA lineal de doble cadena, cercano a los 200nm de diámetro, perteneciente a la familia Herpesviridae subtipo *beta*. A su vez se subdivide en dos grupos genética y fenotípicamente bien definidos, llamados A y B (HHV6A y HHV6B) (Agut, Bonnafous y Gautheret-Dejean, 2015; Dahm *et al.*, 2016). Al igual que otros herpesvirus, HHV6 induce una infección latente de por vida capaz de reactivarse en cualquier momento. Presenta tropismo por una amplia gama de células humanas especialmente por linfocitos T CD4+ activados. Se ha observado *in vitro* que HHV6 puede infectar linfocitos T CD8+ (sólo HHV6A), fibroblastos humanos, células NK, células hepáticas, células epiteliales y endoteliales, astrocitos, oligodendrocitos y células de la microglía mediante un ciclo lítico de replicación que lleva a la destrucción de la célula infectada (Agut, Bonnafous y Gautheret-Dejean, 2015).

La capacidad de infectar diferentes líneas celulares es generalmente más alta para HHV-6A que para HHV-6B, lo cual aparentemente es ser un carácter fenotípico para discriminar ambas especies (Agut, Bonnafous y Gautheret-Dejean, 2015). Su genoma consta de una región única llamada U de 143-145 kb flanqueada por secuencias repetidas idénticas llamadas DRR y DRL, su longitud global es de 162 a 170kb. La región U también contiene matrices de repetición internas designadas R0, R1, R2 y R3. DRL y DRR contienen cada uno secuencias cortas únicas, los motivos conservados de empaquetamiento pac-1 y pac-2, y dos tramos de secuencias relacionadas con las secuencias repetidas de los telómeros (TRS) de los cromosomas vertebrados (Figura 20). Las proteínas del virión y las enzimas involucradas en el ciclo de replicación del virus se reagrupan en siete grupos, con cada bloque compuesto de dos a ocho marcos de lectura (ORF) que se conservan entre todos los herpesvirus y se superponen a la parte central de la región U (Pantry y Medveczky, 2017).

A



B

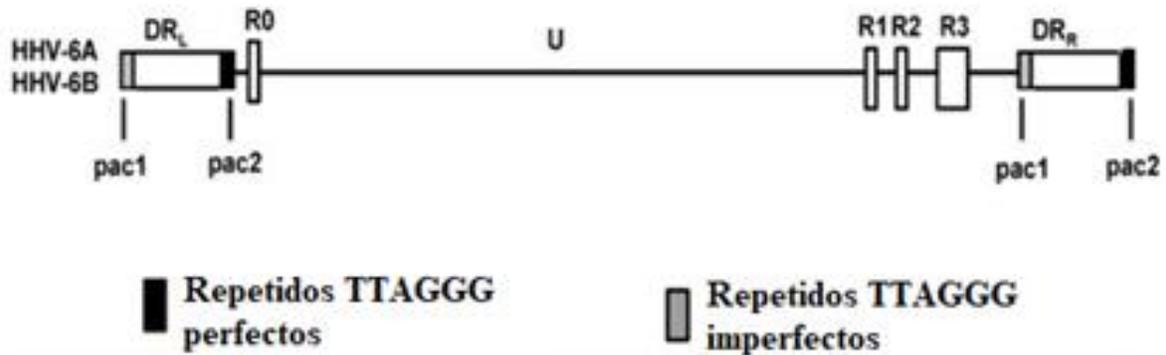


Figura 20. Estructura viral y del genoma del virus HHV6

A. El virus HHV6 es un virus envuelto de 200nm de diámetro y una nucleocápside icosaédrica, con ADN lineal de doble cadena. **B.** La línea continua representa la región única “U” del genoma. Las regiones DRL y DRR representan las regiones repetidas flanqueantes de la región U. En los extremos izquierdo de las regiones DRL y DRR se encuentran los repetidos del oligonucleótido TTAGGG entre los cuales puede existir secuencias relacionadas, pero ligeramente diferentes, en los extremos derechos se encuentran los repetidos perfectos de dicho oligonucleótido. Modificado Pantry, Shara N. and Peter G. Medveczky. 2017. “*Latency, Integration, and Reactivation of Human Herpesvirus-6.*” *Viruses* 9.

El virus HHV6 tiene la capacidad de insertar su genoma de manera covalente en la región subteloamérica de los cromosomas celulares probablemente por un mecanismo de recombinación homóloga entre secuencias repetidas teloméricas de origen viral y

celular con la capacidad de heredarse desde las células germinales. Cerca del 0.2-1% de la población general en los países desarrollados presenta la inserción del genoma de HHV6 (ciHHV6) (Reynaud *et al.*, 2014; Pantry y Medveczky, 2017) . Los genes conservados para las glicoproteínas B (gB) y H (gH), y el producto del gen U94 se han tomado como firmas específicas del HHV6. El gen viral U94 se expresa en el estado latente y participa en la estabilidad y en el mantenimiento intracelular de dicho estado. La reactivación de la infección ocurre cuando existe un ciclo de replicación activo y existen partículas virales detectables. Se ha encontrado que la transcripción de los genes IE de las regiones tempranas IE1 e IE2 del genoma viral están implicados en el efecto de transactivación de factores celulares y virales induciendo la reactivación de la infección. La reactivación de un ciclo de replicación tiene profundos efectos sobre las funciones celulares tales como la viabilidad, la replicación, la regulación de la expresión génica y las alteraciones de la apoptosis (Agut, Bonnafous and Gautheret-Dejean, 2015).

Desde el punto de vista epidemiológico, HHV6A y HHV6B se han detectado en todas las poblaciones humanas y en conjunto, la infección por HHV6 está presente en más del 90% de las poblaciones adultas en los países desarrollados. Sin embargo, la infección generalmente se adquiere entre los 6 meses y 2 años de vida, después de la pérdida de los anticuerpos maternos protectores, aunque se han reportado casos de infección primaria en adultos (Reynaud *et al.*, 2014; Agut, Bonnafous y Gautheret-Dejean, 2015). Hasta la fecha se desconoce la temporalidad respectiva de las infecciones por HHV6A y HHV6B. En general se cree que, la infección primaria por HHV6B ocurre primero y en muchos casos asociada con síntomas clínicos; mientras que HHV6A se adquiere más tarde, a través de una infección asintomática. En última instancia, la detección continua de HHV6A junto a HHV6B en sangre o tejidos de adultos indica que los dos virus infectan crónicamente a la mayoría de las personas. La saliva es una fuente principal de transmisión, puesto que las glándulas salivales actúan como reservorio del virus, los casos reportados de transmisión a partir de trasplantes de órganos son pocos.

Los pacientes que adquieren una infección primaria de HHV6 muestran la aparición de anticuerpos IgM específicos durante la primera semana y éstos desaparecen en un periodo de un mes (Agut, Bonnafous y Gautheret-Dejean, 2015). Mientras que los anticuerpos IgG se detectan más tarde y permanecen indefinidamente. Sin embargo, HHV6 al igual que otros herpes virus, exhibe una amplia gama de propiedades biológicas que le permiten estimular y modular la respuesta inmunológica, logrando así una evasión del sistema inmunológico y un estado de latencia crónico (Reynaud *et al.*, 2014; Agut, Bonnafous y Gautheret-Dejean, 2015), por ejemplo, se ha demostrado que promueve el desplazamiento del perfil de células T colaboradoras de Th1 a Th2 mediante regulación positiva de IL-10 y regulación negativa de IL-12, promoviendo un estado de inflamación (Reynaud *et al.*, 2014). En paralelo, la infección por HHV6 tiene fuertes efectos supresores sobre el crecimiento y la diferenciación de los progenitores de la médula ósea, lo que puede afectar la diferenciación de los macrófagos y la población de precursores de timocitos. También se ha observado que los pacientes con un estado de inmunosupresión tienen mayor probabilidad a presentar una reactivación del virus (Pantry y Medveczky, 2017).

Los impactos clínicos de la infección primaria por HHV6 son picos febriles agudos en niños de 6 meses a 3 años de edad y en algunos casos se han reportado convulsiones, erupciones cutáneas y síntomas ligeros en el sistema digestivo y respiratorio. En la mayoría de la población, la infección primaria suele ser asintomática y se detecta mediante la presencia de partículas virales en saliva y en caso de infección al SNC, en líquido cefalorraquídeo. En muy pocos casos la infección primaria está asociado a una enfermedad más grave como hepatitis, trombocitopenia, síndrome infeccioso similar a mononucleosis, gastroenteritis o miocarditis (Agut, Bonnafous and Gautheret-Dejean, 2015). En etapas avanzadas de la infección en SNC, las complicaciones neurológicas incluyen meningoencefalitis y encefalitis, que podrían estar implicadas en el desarrollo posterior de patologías desmielinizantes como esclerosis múltiple o leucoencefalopatía multifocal progresiva (Leibovitch y Jacobson, 2014; Reynaud *et al.*, 2014).

Ganciclovir, foscarnet y cidofovir han demostrado *in vitro* e *in vivo* ser eficaces contra la infección tanto por HHV6A como por HHV6B ya que inhiben directamente la DNA polimerasa viral. Sin embargo, por la alta tasa de mutación presente en los virus, se utilizan tratamientos combinados que aumenten su eficacia (Agut, Bonnafous y Gautheret-Dejean, 2015).

2.5.2. Infección de oligodendrocitos por HHV6

Aunque se conoce que los linfocitos T son las principales células blanco del virus HHV6, se ha observado con éxito la infección de algunas células del SNC (Agut, Bonnafous y Gautheret-Dejean, 2015). En aquellos casos en que se ha examinado el tejido encefálico de pacientes con esclerosis múltiple, los tipos celulares infectados predominantes, pero no exclusivos han sido la glía. Algunos informes, además han enfatizado el papel de los oligodendrocitos en la replicación viral (Albright *et al.*, 1998). En los primeros reportes de presencia de HHV6 en cerebros de pacientes con esclerosis múltiple se describen las secuencias del genoma y la expresión del antígeno HHV6 específicamente en oligodendrocitos lesionados (Goodman *et al.*, 2003). De siete a doce días después de una infección *in vitro*, los cultivos de oligodendrocitos muestran signos de citopatología evidente como pérdida celular, disminución del tamaño y aumento drástico de la fusión célula a célula creando sincitios. La Figura 21 muestra la formación de sincitios en oligodendrocitos cocultivados con células Molt-3 infectadas con herpesvirus (Albright *et al.*, 1998).

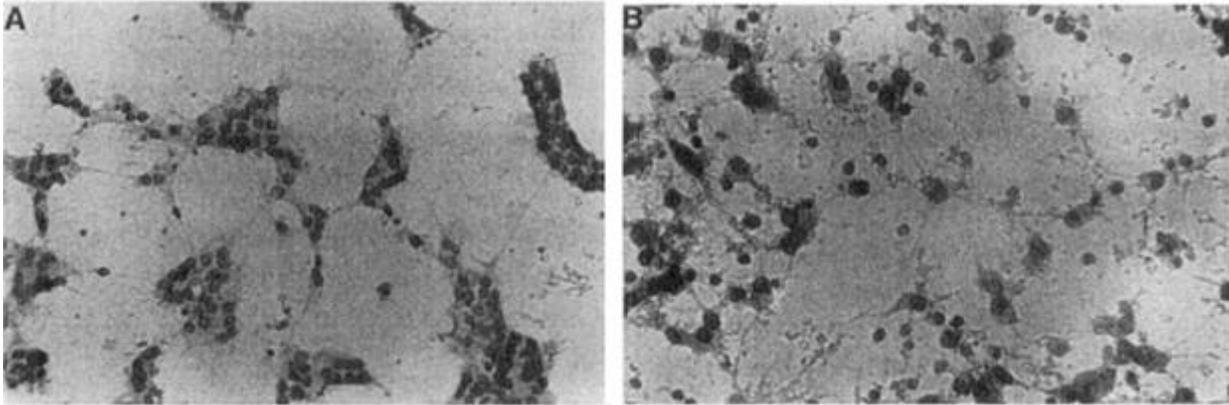


Figura 21. Citopatología HHV6 en oligodendrocitos.

Los oligodendrocitos expuestos a células Molt-3 infectadas con HHV6 muestran sincitios de entre cinco y más de 20 núcleos. **B.** Los oligodendrocitos expuestos de células Molt-3 control no infectadas muestran la morfología normal del cultivo y procesos filamentosos característicos de dicha línea celular, pero no muestran formación de sincitios. Tomado de Albright, A. V et al. 1998. “*The Effect of Human Herpesvirus-6 (HHV-6) on Cultured Human Neural Cells: Oligodendrocytes and Microglia.*” *Journal of Neurovirology* 4(5):486–94.

Mediante microscopía electrónica de barrido del cultivo de oligodendrocitos infectados se observan varias partículas virales de núcleo denso consistentes en tamaño y morfología con los viriones de HHV6 como se aprecia en la Figura 22 (Albright *et al.*, 1998).

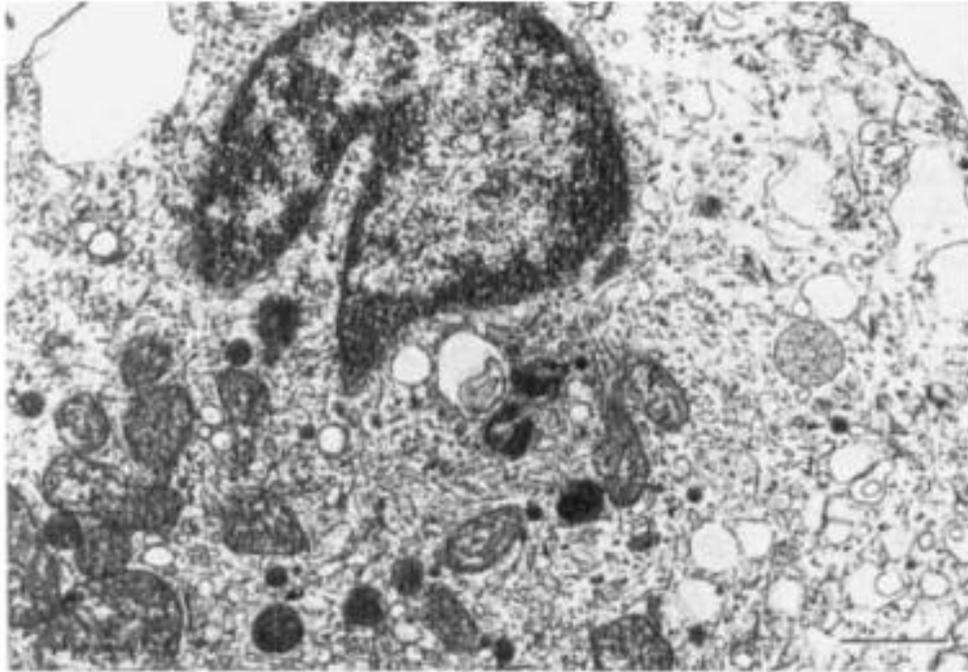


Figura 22. Microscopia electrónica de barrido para oligodendrocitos infectados con HHV6.

Cultivo de oligodendrocitos infectado con HHV6. Se observan partículas virales presentes en el cultivo, lo que sugiere una infección y replicación viral activa. Tomado de Albright, A. V et al. 1998. "The Effect of Human Herpesvirus-6 (HHV-6) on Cultured Human Neural Cells: Oligodendrocytes and Microglia." *Journal of Neurovirology* 4(5):486–94.

Para establecer la infección HHV6A utiliza a CD46 como receptor de entrada a la célula huésped. CD46 es un regulador de la activación del complemento en las células nucleadas, mientras que HHV6B utiliza el receptor CD134 (OX40) miembro de la súper familia del factor de necrosis tumoral (TNF), el cual está presente en linfocitos T activados (Reynaud *et al.*, 2014; Agut, Bonnafous y Gautheret-Dejean, 2015).

2.5.3. Desmielinización asociada a HHV6

La primera evidencia que asocia al virus HHV6 con esclerosis múltiple surgió en 1995, cuando Challoner y colaboradores informaron la presencia de DNA viral de la variante HHV6B en los oligodendrocitos que rodean las placas o lesiones presentes

en esclerosis múltiple. La infección de los oligodendrocitos se confirmó mediante microscopía electrónica, mostraron la presencia de partículas de HHV6 intracelulares (Albright *et al.*, 1998). Los estudios posteriores que respaldan el papel del virus HHV6 en la esclerosis múltiple demuestran mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la presencia de DNA genómico viral en tejidos cerebrales, células sanguíneas o suero y en líquido cefalorraquídeo, además de títulos elevados de IgM específica de HHV6 junto a una expresión menor de IgG en pacientes con esclerosis múltiple. Además estudios concomitantes reportan niveles más altos de expresión de HHV6 en tejido cerebral con esclerosis múltiple que en cerebros de pacientes sanos (Leibovitch y Jacobson, 2014). En la Figura 23 se muestra un ejemplo de la expresión de HHV6 detectado por inmunohistoquímica (IHQ) sobre una lesión de esclerosis múltiple. Se observa una presencia predominante del virus en la periferia de la lesión a comparación con las áreas no lesionadas dentro de la sustancia blanca.

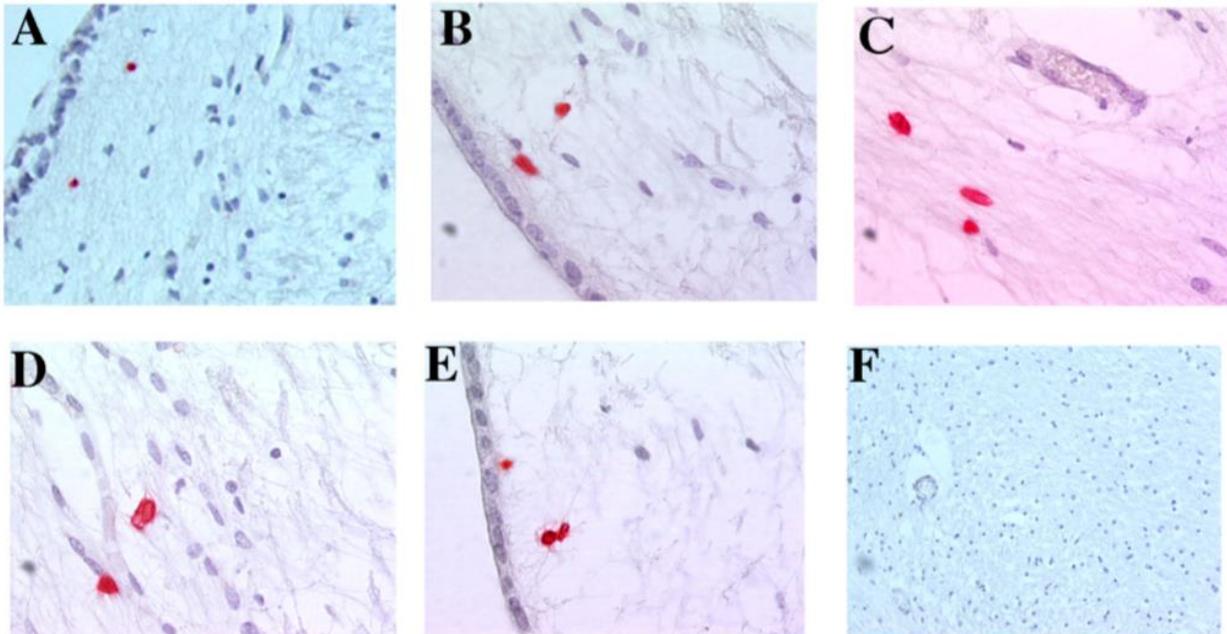


Figura 23. Expresión de HHV6 en una lesión periventricular de EM detectable por Inmuno histoquímica.

Se observan partículas virales positivas (en rojo) sobre la lesión periventricular (A-E), pero no en la sustancia blanca (F). Rojo: HHV-6 gp116. Las lesiones de EM se obtuvieron de un subconjunto de material del paciente previamente informado. Tomado de Leibovitch, Emily C. and Steven Jacobson. 2014. "Evidence Linking HHV-6 with Multiple Sclerosis: An Update." *Current Opinion in Virology* 9:127–33.

Las observaciones del mRNA junto a la expresión de proteínas virales, específicamente en oligodendrocitos, han resultado fundamentales para establecer la hipótesis de que el virus HHV6 puede ser un impulsor de la patogénesis en la esclerosis múltiple (Leibovitch y Jacobson, 2014).

2.6. Validación por PCR en tiempo real

2.6.1. PCR en tiempo real

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica desarrollada en 1986 por Kary Mullis que permite amplificar *in vitro* fragmentos específicos de DNA. Está basada en la habilidad de la enzima DNA polimerasa para sintetizar una nueva

cadena de DNA complementaria a la cadena molde que se utiliza. Debido a que la DNA polimerasa no puede comenzar a elongar una cadena de DNA *de novo* es necesario un extremo 3'-OH preexistente. (J. Sambrook *et al.*,1989). En la Tabla 5 se en listan los componentes necesarios para llevar a cabo la reacción de PCR en el laboratorio. El procedimiento de la reacción de PCR se lleva a cabo en un termociclador y consiste en tres pasos que se repiten por un número determinado de ciclos, los cuales se describen a continuación:

Desnaturalización. Para llevar a cabo la reacción es necesario separar ambas cadenas del DNA molde, así que durante el primer ciclo la muestra se somete a 95°C por 5 minutos para asegurar que tanto las regiones ricas en A/T como las ricas en G/C se separen. En los ciclos subsecuentes la desnaturalización se lleva a cabo en periodos de 10-15 s. (Garibyan y Avashia, 2013)

Alineamiento de los cebadores al DNA molde de cadena simple. La temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos flanqueantes es crítica. Si ésta es muy alta, la alineamiento es pobre y el rendimiento de amplificación es bajo; Si la temperatura pueden existir alineamientos inespecíficos en diversas regiones del DNA molde, resultando en la amplificación de fragmentos no deseados. Por lo tanto, inmediatamente ha terminado la fase de desnaturalización, la temperatura disminuye a alrededor de 60°C por 30 segundos (J. Sambrook *et al.*,1989).

Elongación. La elongación o construcción de la cadena se lleva a cabo a la temperatura óptima para la enzima Taq DNA Polimerasa (72-78°C) por alrededor de un minuto. El tiempo de elongación depende del tipo de DNA polimerasa y el tamaño del fragmento a amplificar (amplicón). (Dorak M. 2006 ; J. Sambrook *et al.*,1989) En la Figura 24 se ilustra cada fase de un ciclo de PCR.

Tabla 5. Componentes de la reacción de PCR.

		Referencias
RT-PCR	La retro transcripción es una reacción previa a la PCR en la cual se obtiene <i>DNA complementario</i> (cDNA) a partir de una muestra de RNA.	(J. Sambrook <i>et al</i> ,1989) (Garibyan y Avashia, 2013)
DNA molde	Es el DNA muestra que contiene la secuencia de interés.	
Cebadores	Son cadenas cortas de entre 18-20 nucleótidos complementarias al DNA molde. Para la reacción de PCR se requieren dos primers: sentido y antisentido. El primer cebador se une complementariamente a la cadena 3'-5' del DNA molde, mientras que el primer antisentido se une complementariamente a la cadena 5'-3'. De esta manera se flanquea la región de interés del resto de la muestra. (Figura a.1)	
Deoxinucleótidos (dNTPs)	Son los precursores de los nucleótidos utilizados por la enzima DNA polimerasa. Están formados por desoxirribosa, una base nitrogenada que puede ser adenina, timina, citosina o guanina y un grupo trifosfato necesario para formar el enlace éster-fosfato.	
Amortiguador de pH	El amortiguador que se utiliza en la reacción de PCR es generalmente Tris-Cl 10mM. Este amortiguador ajusta el pH entre 8.3-8.8 mientras se encuentra a temperatura ambiente; Durante la reacción la temperatura se eleva entre los 72° C por lo cual el amortiguador trabaja en un rango de pH entre 7.0-7.2.	
Taq DNA Polimerasa	Es una enzima DNA polimerasa termo resistente, producida por la bacteria <i>Thermus aquaticus</i> . Es utilizada en la PCR gracias a que resiste altas temperaturas sin desnaturalizarse o perder su función y eficiencia. Requiere cationes divalentes generalmente Mg ²⁺ como cofactor, por lo tanto debe complementarse con una solución de MgCl ₂ 1.5 mM.	

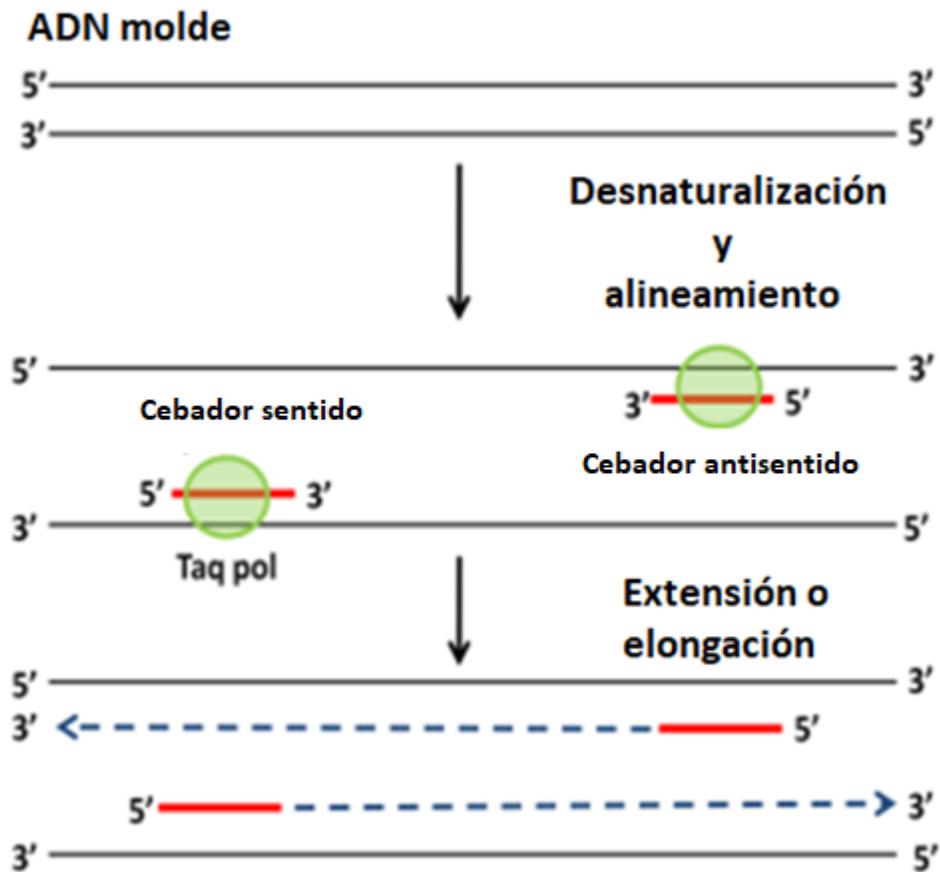


Figura 24. Fases de la reacción de PCR.

Durante la fase de desnaturalización se aplica una temperatura alta cercana a 95°C para separar las cadenas del ADN molde. Posteriormente se baja la temperatura alrededor de 60°C para favorecer la unión del primer Forward a la cadena molde 3'-5' mientras el primer Reverse se une a la cadena molde 5'-3'. Por último, se eleva la temperatura a 72°C para que la enzima taq Polimerasa comience la elongación de la cadena a partir del extremo 3'-OH de cada primer. El ciclo se repite entre 25-30 veces, lo que permite amplificar y aislar el fragmento de interés. Modificado de J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Vol. 2.

La ventaja de la PCR en tiempo real sobre la PCR de punto final es que es posible monitorear el proceso de amplificación durante la reacción, ciclo por ciclo. Esto se logró gracias a la implementación de sistemas basados en señales fluorescentes que son proporcionales al número de amplicones obtenidos al final de cada ciclo. (Kralik y Ricchi, 2017) En ciclos iniciales, la fluorescencia es demasiado baja para ser

distinguible del fondo. Sin embargo, cuando la cantidad de fluorescencia se encuentra en un nivel detectable se considera que es proporcional al número de moléculas de ADN iniciales en la muestra. (Bustin *et al.*, 2009).

La amplificación por PCR sigue una cinética exponencial suponiendo que en condiciones de 100% de eficiencia al final de cada ciclo se espera obtener el doble del número de amplicones que al inicio. La reacción pasa por tres fases completamente distinguibles: línea base, fase exponencial o geométrica y fase estacionaria (figura 25). (Higuchi *et al.*, 1993)

Línea base. La cantidad de amplicones obtenidos no son suficientes para que el equipo detecte un cambio de la señal fluorescente, y sólo se observa la lectura de fondo.

Fase exponencial o geométrica. Los reactivos y la cantidad de amplicones se encuentran en condiciones abundantes por lo cual la eficiencia de la reacción es cercana al 100%. Se obtiene el doble de amplicones al terminar cada ciclo por lo cual su cinética es de tipo 2^n . Es la región de mayor confianza cuantitativa.

Fase estacionaria o plateau. En esta fase, los reactivos comienzan a ser una limitante y la eficiencia de la reacción disminuye drásticamente por lo cual la acumulación de producto es casi nula. Generalmente se registra entre los 30 a 35 ciclos. (Dorak M. 2006)

Para determinar el valor del umbral de detección o el límite mínimo de detección de la señal (*threshold*), éste corresponde a 10 veces el valor de la desviación estándar de la media de la señal de la línea base, para garantizar que la medición se encuentra dentro de la fase exponencial. Este valor se utiliza para comparar distintas muestras a amplificar entre sí y se conoce como ciclo de cuantificación (Cq) también conocido como *threshold cycle* (Ct) (Higuchi *et al.*, 1993)

El valor de Cq es inversamente proporcional a la cantidad de DNA inicial presente en la muestra, debido a que entre mayor cantidad de molde exista, necesitará menor número de ciclos para alcanzar el umbral de detección (Bustin *et al.*, 2009).

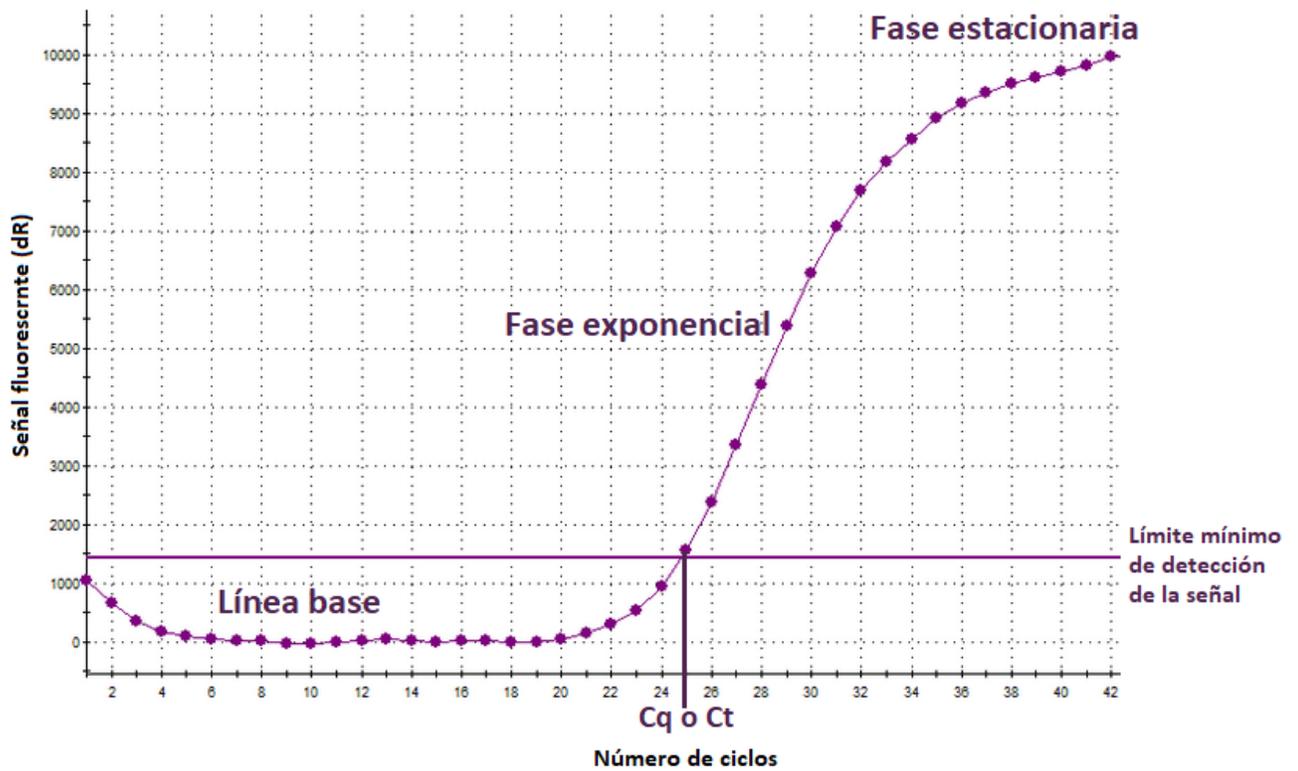


Figura 25. Cinética de la reacción de qPCR.

La gráfica que representa las fases cinéticas de la reacción de PCR en tiempo real se conoce como plot de amplificación. El detector registra la cantidad de señal fluorescente al finalizar cada ciclo y lo registra en forma de gráfico. En el plot se observa la fase inicial o de línea base, la fase exponencial, y la fase estacionaria. Modificado de Google imágenes.

2.6.2. Diseño de cebadores

Una parte fundamental para el éxito de la amplificación por PCR es el diseño adecuado de los oligonucleótidos flanqueantes que funcionarán como cebadores. Éstos deben ser suficientemente específicos para garantizar que el ensayo tenga una buena sensibilidad, exactitud y robustez. (Bustin *et al.*, 2009; Raymaekers *et al.*, 2009; Bustin y Huggett, 2017)

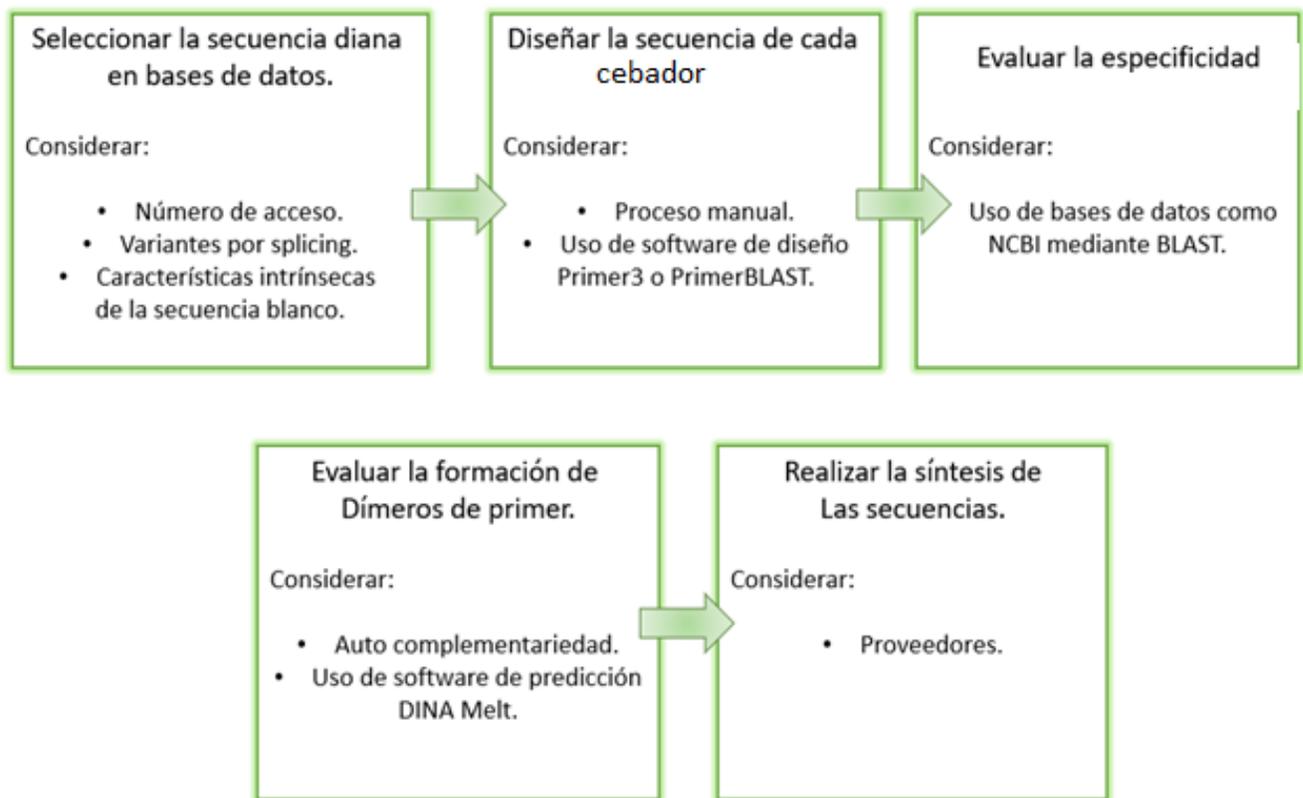
En la Tabla 6 se examinan las principales características que debe cumplir un oligonucleótido que será empleado en la amplificación por PCR.

Tabla 6. Características óptimas para el diseño de primers.

Criterio	Rango óptimo	Referencias
Tamaño	20-25 nucleótidos.	(Bustin y
T _m	56-62°C	Huggett, 2017)
Base del extremo 3'	Citosina o Guanina	(Dorak M. 2006)
Diferencia de T _m entre ambos primers	<5°C	(Raymaekers <i>et al.</i> , 2009)
Contenido de CG	40-55%	
Complementariedad con el molde	100%	
Tamaño del amplicón	A partir de 150 pares de bases.	
Ubicación	Alrededor de 35 pares de bases rio arriba y rio debajo de la región flanqueante	
Complementariedad entre ambos primers	Nula	
Especificidad con el molde	100%	
Presencia de poli X	Evitar regiones en la secuencia donde se repita en tándem alguna de las cuatro bases. (poli A, poli T, Poli G o poli C)	

Una vez considerados los parámetros óptimos para el diseño de cebadores, el primer paso a seguir es determinar manualmente o con uso de herramientas bioinformáticas

la secuencia que se requiere para el blanco de PCR considerando el tipo de ensayo a realizar (amplificación de genes, búsqueda de rearrreglos, análisis de variable de nucleótido simple (SNP), perfil de expresión de genes, entre otros). El siguiente paso es identificar en bases de datos (NCBI y BLAST) genes o secuencias relacionadas o con alta homología a la secuencia blanco y evitar que el cebador presente sitios de unión inespecíficos. Posteriormente se evalúa la capacidad de formar dímeros de primer o estructuras secundarias entre el par de cebador a utilizar y finalmente se realiza la optimización y estandarización en la reacción de PCR (Dorak M, 2006)



Cuando el diseño de los cebadores se realiza de forma manual, se debe calcular la temperatura de fusión o temperatura de melting (T_m) en base al contenido de A/T y C/G en la secuencia de cada primer. El método más utilizado es la aproximación de Wallace:

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$$

Donde:

T_m- Temperatura de fusión.

A/T- contenido de Adeninas + Timinas

G/C- Contenido de Guaninas + Citocinas.

Existen diversos programas in silico de diseño. Los más utilizados son *Primer 3*, *Primer-BLAST* y *Vector NTI*. Algunos proveedores de equipos para qPCR incluyen softwares de diseño de primers.

2.6.3. Sistemas de detección

Los primeros ensayos de PCR en tiempo real utilizaban bromuro de etidio que era irradiado con luz UV lo que resultaba en una señal fluorescente que era registrada por una cámara de luz (Higuchi *et al.*, 1993). Sin embargo, este método presenta varias desventajas, como son la baja sensibilidad y especificidad del bromuro de etidio, así como los riesgos de salud que conlleva utilizar este agente. Actualmente los métodos de detección más utilizados son las sondas TaqMan y SYBR Green. (Tabla 7) (Ponchel *et al.*, 2003). En la fase inicial de la reacción de PCR, el producto de interés se encuentra en baja concentración, por lo tanto, la señal tanto de SYBR Green como de las sondas TaqMan es muy escasa para ser detectada por el equipo y sólo se registra la línea base correspondiente al ruido de fondo. Para obtener el C_q (C_t) es necesario que la señal alcance un nivel de fluorescencia determinado, el cual para ambos casos es directamente proporcional a la cantidad de producto obtenido. (Dorak M, 2006). Cuando se utiliza SYBR Green se debe realizar la validación de especificidad mediante un ensayo de disociación o *curva melt*. El cual consiste en aumentar la temperatura gradualmente hasta los 95°C de manera que las hebras de DNA se desprendan gradualmente y se registra la fluorescencia durante todo el proceso. La curva presenta un punto de inflexión correspondiente a la temperatura de melting (T_m) debido a que en ese punto el 50% del producto de amplificación se encuentra desnaturalizado. (Dorak M. 2006; Kralik y Ricchi, 2017)

Tabla 7. Fundamento de los métodos SYBR Green y las sondas TaqMan.

<p>SYBR Green</p>	<p>SYBR Green es un colorante fluorescente que se asocia de manera no covalente al surco menor de la doble cadena de ADN. Al hacerlo, presenta una resonancia de FRET (Fluorescencia a través de transferencia de energía por resonancia) que aumenta su energía de emisión fluorescente a una longitud correspondiente al color verde que es detectada por el quipo, de ahí su nombre. Esta fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de producto formado en cada ciclo de PCR. Es bastante eficiente y sensible además de ser un método relativamente de bajo costo en comparación con las sondas TaqMan.</p> <p>Como desventaja se tiene que no es específico para un solo producto, y puede asociarse a ADN de doble cadena formado por dímeros de primer o productos inespecíficos.</p>	<p>Referencias</p> <p>(Corley, 2004; Dorak y Dorak, 2006)</p>
<p>Sondas TaqMan</p>	<p>Este método utiliza sondas que se unen específicamente a la región central del sitio diana de interés lo que hace altamente específico este método. En los extremos de la sonda se encuentra marcada con son tipos de fluoróforos, un reportero en el extremo 5' y un apagador o quencher en el extremo 3'. El primer fluoróforo emite una señal fluorescente que no es detectada cuando se encuentra unido al quencher mediante la sonda. La sonda presenta una t_m mayor que los primers de manera que se une al sitio diana antes de que comience la elongación. En la etapa de elongación, la Taq Polimerasa degrada la sonda a su paso y libera el fluoróforo reportero del quencher emitiendo una señal detectable por el equipo.</p>	

2.6.4. Proceso de validación de PCR en tiempo real

La validación de un ensayo de PCR en tiempo real (qPCR) es esencial para garantizar que el ensayo sea tan sensible como se requiera y que sea específico para el objetivo de interés. Por ejemplo, la detección de DNA de un patógeno o el perfil de expresión de mRNA requieren de una alta sensibilidad mientras que la detección de una variante de nucleótido simple (SNP) requiere una alta especificidad y la cuantificación de carga viral en un paciente requiere ambas características. La validación proporciona los datos necesarios para justificar el uso continuado del ensayo en futuros proyectos de investigación (Bustin *et al.*, 2009). Existen diversos parámetros como son la solución amortiguadora de la reacción, la concentración de los cebadores, la T_m , la concentración de magnesio e incluso la velocidad de cambio entre las temperaturas que pueden modificarse para optimizar el proceso del ensayo (J. Sambrook *et al.*, 1989; Bustin y Huggett, 2017).

El procedimiento para seguir consta de los siguientes pasos:

Validar el diseño de los primers.

Optimizar la concentración de cada cebador.

Optimizar la temperatura de alineamiento de los cebadores.

Optimizar los componentes de la reacción.

Validación de la especificidad del ensayo por curva melt y análisis de rendimiento por curva estándar.

2.6.4.1 Validar el diseño de los cebadores:

Para validar el diseño de los primers se debe determinar la especificidad, la sensibilidad y la robustez dentro de una reacción de amplificación por PCR, por lo tanto, los puntos a considerar son los siguientes:

Su secuencia es homóloga a la secuencia diana de interés y que entre ambos cebadores no adoptan estructuras secundarias. Para ello se puede utilizar la

herramienta sigma.com/probedesignonline que examina la posibilidad de generar dímeros de cebador.

Altamente específico para la secuencia blanco, y tener un solo sitio de unión dentro de la muestra.

Se puede utilizar la herramienta http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html para examinar la correcta complementariedad del primer reverso.

Detectar las posibilidades de una variación de empalme por splicing.

Los primers y el amplicón no deben formar estructuras secundarias.

Como regla general, si los cebadores funcionan bien en un amplio gradiente de temperatura, el ensayo tiende a ser robusto. (Raymaekers *et al.*, 2009; Bustin y Huggett, 2017)

2.6.4.2 Optimizar la concentración de cada cebador:

Cuando se optimizan las concentraciones de cada primer, se selecciona una temperatura de alineamiento fija (generalmente 60 ° C) y las condiciones óptimas para cada primer se abordan de forma independiente.

Se debe considerar que cuando se usa una qPCR basada en sonda, a menudo se obtienen resultados satisfactorios usando concentraciones finales de ambos primers a 500 nM y la sonda a 250 nM, especialmente si el objetivo de PCR es abundante y no se requiere sensibilidad máxima. Las concentraciones algo menores de primer, entre 200 nM y 400 nM, son típicamente mejores cuando se usa la detección basada en colorante SYBR Green para minimizar la amplificación inespecífica y cuando se optimizan las reacciones múltiples. El rendimiento del ensayo generalmente se prueba en un rango de concentraciones de primers, por ejemplo, de 50-600 nM, usando cada cebador en cada concentración (Raymaekers *et al.*, 2009). (Figura 26)

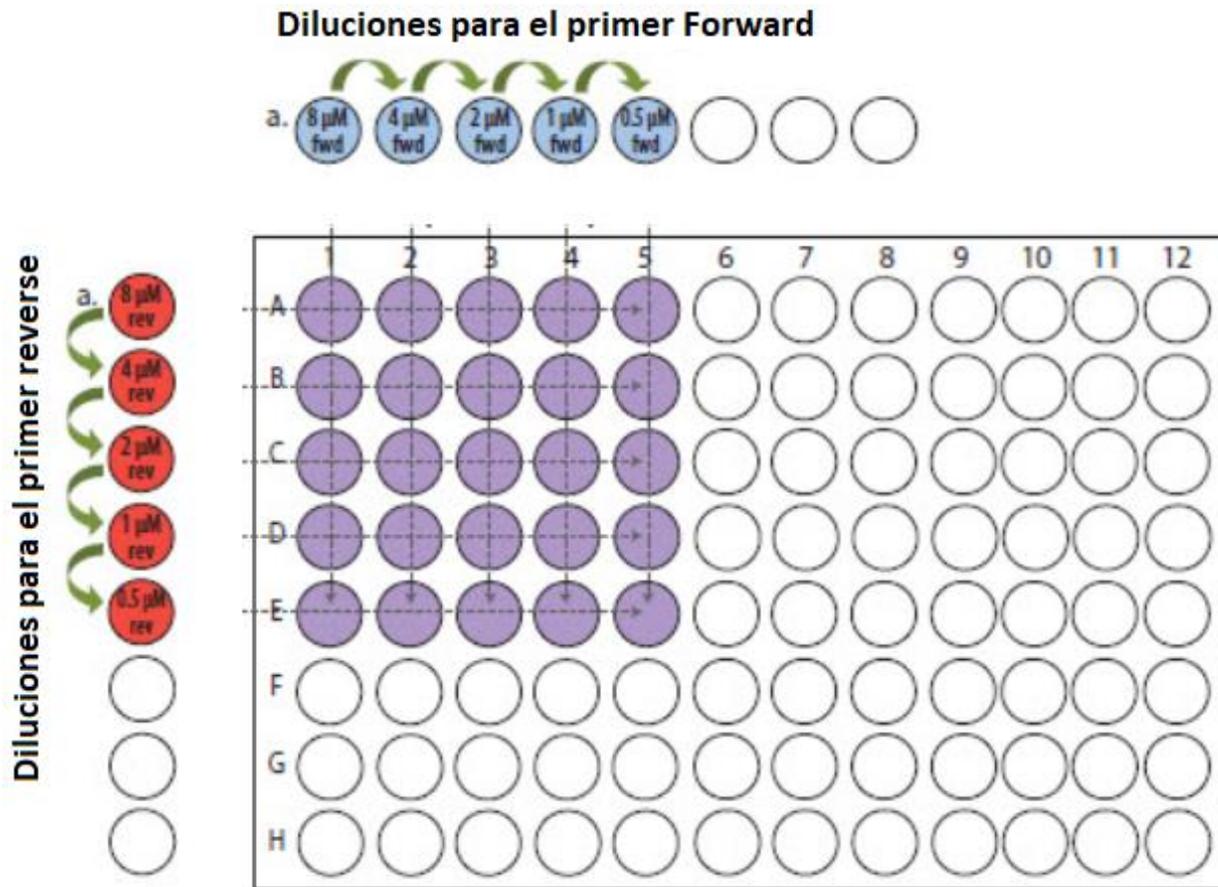


Figura 26. Ejemplo para optimización de la concentración de primers.

Se prueban distintas diluciones de cada uno de los primer individualmente y se elige la combinación de concentraciones que producen un Cq más bajo y la variación más baja en las réplicas.

2.6.4.3 Optimización de la temperatura de alineamiento de los primers.

Una vez seleccionada la concentración óptima de cada cebador, se realizan pruebas de temperatura en un intervalo de 55°C-65°C. Algunos instrumentos tienen bloques de gradiente que facilitan la optimización de temperatura en una sola ejecución. Para cada temperatura, se evalúa la especificidad del ensayo mediante una curva melt. La temperatura óptima es aquella que presenta el Cq más bajo, una alta reproducibilidad entre las muestras utilizadas y mayor especificidad (Raymaekers *et al.*, 2009).

2.6.4.4 Optimización de los componentes de la reacción.

Algunos ensayos se ven afectados por las condiciones del amortiguador de reacción o la concentración de $MgCl_2$. Debido a que a concentraciones considerables de Mg^{2+} aumenta la estabilidad o la temperatura de fusión de los cebadores hacia el molde. Sin embargo, un exceso de Mg^{2+} puede ocasionar eventos de hibridación entre primer-primer o uniones inespecíficas entre los primers y el templado. Esto tiene un impacto directo en la especificidad y rendimiento del ensayo. Por lo tanto, la optimización de Mg^{2+} se realiza probando un gradiente desde 1.5-5 mM y evaluando la eficiencia mediante un valor bajo de C_q como la especificidad mediante una curva melt (Nolan and Bustin, no date; Raymaekers *et al.*, 2009).

2.6.4.5 Validación de la especificidad del ensayo por curva Melt y análisis de rendimiento por curva estándar

Una vez que el ensayo de qPCR ha sido optimizado en cada uno de los rubros anteriores es importante determinar la especificidad general del ensayo, la eficiencia y el rango dinámico técnico.

Para evaluar la especificidad el ensayo, se realiza la curva melt utilizando un colorante reportero, generalmente SYBR Green o sondas que no se hidrolizan. Una vez que se ha producido el amplicón, se programa el equipo dentro de un gradiente de temperaturas que van generalmente de 55°C a 95°C cuidando que la T_m del amplicón se encuentre dentro de este rango. La rampa de temperaturas generalmente lleva una velocidad de 1°C/15s. Los resultados se representan como la tasa de cambio de la fluorescencia frente a la temperatura.

Se aplica la primera derivada a la función obtenida. Cuando el ensayo es específico a un producto, la gráfica presenta un único pico correspondiente a la T_m del amplicón (Figura 27). En cambio, si presenta más picos adicionales se debe revisar cada paso de optimización para mejorar la especificidad. Los productos no específicos se pueden analizar por a electroforesis de gel de agarosa. (Raymaekers *et al.*, 2009)

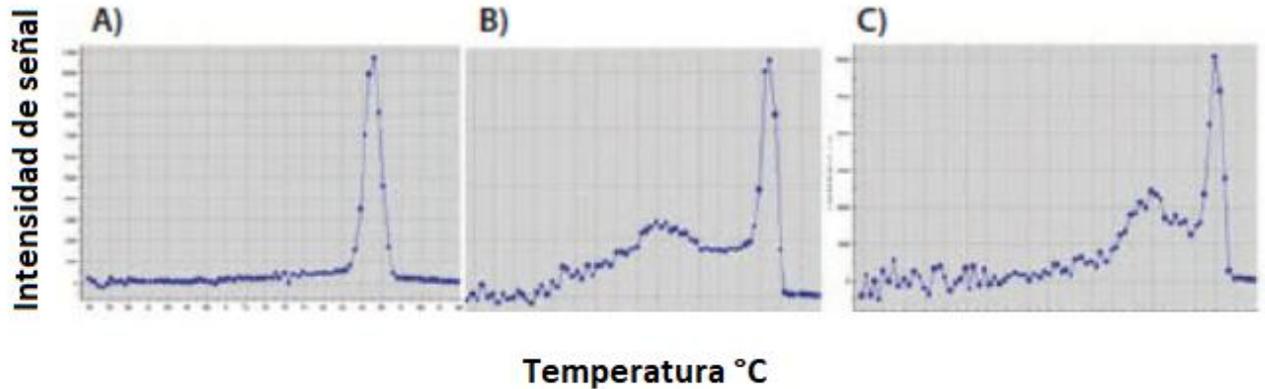


Figura 27. Evaluación del ensayo por curva Melt.

Se observa un solo pico correspondiente a la t_m del amplicón de interés. B) y C) muestran el pico correspondiente al amplicón de interés más otros picos menores que representan productos no específicos de t_m menores.

Para evaluar el rendimiento del ensayo se construye una curva estándar a partir de una amplia serie de diluciones de un molde de ADN conocido, lo que garantiza que alcancen una dilución límite, la cual pertenezca a la mínima dilución donde se observa amplificación. Esto nos permite determinar el rango dinámico del ensayo. La selección de un molde de DNA de referencia permite realizar una validación inter e intralaboratorio, por lo cual se utilizan plásmidos lineales, oligonucleótidos sintéticos o fragmentos de DNA.

La eficacia del ensayo de qPCR se determina mediante el gráfico del logaritmo en base 10 de la concentración frente a los valores de C_q . Un ensayo con una eficiencia del 100% demostraría una duplicación del producto en cada ciclo ($E = 2$) y una pendiente de -3.323. (Raymaekers *et al.*, 2009)(Figura. 28). La eficiencia se puede calcular de acuerdo con la ecuación: Eficiencia (E) = $10^{-1 / \text{pendiente}} - 1$ (Raymaekers *et al.*, 2009).

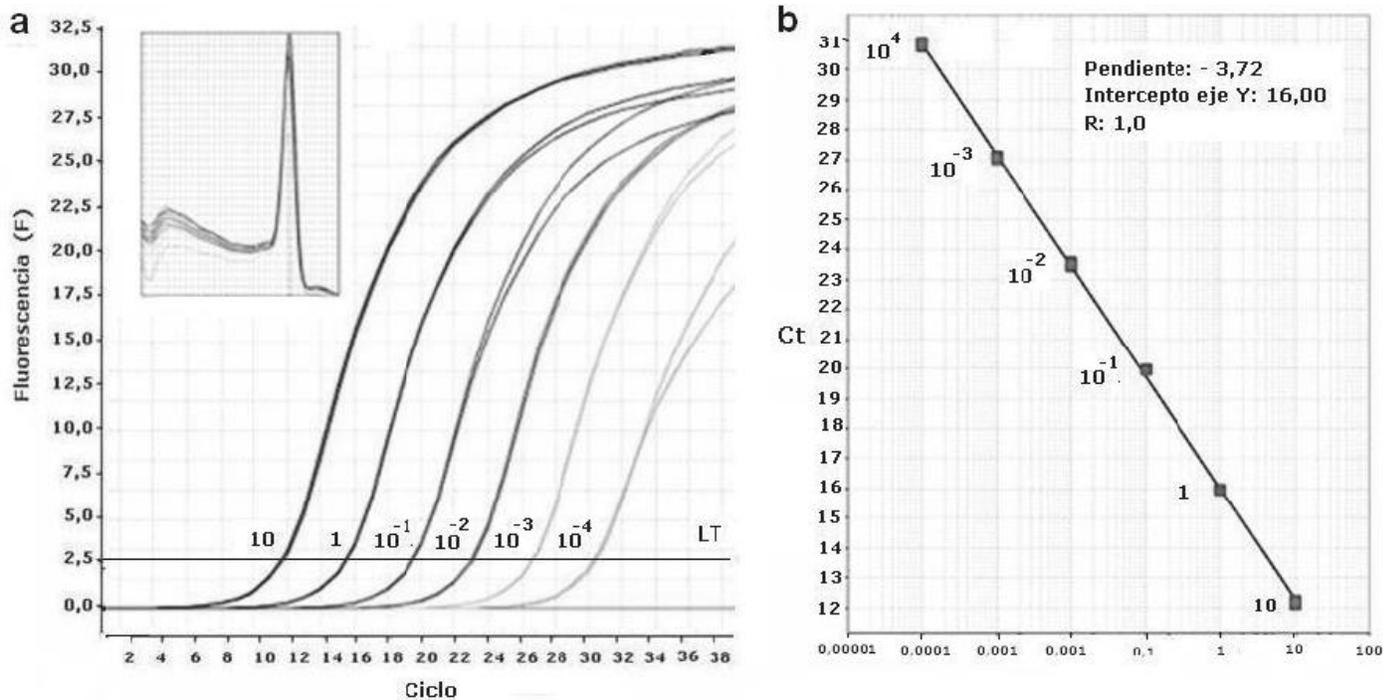


Figura 28. Curva estándar para qPCR.

a. Representación de la señal fluorescente frente a los distintos valores de Cq para cada dilución del estándar. b. Curva estándar, construida mediante el valor de Cq (Ct) frente al logaritmo de la concentración del estándar. Tomado de Flores, M., A. Vasconcellos, and M. Paredes. 2015.

Para representar la eficiencia en porcentaje, se considera como 100% un $E=2$; por lo tanto, una eficiencia del 95% equivale a $E = 1,9$. La pendiente (m) se determina a partir de la curva estándar de la ecuación $y = mx + C$, donde C es la intersección teórica en el eje y y proporciona una medida relativa de la sensibilidad del ensayo. Las pendientes entre -3.1 y -3.6 resultan en eficiencias entre el 90% y el 110% y son típicamente aceptadas, pero es importante esforzarse por acercarse al 100% tanto como lo permita el ensayo (Raymaekers *et al.*, 2009).

2.6.5. Criterios de validación

Además de la optimización, los ensayos que se utilizan en entornos regulados deben considerarse mediante una validación analítica y documentación adecuada de acuerdo con las directrices ICH que se recomiendan para su adopción por los organismos reguladores de la Unión Europea, Japón y EE.UU. Generalmente, estas regulaciones tienen requisitos similares para la validación del ensayo, pero también tienen diferencias específicas que deben considerarse durante el diseño del protocolo de validación. Las principales características de un método bioanalítico que son esenciales para garantizar la aceptabilidad del rendimiento y la confiabilidad de los resultados analíticos son. Selectividad (especificidad), límite inferior de cuantificación, función de respuesta y rango de calibración (rendimiento, linealidad y rango de la curva de calibración), exactitud, precisión, estabilidad del analito en la matriz biológica. (Raymaekers *et al.*, 2009) Los parámetros de validación considerados para evaluar los puntos anteriores se concentran en la Tabla 8.

Tabla 8. Parámetros de validación para qPCR

Característica	Forma de medición	Parámetro de validación
Especificidad de los cebadores.	Curva Melt. Temperatura de melting.	Cuando existe especificidad de los cebadores por el gen de interés, en la segunda derivada de la curva melt se observa un único pico correspondiente a la temperatura de melting del amplicón obtenido.
Rango de calibración.	Curva de calibración.	La curva empleada es una curva estándar relativa en logaritmo base 5. Emplea un rango de cinco puntos equidistantes a diluciones 1:5, con los valores 625, 125,25, 5 y 1 que garantiza que la técnica es lineal dentro de dicho rango.
Rendimiento o eficiencia.	Ecuación de la recta para la curva de calibración.	El rendimiento se evalúa mediante la pendiente de la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración. Una validación adecuada requiere un valor del 100% +/- 10% de eficiencia.
Linealidad.	Ecuación de la recta para la curva de calibración.	La linealidad del método se evalúa mediante la correlación de la recta obtenida de la curva de calibración. Para que una validación sea adecuada se considera un valor de R^2 lo más cercano a 1.0.
Precisión y exactitud.	Repeticiones técnicas y biológicas.	Se deben realizar por lo menos tres repeticiones técnicas de cada medición para evaluar la precisión mediante el cálculo de la desviación estándar y el coeficiente de variación entre las repeticiones. Y se deben realizar por lo menos tres repeticiones biológicas (con tres muestras distintas tratadas del mismo modo) para evaluar la exactitud mediante el cálculo de la desviación estándar y el coeficiente de variación entre las muestras.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades desmielinizantes (ED) son patologías discapacitantes que producen daño degenerativo crónico del SNC que eventualmente conllevan a la muerte del paciente. En algunos casos de leucoencefalopatía multifocal progresiva se han detectado partículas virales del virus HHV6 en líquido cefalorraquídeo y en muestras de cerebro se ha encontrado el virus asociado a las placas escleróticas características de la esclerosis múltiple. Sin embargo, no se conoce el efecto que tiene la infección con HHV6 en células OPC sobre la síntesis de genes de mielina, Debido al neurotropismo que presenta Herpes virus 6 en células oligodendrogliales, es importante estudiar el efecto que presenta la infección de estas células en la expresión de los genes involucrados en la síntesis de mielina.

4. HIPÓTESIS

La infección por HHV6 en células precursoras de oligodendrocitos, producirá alteraciones en la maduración de estas células produciendo cambios moleculares en la expresión de los genes de mielina (CNPasa, MBP, PLP y MOG) y reguladores negativos de mielina por efecto de la replicación viral.

5. OBJETIVOS

5.1. General

- I. Estudiar el efecto de la infección por HHV6 en células precursoras de oligodendrocitos sobre la expresión de genes de mielina (CNPasa, MBP, PLP y MOG) y reguladores negativos de mielina.

5.2. Particulares

- I. Validar el método de cuantificación de expresión de genes de mielina (CNPasa, MBP, PLP y MOG) y reguladores negativos de mielina mediante RT-qPCR.
- II. Obtener el perfil de expresión temporal de los genes de mielina CNPasa y MBP en células precursoras oligodendrogiales infectadas y no infectadas con Herpes Virus Humano-6 (HHV6) a diferentes días de cultivo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Desarrollo del proyecto

El proyecto se desarrolló en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) dentro del laboratorio del Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas (CIENI) en colaboración con el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN).

6.2 Animales de laboratorio y obtención de cerebros

Los animales que se emplearon en este trabajo fueron ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) de 1 a 2 días de vida del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, las cuales se anestesiaron con isoflurano y se sacrificaron por decapitación con tijera quirúrgica para garantizar la viabilidad de las células oligodendrogliales a purificar y cultivar.

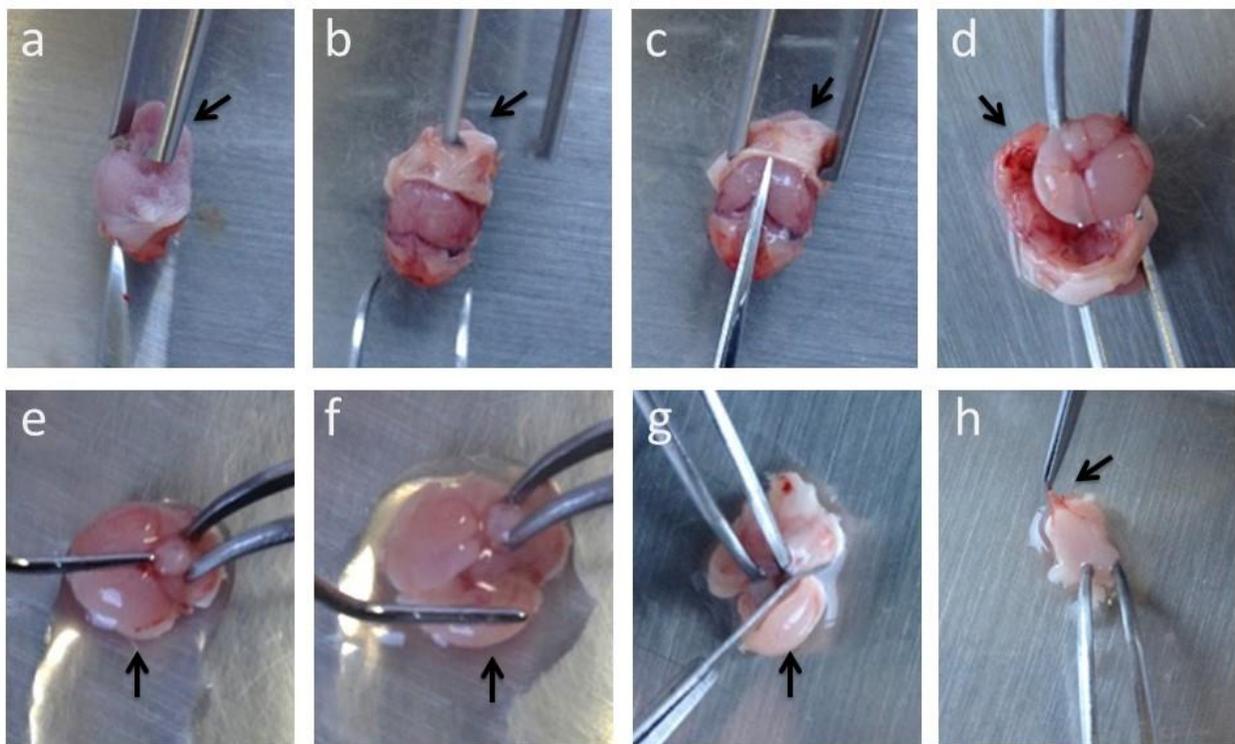


Figura 29. Obtención de cerebro de rata Wistar neonata.

a, una vez decapitada, la cabeza de la rata neonata es sujeta con pinzas, se corta para separar la piel por debajo de las orejas. **b**, la piel es separada del cráneo con ayuda de las pinzas, volteándola hacia la boca. **c**, realizar cuidadosamente tres cortes en el cráneo, sin tocar el cerebro: 1) Central, de la región occipital a la región

frontal. 2) Lateral derecho, de la región temporal derecha a la región ocular derecha. 3) Lateral izquierdo, de la región temporal izquierda a la región ocular izquierda. Eliminar las porciones del cráneo cortadas con ayuda de unas pinzas. **d**, separar el cerebro del cráneo con ayuda de pinzas y colocarlas en caja petri estéril. **e**, sujetar el cerebro, insertando unas pinzas en el cerebelo, y con un estilete, separar los lóbulos cerebrales. **f**, girar los lóbulos cerebrales del centro hacia afuera. **g**, Cortar ambos lóbulos cerebrales con bisturí. **h**, eliminar con ayuda de pinzas y bajo un microscopio estereoscópico las meninges que recubren el cerebro, revisando que no queden restos de meninges. Las flechas marcan la boca (a-d), los lóbulos (e-g), y la meninge (h).

6.3 Cultivo celular

Este trabajo recibió la aprobación de los Comités de Ciencia y Ética (número B17-13) del INER, en la Ciudad de México. Los OPC primarios se obtuvieron de las cortezas cerebrales de ratas en el día cero después del nacimiento (Kremer et al., 2009; Göttle et al., 2010). Las OPC se mantuvieron en medio de cultivo *DMEM* suplementado con L-glutamina (4 mM, Sigma-Aldrich), penicilina, estreptomycin (200 U / ml, Sigma-Aldrich)] y suero fetal bovino al 10% durante 2 semanas. Para aislar las OPC se empleó el método de agitación basado en las diferentes propiedades adherentes de las células gliales (McCarthy and de Vellis, 1980) y se plaquearon en medio SATO [DMEM suplementado con insulina bovina (5 µg / ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) transferrina humana (50 µg / ml, Sigma-Aldrich), BSA (100 µg / ml, Sigma-Aldrich), progesterona (6,2 ng / ml, Sigma-Aldrich), putrescina (16 µg / ml, Sigma-Aldrich)), selenito de sodio (5 ng / ml, Sigma-Aldrich), T3 (400 ng / ml, Sigma-Aldrich), T4 (400 ng / ml, Sigma-Aldrich), L-glutamina (4 mM, Sigma-Aldrich) , penicilina, estreptomycin (200 U / ml, Sigma-Aldrich)] y 0,5% de suero fetal bovino y se colocaron en placas de 24 pozos sobre poli-D-lisina (PDL 0,5 mg / l; Sigma-Aldrich) en plásticos de cultivo de tejidos recubiertos con PDL para inmunofluorescencia. Para iniciar la diferenciación espontánea de las células OPC, las células se transfirieron a medio SATO suplementado con un 0,5% de suero de ternera fetal e incubadas a 37°C y un ambiente de CO₂ al 5%.

6.4 Cultivo de HHV6

El Herpesvirus Humano 6AGS, se obtuvo del NIH de USA, en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Su cultivo se realizó en cocultivo con células HSB-2 en medio DMEM durante 1 semana. Se utilizaron células HSB-2 sin infectar como control. Tras un conteo celular de ambos cultivos se colocaron 100,000 células por pozo en una cámara de transwell con un poro de 0.4 μm para infectar tanto células precursoras, como el cultivo de mielinización con neuronas (Albright *et al.*, 1998)

6.5 Infección de oligodendrocitos con HHV6

Las OPC colocadas en las placas de 24 pozos con Poli-D-lisina se pusieron en contacto con las células HSB-2 infectadas y no infectadas durante 24 h mediante la cámara de transwell para permitir la infección. Posteriormente las OPC se colocaron en medio Sato con bajo contenido de suero bovino fetal (0.5%) para inducir su diferenciación hacia oligodendrocitos (Kremer *et al* 2009).

6.6 Extracción de RNA

Para extraer RNA total tanto de las células oligodendrogiales infectadas como control, se empleó el método de Qiagen utilizando el kit RNeasy Mini kit (cat. 74104). Este método consiste en la separación de ácidos nucleicos por columnas de afinidad selectivas. La suspensión celular de la muestra se somete a un proceso de lisis colocando 350 μL de amortiguador RLT adicionado con 1% de β -mercaptoetanol para 5×10^6 células. Se añade un volumen 1:1 de etanol del 96-100% para homogenizar el lisado y mezclar vigorosamente por 5 s. Transferir a una columna QIAshredder spin y se deja reposar 2 min. La muestra se centrifuga 15 s a 8000g. El líquido colectado se transfiere a una columna RNeasy Mini spin y se centrifuga 15s a 8000g. Se agregan 700 μL de amortiguador de lavado RW1 y se centrifuga 15 s a 8000g. Se agregan 500 μL de buffer RPE, se centrifuga 15s a 8000g y se repite el mismo paso una vez más centrifugando por 2 min. Se deja 5 min destapada la columna para permitir que el etanol presente en la muestra se volatilice y se añaden 30-50 μL de agua libre de RNasas sobre la membrana de la columna. La muestra se centrifuga 1 min a 8000g para eluir el RNA contenido en la membrana (Figura 30).

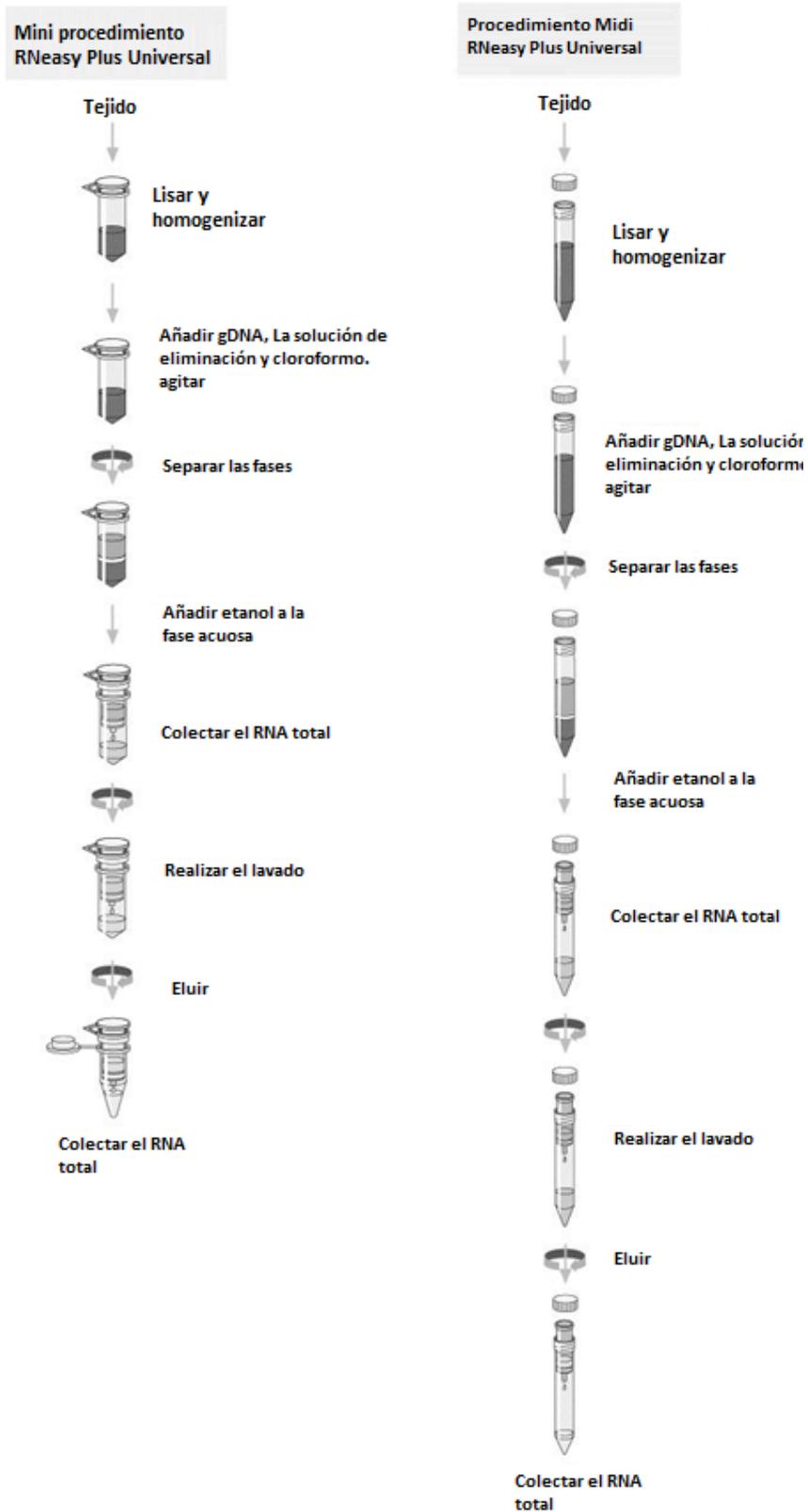


Figura 30. Procedimiento de extracción de RNA con el kit RNeasy kit de Qiagen.

6.7 Transcripción reversa

A partir del RNA se sintetizó el DNA complementario mediante una reacción de transcripción reversa empleando el kit de transcripción reversa de alta capacidad de Life Technologies (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, cat. 10186954). Se elabora una mezcla maestra 2x del kit la cual contiene la enzima transcriptasa reversa y dNTP equimolares necesarios para la reacción de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En placas de 96 pozos se añaden 10 μ L de la mezcla maestra a cada pozo o en tubos de 0.2 mL individuales, y se agregan 10 μ L de RNA (alrededor de 20 μ g de RNA). Posteriormente, la placa sellada o el tubo se centrifuga para eliminar cualquier burbuja presente y se ingresa al termociclador a 25°C por 10 minutos, seguido de una etapa de 37°C por 120 min, 85°C por 5 min y finalmente se mantiene a 4°C hasta su uso.

6.8 PCR en tiempo real (qPCR)

Para la validación de la técnica de cuantificación por PCR en tiempo real de los genes de mielina y reguladores negativos, se realizó la amplificación del cDNA obtenido de las muestras en una RT-qPCR empleando el equipo *StepOne* de Life Technologies y *iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix* de Bio RAD cat 172-5120 como marcador fluorescente. Los oligonucleótidos utilizados para cada gen a evaluar se diseñaron previamente en el laboratorio. La reacción de RT-qPCR se llevó a cabo en placas de 48 pozos MicroAmp (Applied Biosystems), empleando 5 μ L de DNA por reacción y 15 μ L de mezcla maestra de SYBRGreen adicionada con el par de cebadores correspondientes a cada ensayo. Las condiciones de la reacción por ciclo fueron: 1 min a 95°C, 15 s a 95°C y 1 min a 60°C durante 40 ciclos. Para la validación, se realizaron curvas de validación con cinco puntos a diluciones 1:5 junto a su respectiva curva Melt para cada gen a validar.

6.9 Cebadores y cálculo del tamaño de amplicón.

Para cada par de cebadores que se emplearon en la validación, se comprobó su especificidad y el sitio de unión con el gen de interés utilizando la herramienta de búsqueda y empalme *BLAST* de la base de datos *NCBI*. Posteriormente, se realizó el cálculo teórico del tamaño del producto de PCR (amplicón) con base en el sitio de

unión tanto del cebador *sentido* y el cebador *antisentido* junto a el espacio presente entre ellos. El tamaño del amplicón se obtuvo realizando la suma del tamaño en nucleótidos de ambos cebadores más el tamaño comprendido entre ellos. Por último, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2% para verificar el tamaño real de cada amplicón.

6.10 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos de qPCR para cada gen a validar se utilizó el programa GraphPad Prism 5. Con ello fue posible determinar si la validación de la técnica fue adecuada para el estudio de los genes blanco de este proyecto.

6.11 Panel de genes seleccionados para validación.

En este proyecto se seleccionaron doce genes con relevancia biológica en el proceso de mielinización para ser validados por qPCR para posteriormente evaluarse en muestras de cultivo celular de oligodendrocitos de rata infectados con HHV6 y cultivos control en un perfil temporal de infección.

Los genes seleccionados se enlistan en la Tabla 9.

Tabla 9. Lista de genes involucrados en el proceso de mielinización seleccionados para la validación.

Gene	Función	Referencias
<i>gapdh</i>	Enzima implicada en la fosforilación de gliceraldehído-3-fosfato en la ruta de la glucólisis en presencia de NAD. Gen de referencia en la reacción de qPCR.	(Jessen and Mirsky, 2008) Gene Cards.
<i>beta-tubulina</i>	Marcador estructural. Gen de referencia en la reacción de qPCR.	
<i>cnpasa</i>	Marcador de oligodendrocitos. Proteína de mielina.	
<i>mbp</i>	Proteína estructural de la mielina.	
<i>mog</i>	Marcador de oligodendrocitos. Proteína de mielina.	
<i>plp</i>	Proteína estructural de mielina.	
<i>p57kip2 o CDKN1C</i>	Factor de transcripción y regulador negativo de la expresión de genes de mielina.	
<i>id2</i>	Factor de transcripción y regulador negativo de la expresión de genes de mielina.	
<i>id4</i>	Factor de transcripción y regulador negativo de la expresión de genes de mielina.	
<i>hes1</i>	Factor de transcripción y regulador negativo de la expresión de genes de mielina.	
<i>hes5</i>	Factor de transcripción y regulador negativo de la expresión de genes de mielina.	
<i>Rock2</i>	Factor de transcripción y regulador negativo de la expresión de genes de mielina.	

7. RESULTADOS.

7.1 Validación

Las muestras que se emplearon en la validación se obtuvieron de cultivos celulares de oligodendrocitos purificados de ratas neonatas Wistar. Las muestras se colectaron los días 1, 3, 6, 9 y 10 de cultivo, siendo etiquetadas como se muestra en la tabla 10. El RNA total fue extraído mediante el kit RNeasey Mini kit (cat. 74104) y se obtuvo cDNA mediante el método de transcripción reversa. Para cada muestra se preparó una curva de concentración relativa con diluciones seriadas 1:5 siguiendo así una escala Log 5. A cada dilución se les asignó los siguientes valores relativos: 625, 125, 25, 5 y 1. Los datos obtenidos por qPCR de las tres curvas de validación se graficaron y se analizaron de manera global en una sola curva utilizando el programa GraphPad Prism 5.

Tabla 10. Muestras de cultivo celular empleadas para realizar las curvas de validación de los genes de interés.

# Cultivo X	Día de cultivo	# de Tubo	Etiqueta de la muestra
002	1	Tubo 1	JME-00X, 1
003		Tubo 2	JME-00X, 2
004	3	Tubo 3	JME-00X, 3
005		Tubo 4	JME-00X, 4
006	6	Tubo 5	JME-00X, 5
008		Tubo 6	JME-00X, 6
	9 o 10	Tubo 7	JME-00X, 7
		Tubo 8	JME-00X, 8

7.1.1 Genes estándar.

En este proyecto se emplearon GAPDH y B-tubulina como genes estándar. Para la validación de GAPDH se utilizaron las muestras JME-003,6 y JME-006,6 correspondientes al día seis de cultivo y la muestra JME-006,3 correspondiente al día tres de cultivo. Los resultados de la curva global dieron una pendiente de -3.481 ± 0.04641 , un valor de r^2 de 0.9924, un porcentaje de eficiencia de 93.76430365% y un valor p menor a 0.0001. En la validación de β tubulina se usaron las muestras JME-002,8, JME-003,8 y JME-006,2. Los resultados obtenidos de la curva global fueron una pendiente de -3.572 ± 0.06889 ; un valor de r^2 de 0.9843 con una eficiencia de 90.5229818%. El valor p obtenido es menor a 0.0001. En la Figura 31 se observan las curvas globales de validación para ambos genes, así como, los resultados de la curva melt correspondiente.

Los resultados de la prueba Melt para el gen de referencia GAPDH mostraron un solo pico prominente correspondiente a una temperatura de melting de 79.2°C congruente para todas las muestras. Para los tres controles negativos no presentan ningún cambio en todo el rango de temperatura evaluado. Mientras que el gen β -tubulina presenta un único pico en la curva Melt para todas las muestras, correspondiente a una temperatura de melting de 80.5°C . Los tres controles negativos empleados en la validación no presentan ningún pico en todo el intervalo de temperatura evaluado.

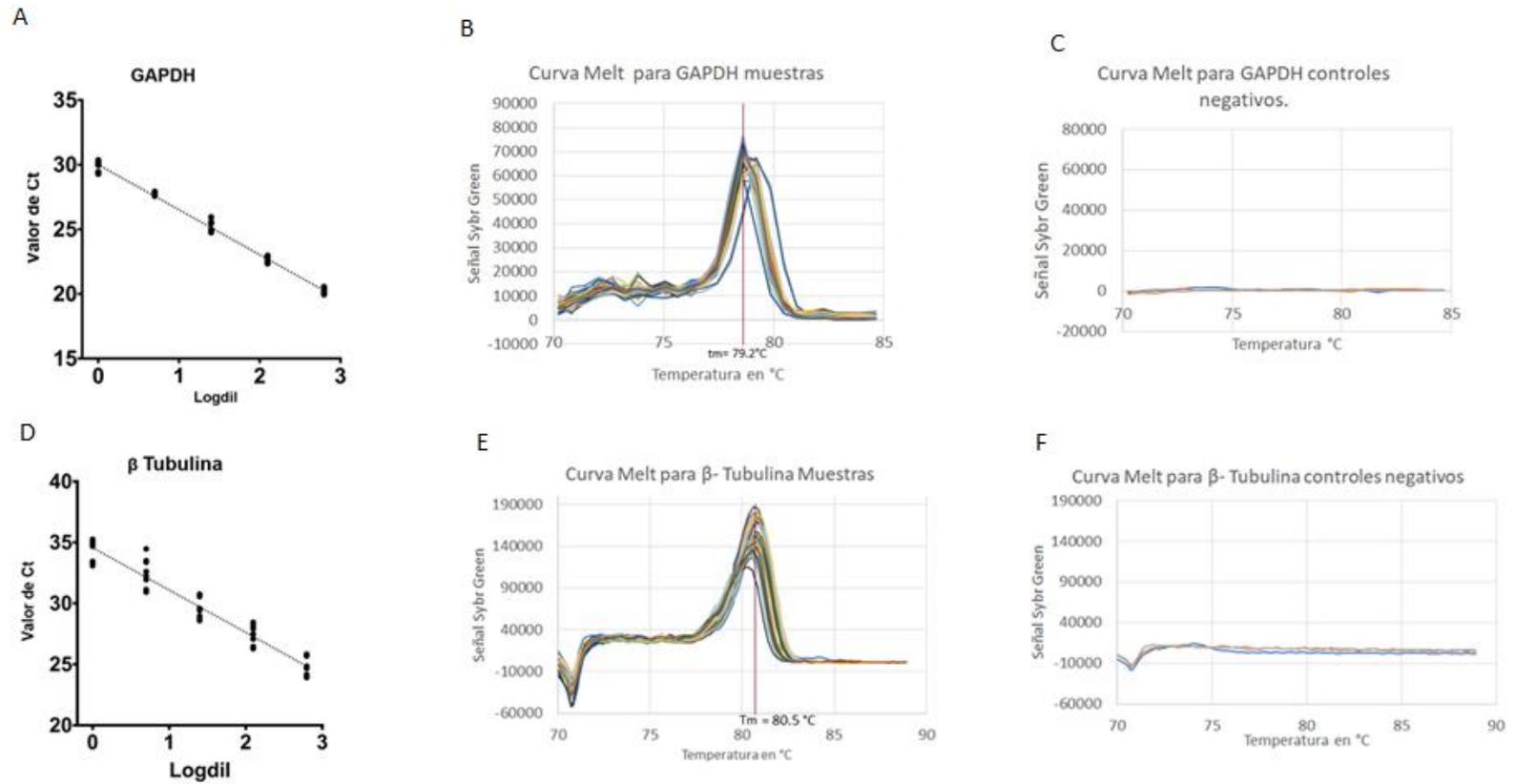


Figura 31. Resultados generales de validación de los genes estándar GAPDH y β -tubulina

A, Curva global de validación para el gen GAPDH. **B**, Curva melt para las muestras del GAPDH. **C**, Curva melt para el control negativo del gen GAPDH. **D**, Curva global de validación para el gen β -tubulina. **E**, Curva melt para las muestras del β -tubulina. **F**, Curva melt para el control negativo del gen β -tubulina.

7.1.3 CNP

Para validar CNP se emplearon las muestras JME-002,3, JME-003,3 y JME-006,3. Los resultados obtenidos de la curva global fueron una pendiente de -3.572 ± 0.06889 , Un valor de r^2 de 0.9843 con una eficiencia de 90.5229818%. El valor p obtenido es menor a 0.0001 (Figura 32).

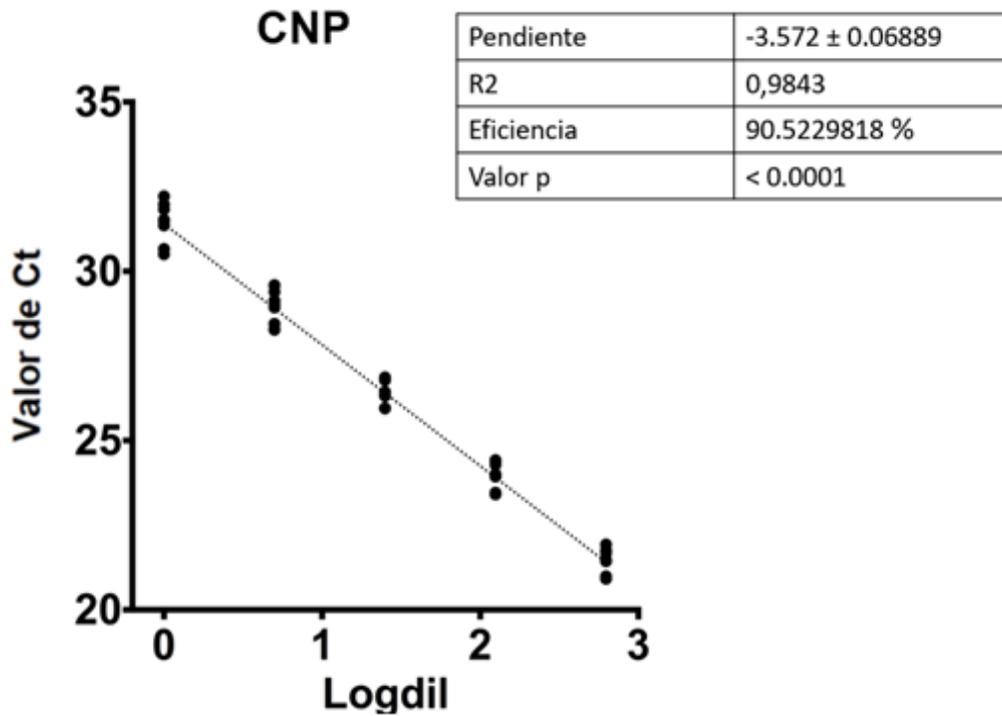
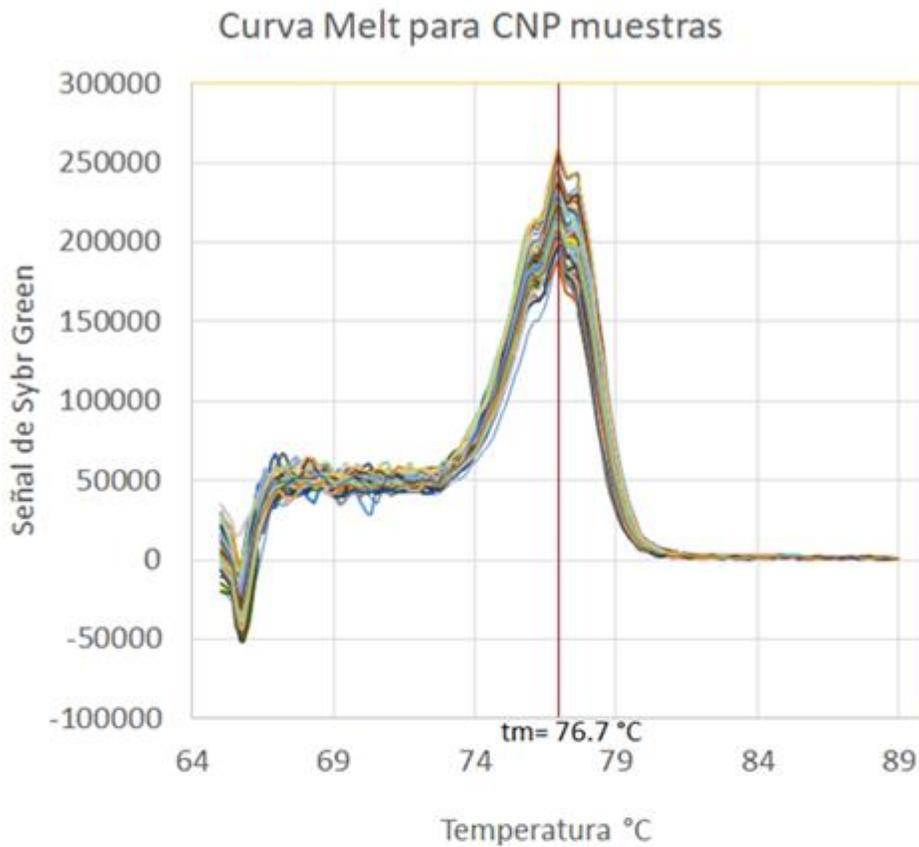


Figura 32. Curva de validación global para CNP.

A



B

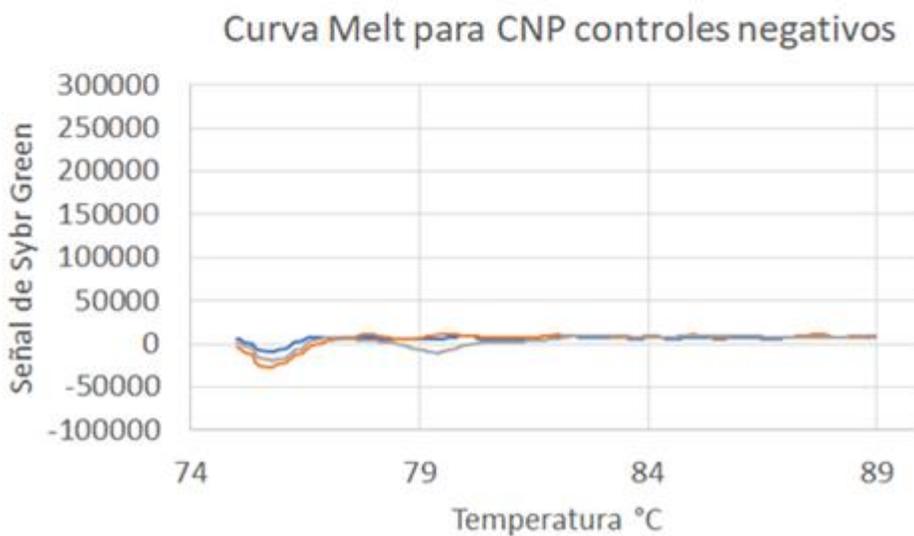


Figura 33. Curva Melt para el gen CNP.

A) Curva Melt para las muestras empleadas en la validación de CNP. B) Curva Melt para los tres controles negativos empleadas en la validación de CNP. Rango de temperatura empleado: 75°C – 90°C.

Para la prueba de la curva melt durante la validación del gen CNP se observó un pico marcado a una temperatura de melting de 76.7°C. Los tres controles negativos que se emplearon en la validación no presentan ningún pico en todo el rango de temperatura evaluado (Figura 33).

7.1.4 MBP

La validación de MBP se realizó utilizando las muestras JME-002,1, JME-003,1 y JME-006,1, correspondientes al día uno de cultivo. Los resultados obtenidos de la curva global fueron una pendiente de -3.552 ± 0.1758 , Un valor de r^2 de 0.9047 con una eficiencia de 91.2122362%. El valor p obtenido es menor a 0.0001 como se aprecia en la Figura 34.

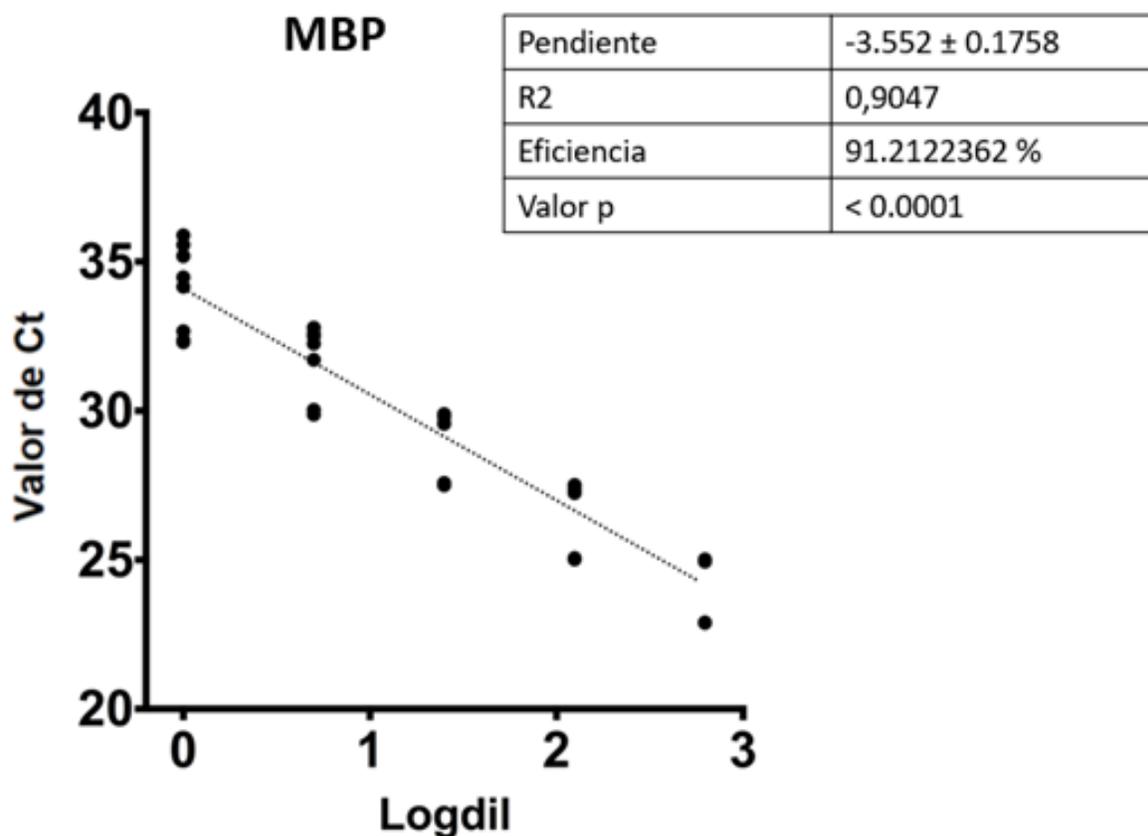
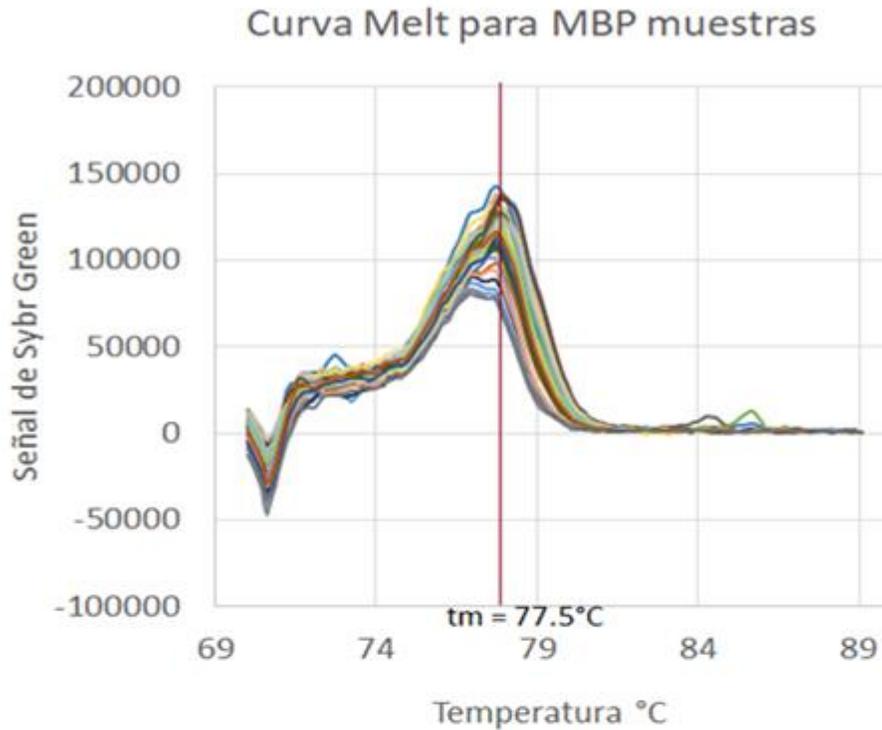


Figura 34. Curva de validación global para MBP.

A



B

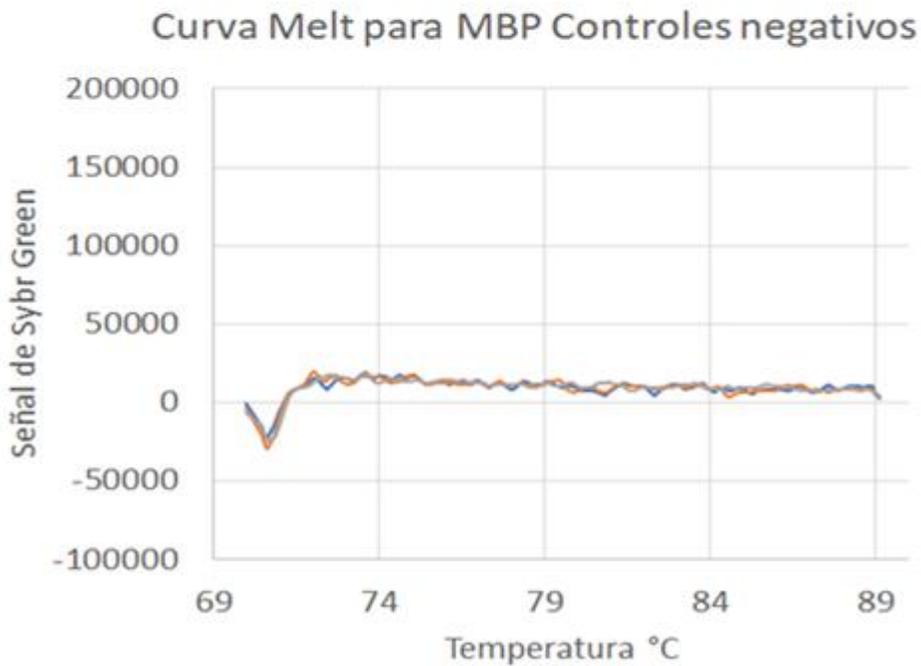


Figura 35. Curva Melt para el gen MBP.

A) Curva melt para las muestras empleadas en la validación de MBP. B) Curva melt para los tres controles negativos empleadas en la validación de MBP. Rango de temperatura empleado: 70°C – 90°C.

La curva melt obtenida durante la validación del gen MBP muestra un único pico no tan prominente, que corresponde a una temperatura de melting de 77.5°C congruente para todas las muestras. Para los tres controles negativos no presentan ningún pico o cambio de pendiente durante todo el rango de temperatura evaluado (figura 35).

7.1.5 PLP

En la validación de PLP se emplearon las muestras JME-002,6, JME-003,6 y JME-006,6, correspondientes al día tres de cultivo.

Como se observa en la Figura 36 y después de analizar los resultados, se obtuvo una pendiente de -3.436 ± 0.07240 , un valor de r^2 de 0.9813 y una eficiencia del 95.4578106%. El valor P es menor a 0.0001.

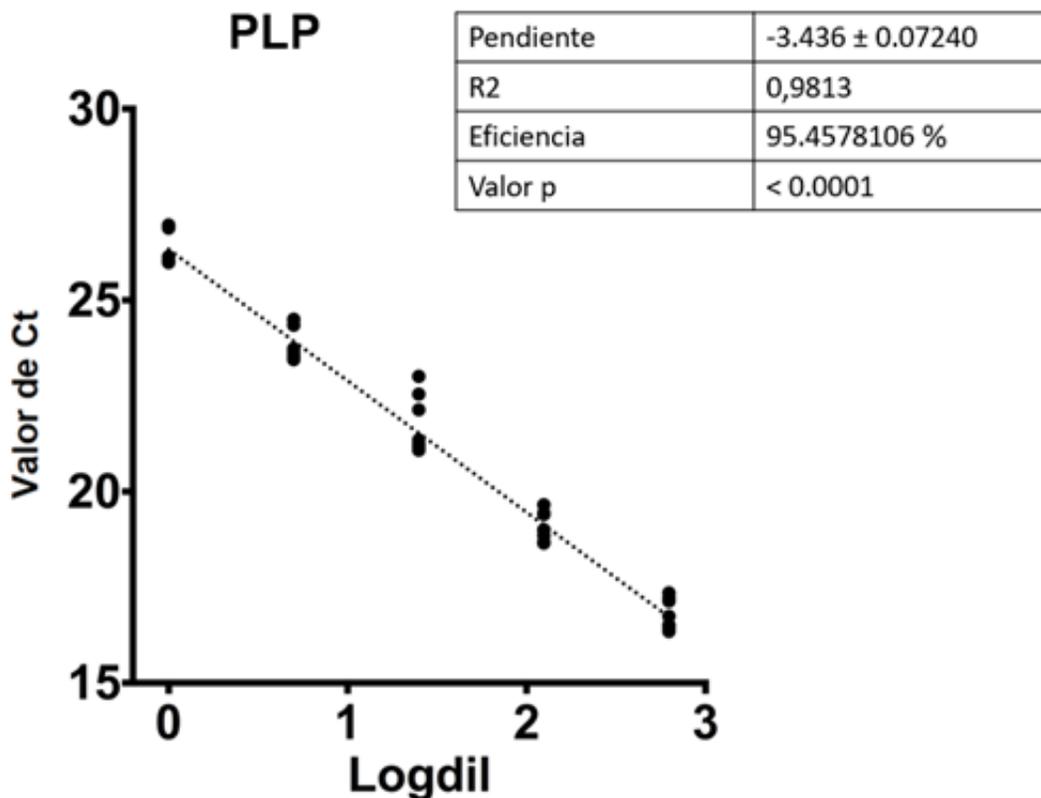
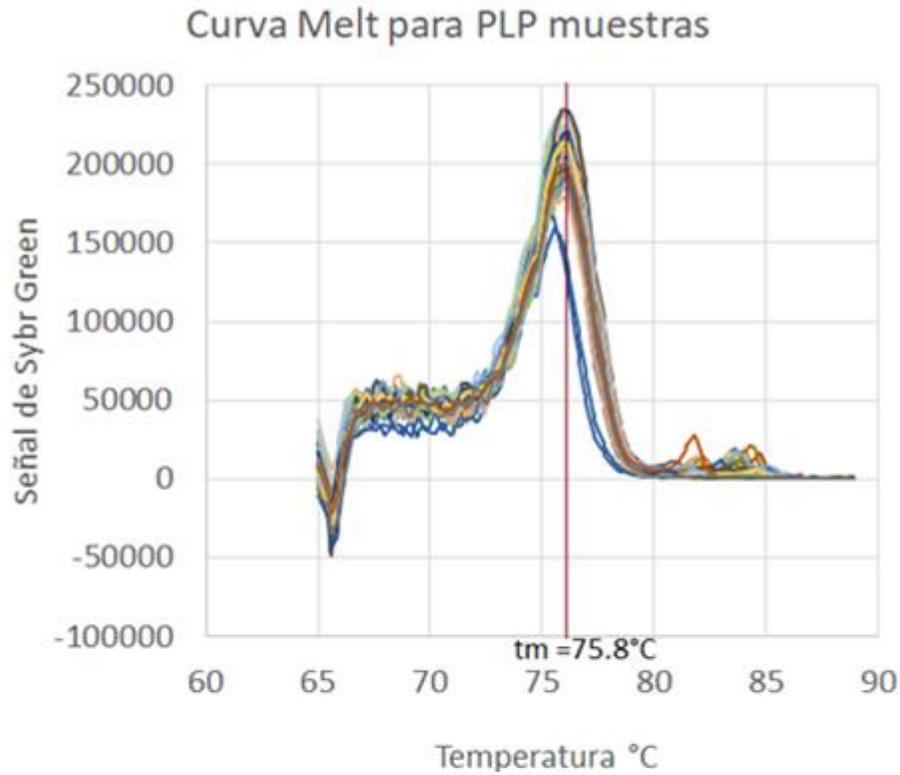


Figura 36. Curva de validación global para PLP.

A



B

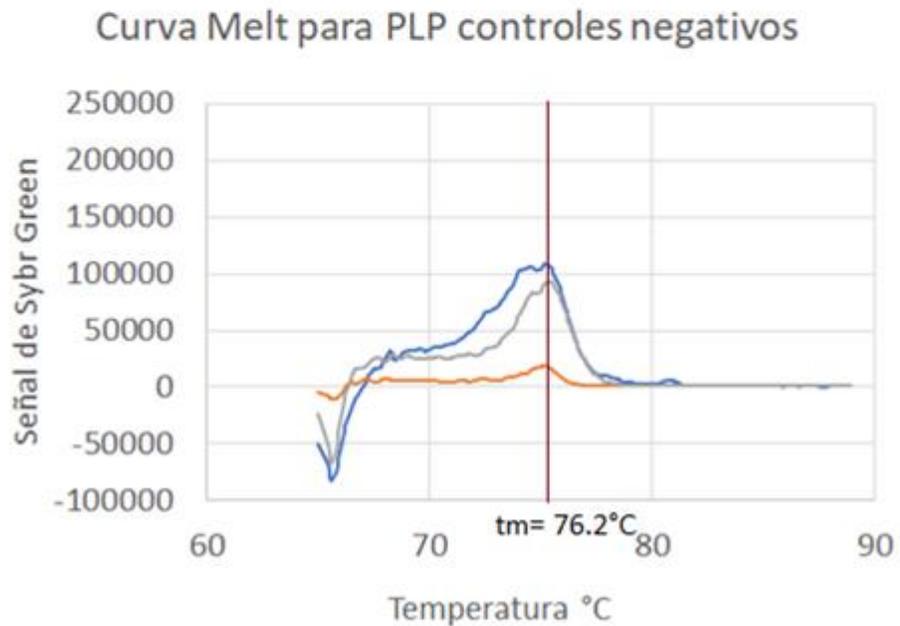


Figura 37. Curva Melt para el gen PLP.

A) Curva melt para las muestras empleadas en la validación de PLP. B) Curva melt para los tres controles negativos empleadas en la validación de PLP. Rango de temperatura empleado: 70°C – 90°C.

Los resultados de la curva melt realizada para el gen PLP mostraron un pico prominente correspondiente a una T_m de 75.8°C en la mayoría de las muestras. Hay un par de picos de menor tamaño entre los 80 y 85°C. Los tres controles negativos presentaron diversos picos de menor tamaño que las muestras, cercanos a los 75°C (Figura 37).

7.1.6 MOG

Para la validación de MOG se utilizaron las muestras JME-002,6, JME-003,6 y JME-006,6, correspondientes al día tres de cultivo. Después de analizar los resultados de la curva global, se obtuvo una pendiente de -3.552 ± 0.1758 , Un valor de r^2 de 0.9047 con una eficiencia del 91.2122362%. El valor p obtenido es menor a 0.0001 como se aprecia en la Figura 38.

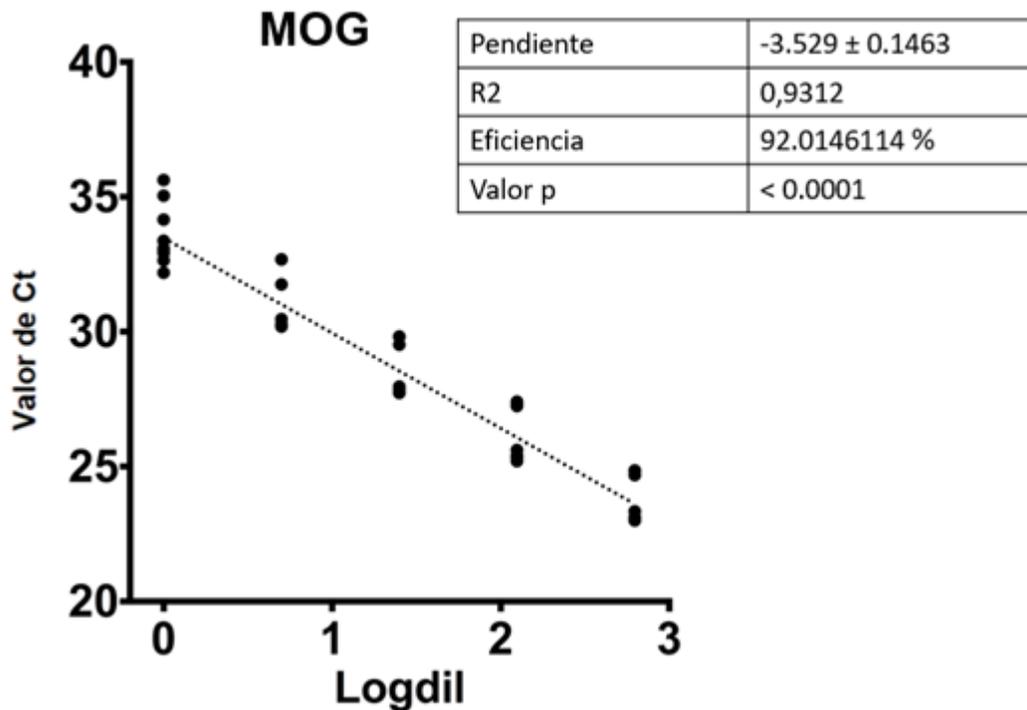
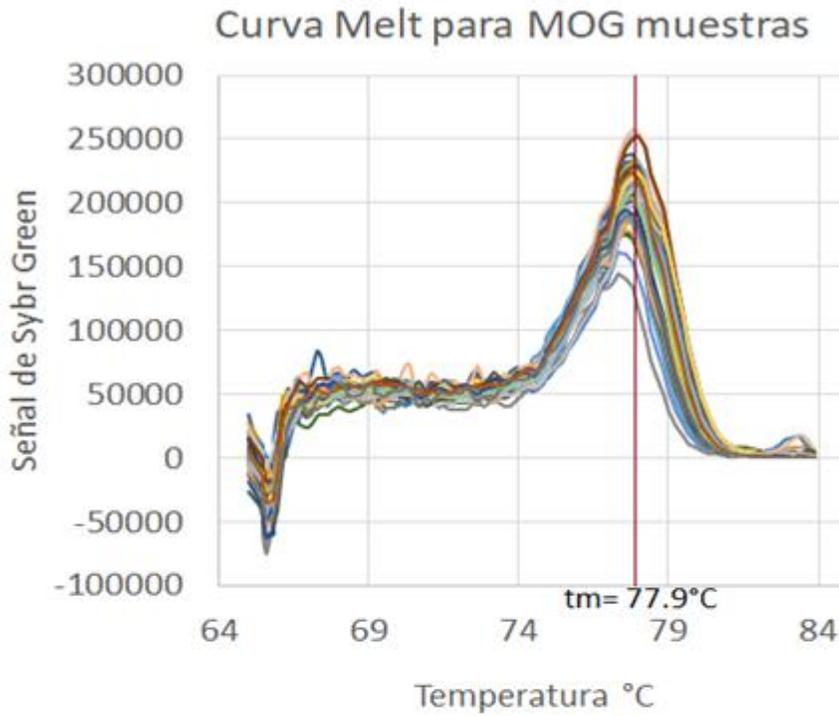


Figura 38. Curva de validación global para MOG.

A



B

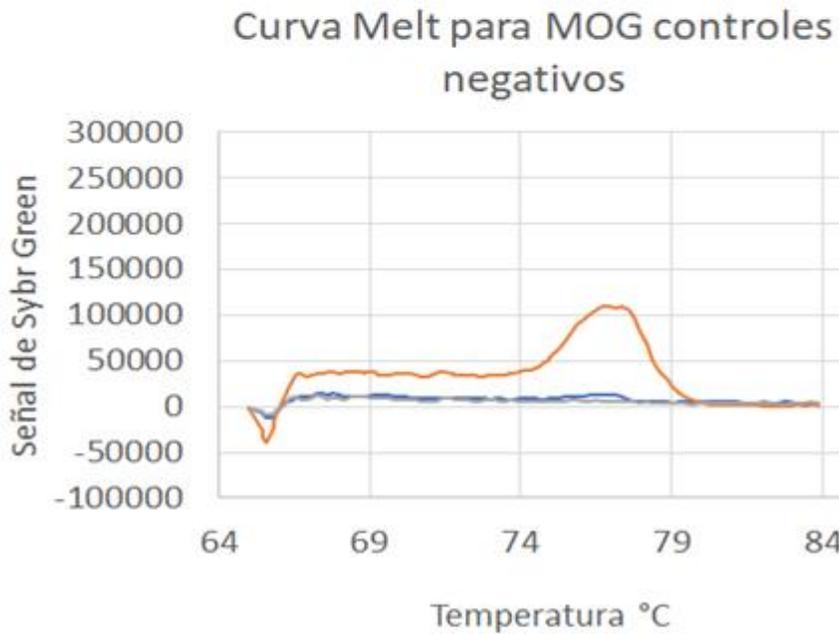


Figura 39. Curva Melt para el gen MOG.

A) Curva Melt para las muestras empleadas en la validación de MOG. B) Curva Melt para los tres controles negativos empleadas en la validación de MOG. Rango de temperatura empleado: 70°C – 90°C.

La curva melt realizada para el gen MOG durante la validación, mostró un solo pico correspondiente a una T_m de 77.9°C para todas las muestras. De los tres controles negativos, sólo uno presentó un pico de menor tamaño que las muestras en un rango cercano a los 77°C, los demás controles negativos no presentaron ningún cambio de pendiente (Figura 39).

7.1.7 p57kip2

En la validación de p57kip2 se emplearon las muestras JME-002,5, JME-006,5 y JME-008,5, correspondientes al día seis de cultivo. Después de analizar los resultados de la curva global, se obtuvo una pendiente de -3.552 ± 0.1758 . Un valor de r^2 de 0.9047 con una eficiencia del 91.2122362%. El valor p obtenido fue menor a 0.0001, como se aprecia en la Figura 40.

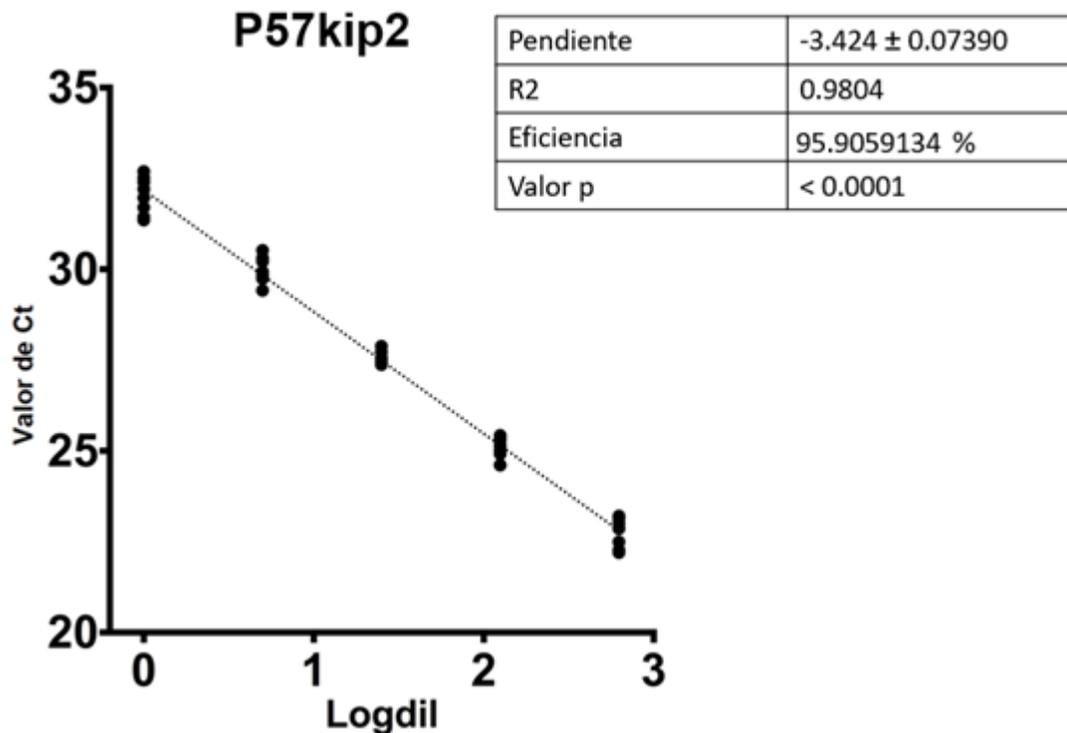
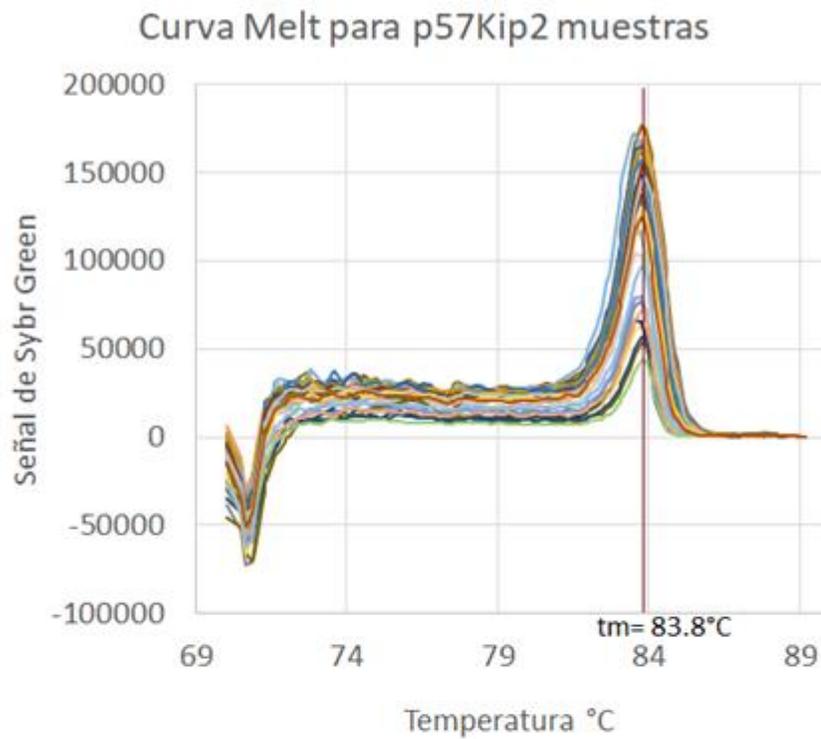


Figura 40. Curva de validación global para p57kip2.

A



B

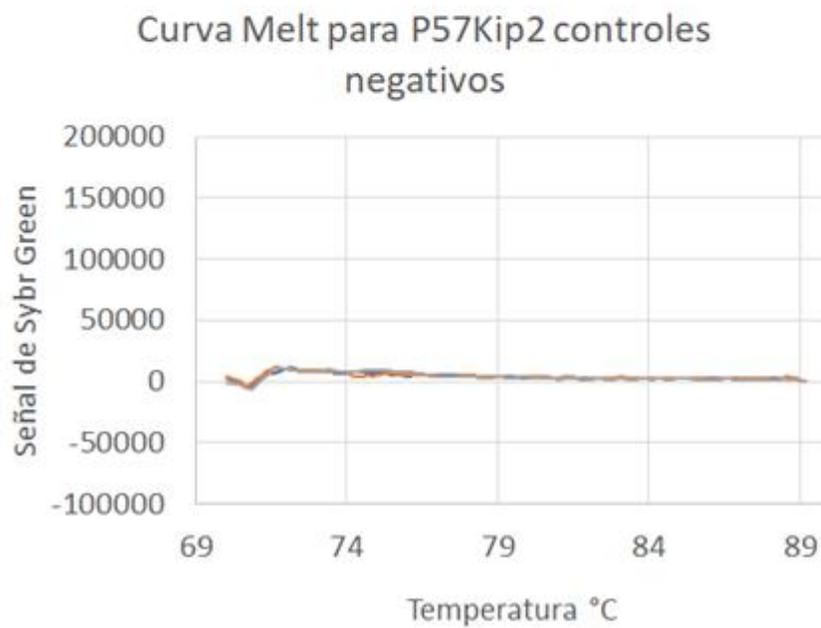


Figura 41. Curva Melt para el gen p57kip2.

A) Curva Melt para las muestras empleadas en la validación de p57Kip2. B) Curva Melt para los tres controles negativos empleadas en la validación de p57Kip2. Rango de temperatura empleado: 70°C – 90°C.

Los resultados de la curva melt realizada en la validación del gen p57kip2 mostraron un único pico que corresponde a una T_m de 83.8°C congruente para todas las muestras. Los controles negativos no presentaron ningún cambio dependiente en todo el rango de temperatura que evaluó (Figura 44).

7.1.8. ID2

Para la validación del gen ID2 se utilizaron las muestras JME-002,6, JME-003,6 y JME-006,6. La pendiente que se obtuvo es de -3.424 ± 0.07390 correspondiente a una eficiencia del 95.90%, un valor de r^2 de 0.9804. El valor p obtenido fue menor a 0.0001, como se muestra en la Figura 42.

En todos los casos los controles negativos mostraron un producto de amplificación considerable, el cual presentó su propio pico en la curva melt.

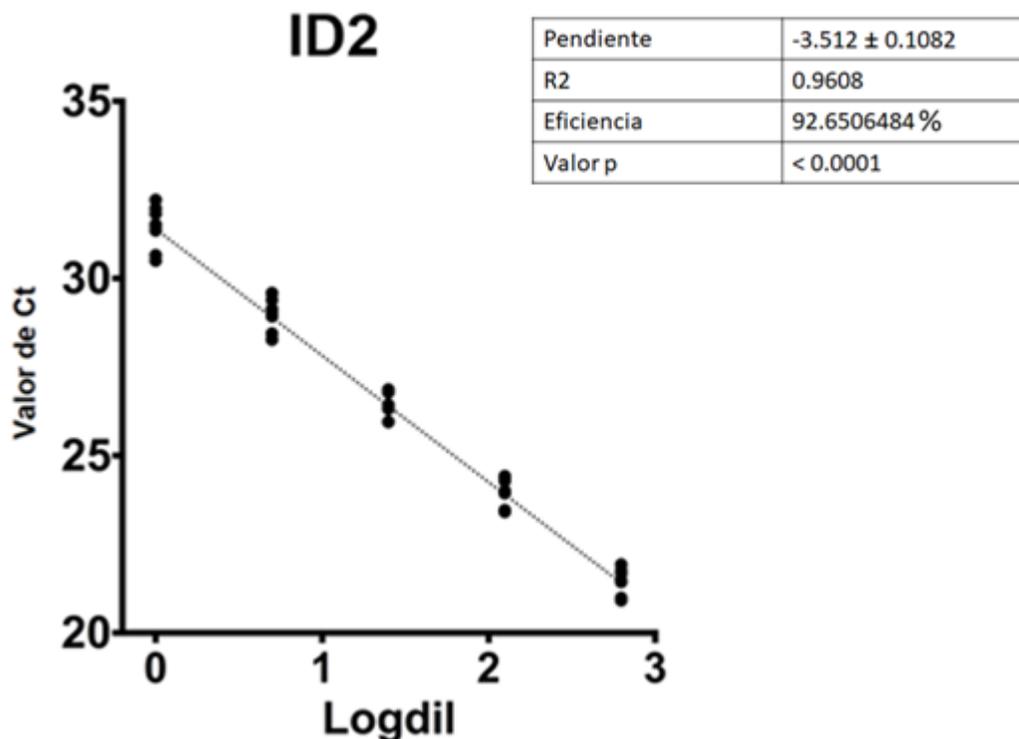
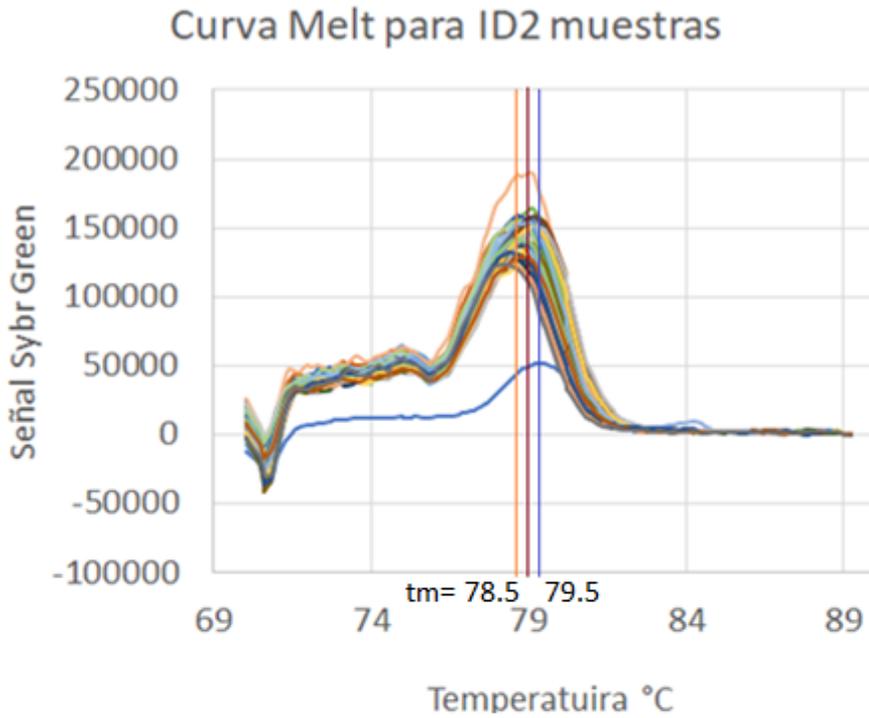


Figura 42. Curva de validación global para ID2.

A



B

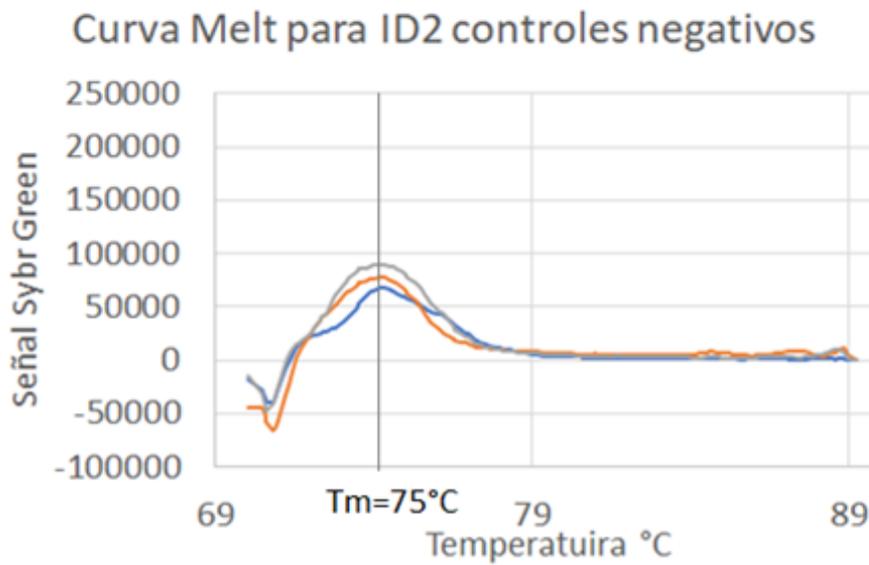


Figura 43. Curva Melt para el gen ID2.

- A) Curva Melt para las muestras empleadas en la validación de ID2. B) Curva Melt para los tres controles negativos empleadas en la validación de ID2. Rango de temperatura empleado: 70°C – 90°C.

La curva melt obtenida durante la validación del gen ID2 mostró tres picos ligeramente separados entre sí entre un rango de temperaturas de 78.5 a 79.5°C. Los tres controles negativos presentaron un pico significativo a una temperatura de 75°C (Figura 43)

7.1.9 ID4

En el proceso de validación para el gen ID4 se emplearon las muestras muestras JME-002,6, JME-003,6 y JME-006,6, y posteriormente la muestra JME-002,2 correspondiente al día uno. En todos los casos se observó una amplificación de los controles negativos en la zona de amplificación de las muestras, por lo que todas las muestras amplificaron en rangos de Cq muy similares, esto produjo que la pendiente de la curva tienda a cero (Figura 44).

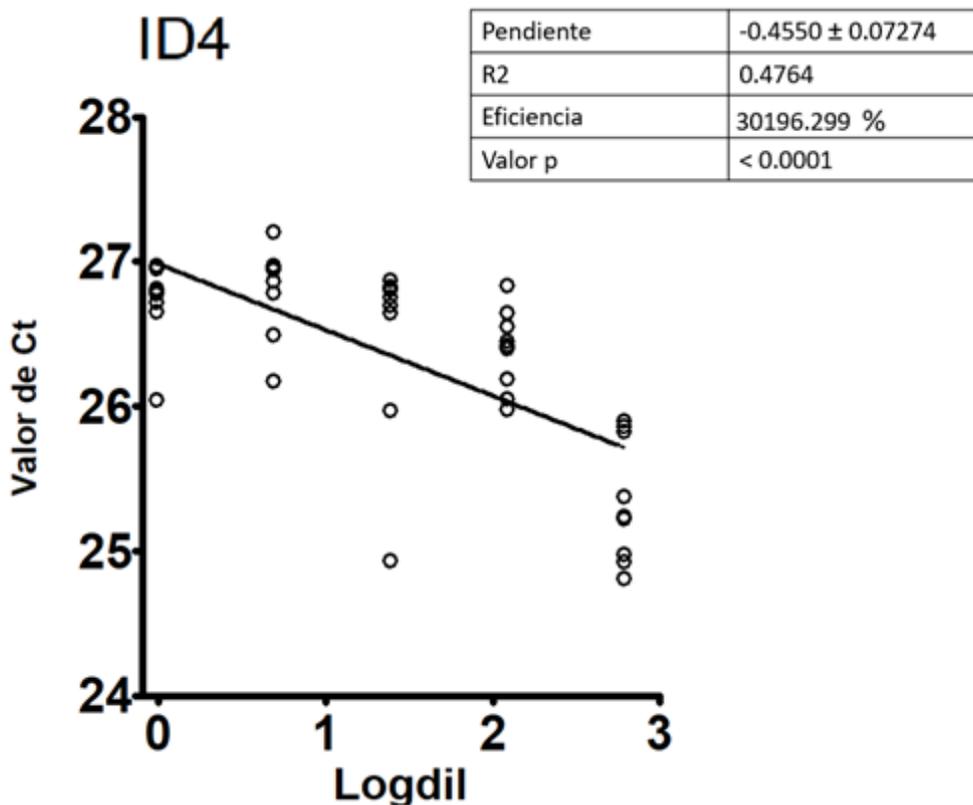
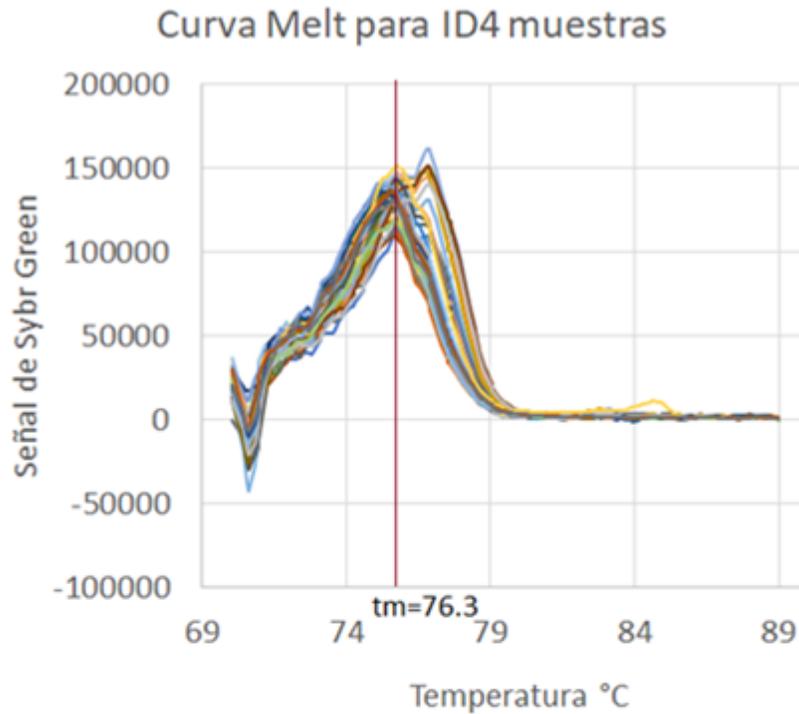


Figura 44. Curva de validación global para ID4.

A



B

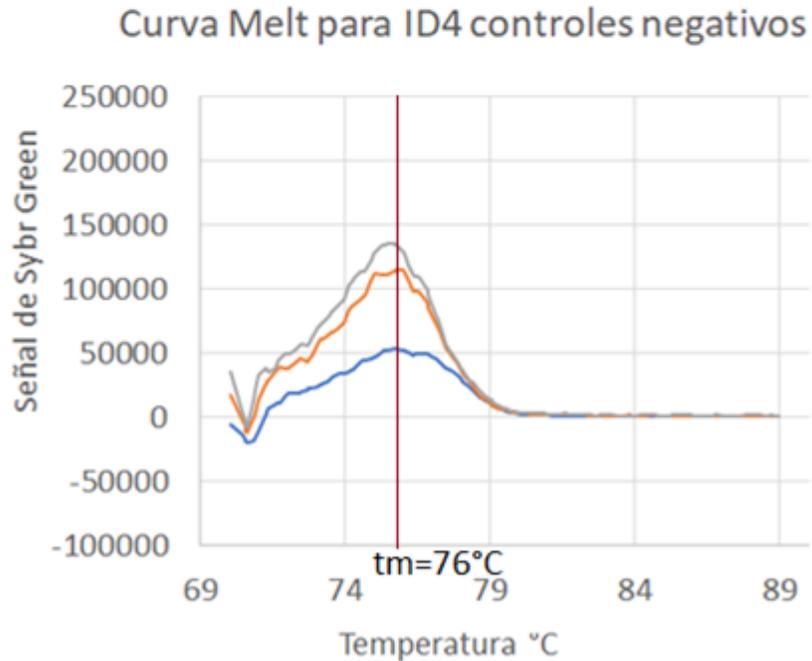


Figura 45. Curva Melt para el gen ID4.

A) Curva Melt para las muestras empleadas en la validación de ID4. B) Curva Melt para los tres controles negativos empleadas en la validación de ID4. Rango de temperatura empleado: 70°C – 90°C.

La prueba melt para el gen ID4 mostró tanto en las muestras como en los controles un pico prominente que corresponde a una Tm de 76°C a 76.3°C (Figura 45).

7.1.10 Hes 1

Durante la validación del gen Hes 1 se utilizaron las muestras JME-002,2, JME-006,2 y JME-003,2, correspondientes al día uno de cultivo. Posteriormente, se utilizaron las muestras JME-002,7, JME-004,7 y JME-008,7, correspondientes al día nueve de cultivo y por último, se utilizaron las muestras JME-002,5, JME-006,5 y JME-008,5 correspondientes al día seis de cultivo. En todos los casos, las diluciones menos concentradas no mostraron amplificación durante la reacción de PCR. Por lo que no se obtuvo una curva completa. En la Figura 46 se muestra la gráfica únicamente con los puntos que lograron mostrar amplificación en la PCR.

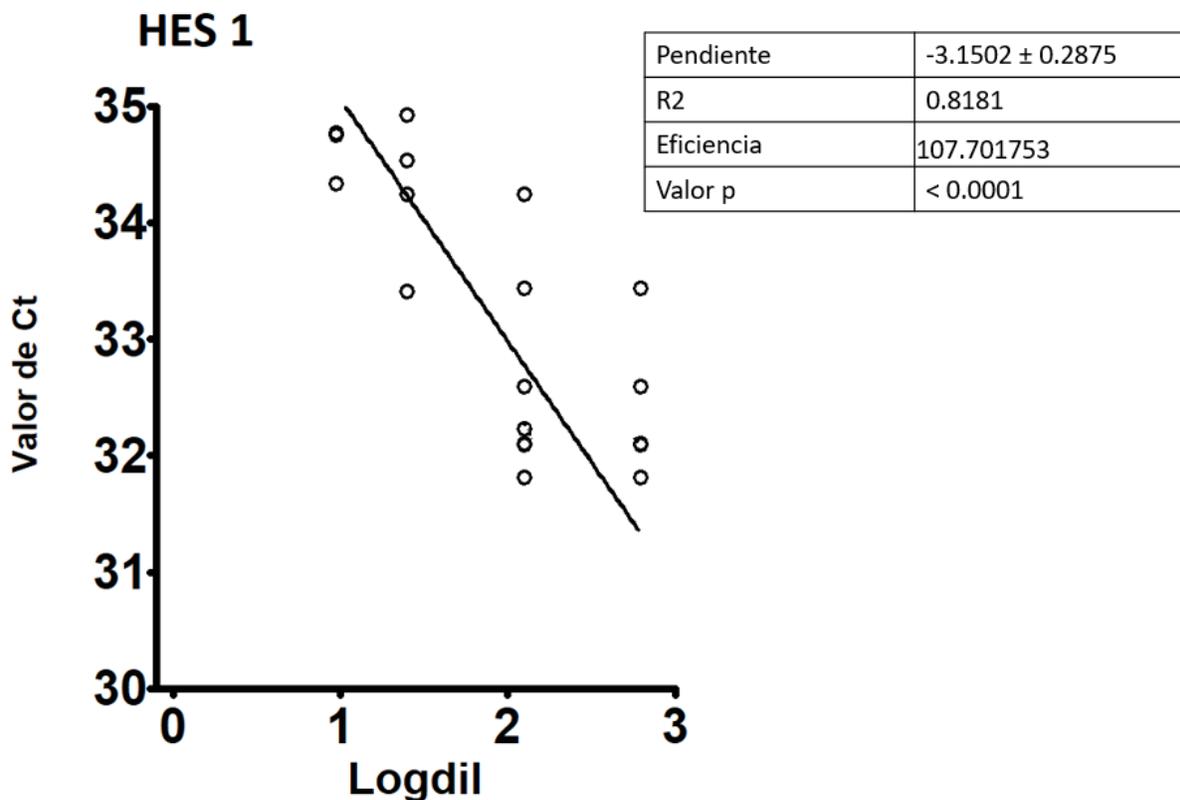
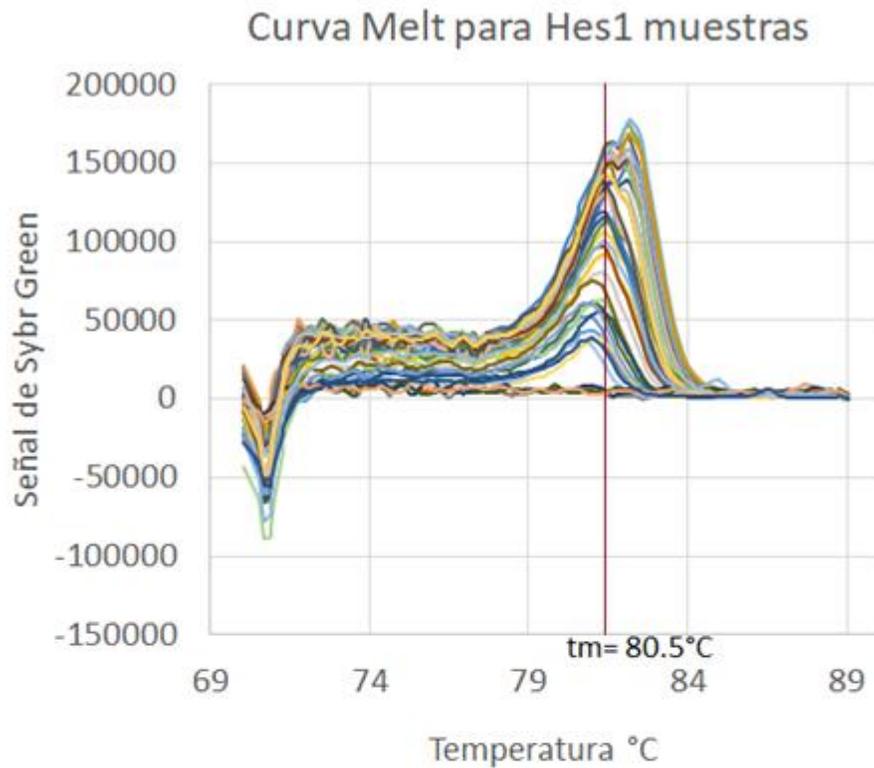


Figura 46. Curva de validación global para Hes1

A



B

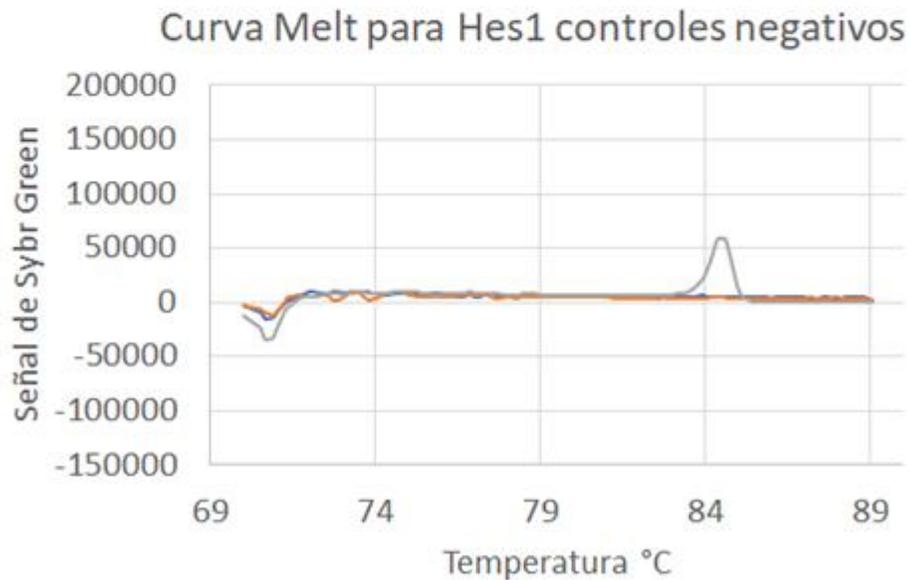


Figura 47. Curva Melt para el gen Hes 1.

A) Curva Melt para las muestras empleadas en la validación de Hes1. B) Curva Melt para los tres controles negativos empleadas en la validación de Hes1. Rango de temperatura empleado: 70°C – 90°C.

En la prueba melt, la curva mostró un único pico, correspondiente a una temperatura de melting de 80.5°C para las muestras que lograron amplificar durante la reacción de qPCR. Las muestras del último punto de la curva, que son las más diluidas, no presentaron ningún pico durante la prueba Melt. Los controles negativos no mostraron un cambio de pendiente importante durante la prueba (Figura 47).

7.1.11 Hes 5

Para la validación del gen Hes 5 se utilizaron las muestras JME-004,2, JME-008,2 y JME-006,8, correspondientes al día uno y diez de cultivo. Después de analizar los resultados de la curva global, se obtuvo una pendiente de -3.526 ± 0.1286 , Un valor de r^2 de 0.9459 con una eficiencia del 92.13544. El valor p obtenido fue menor a 0.0001 (Figura 48).

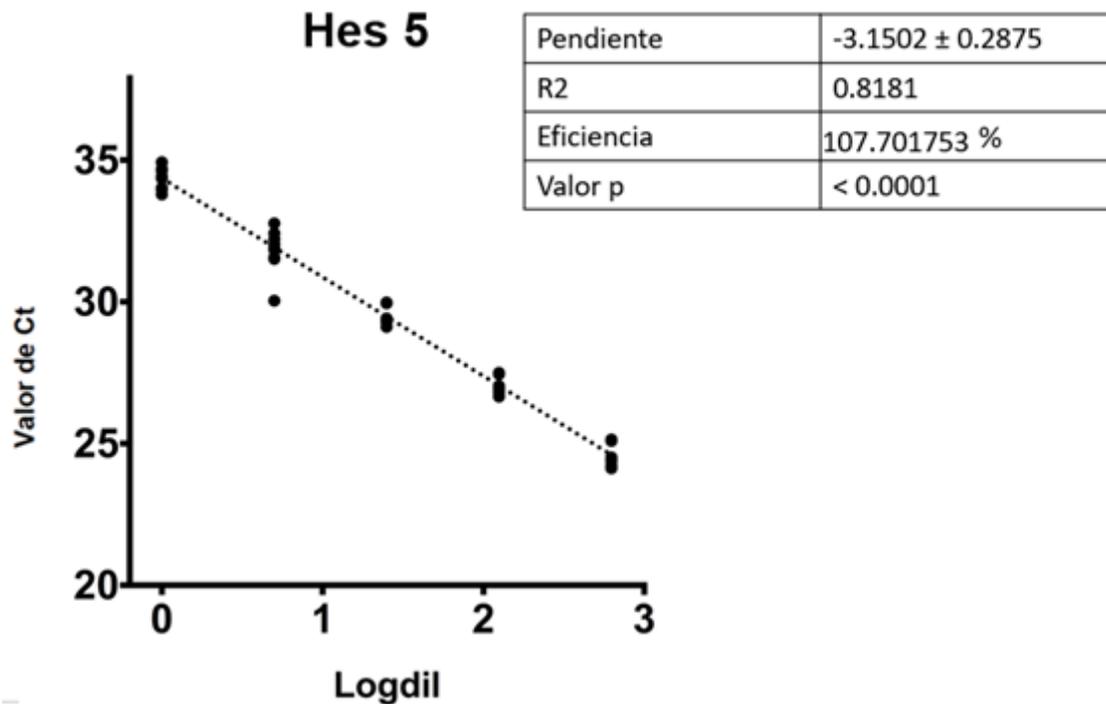
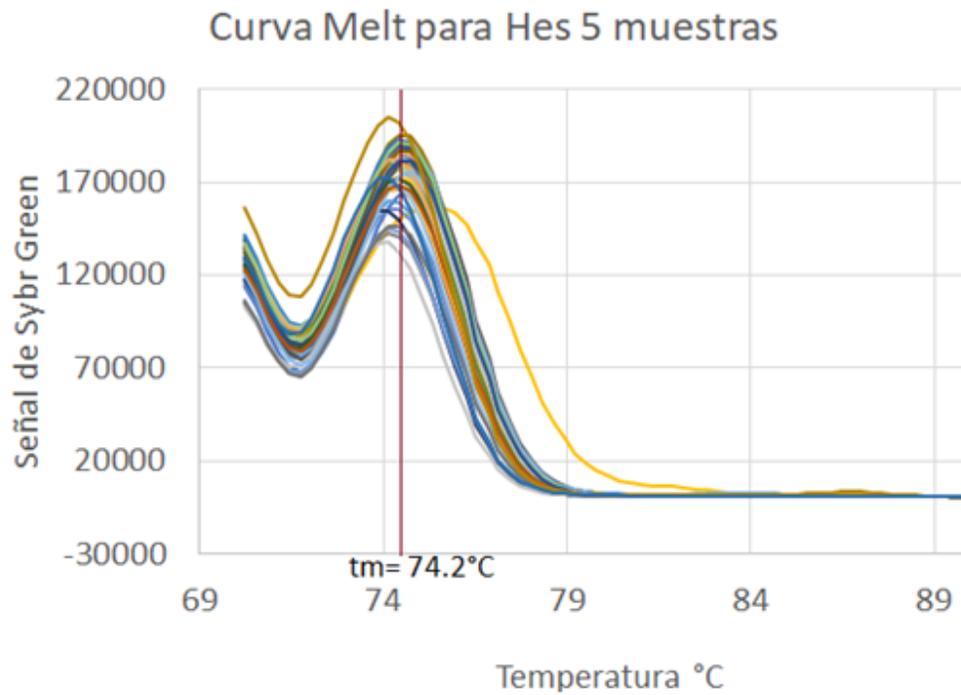


Figura 48. Curva de validación global para el gen Hes 5.

A



B

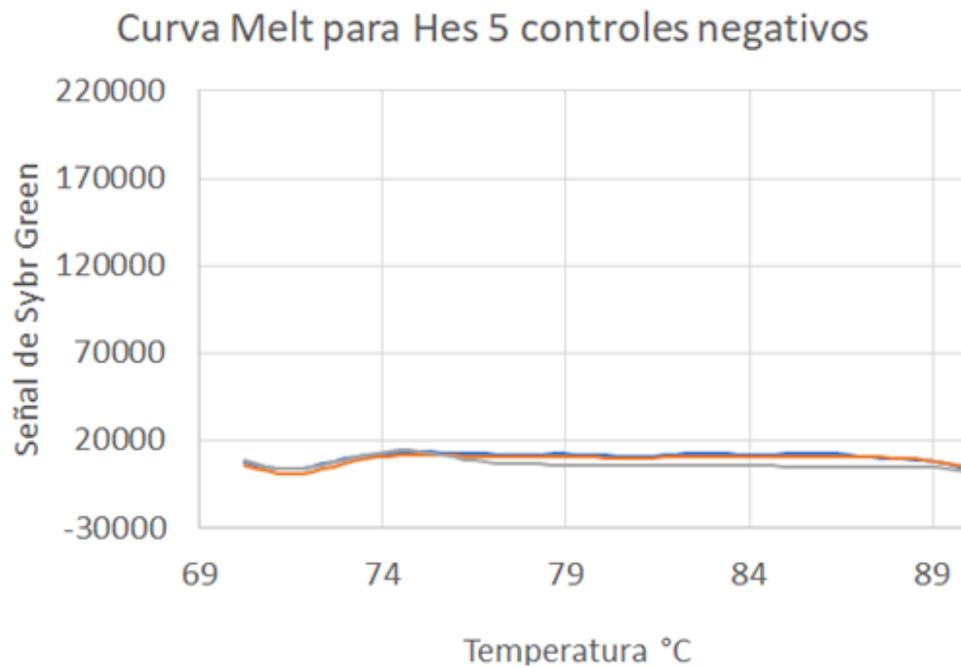


Figura 49. Curva Melt para el gen Hes5.

A) Curva Melt para las muestras empleadas en la validación de Hes5. B) Curva Melt para los tres controles negativos empleadas en la validación de Hes5. Rango de temperatura empleado: 70°C – 90°C

La curva melt para el gen Hes 5 mostró un pico definido, correspondiente a una temperature de melting de 74.2°C congruente para la mayoría de las muestras. Los controles negativos no mostraron ningún pico durante la prueba (Figura 49).

7.1.12 Rock 2

El gen Rock 2 se validó empleando las muestras JME-004,2, JME-008,2 y JME-006,8, correspondientes al día uno y diez de cultivo. Después de analizar los resultados de la curva global, la pendiente obtenida fue de -3.526 ± 0.1286 , un valor de r^2 de 0.9459 con una eficiencia de 92.13544. El valor p fue menor a 0.0001 (Figura 50). En la Figura 51 se muestran los resultados de la prueba Melt para el gen Rock 2.

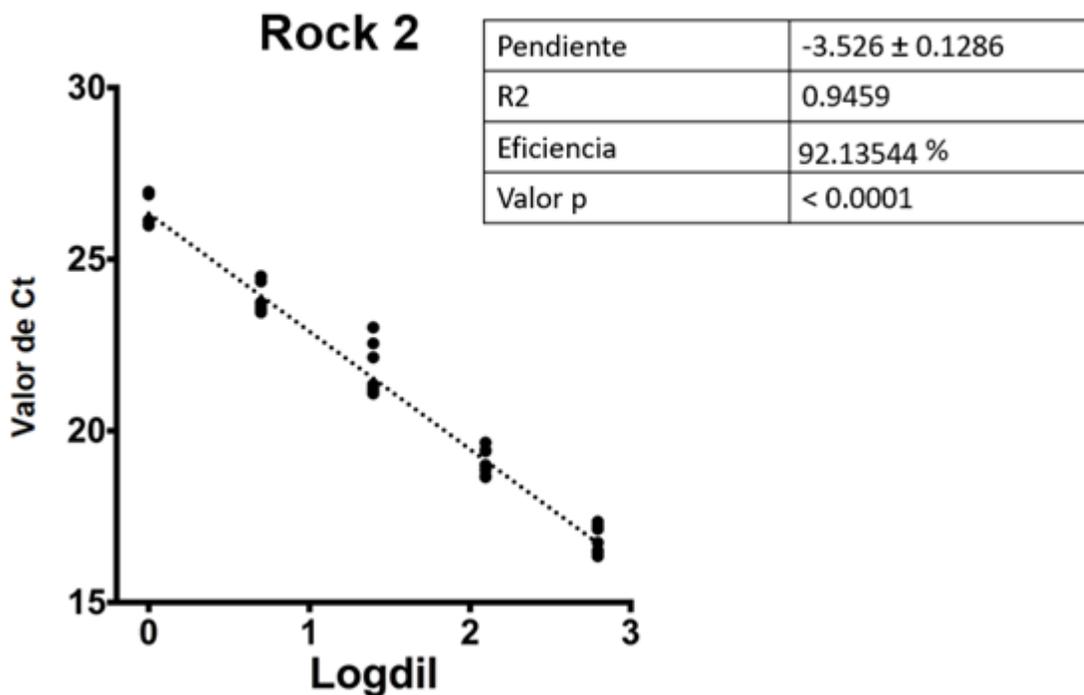
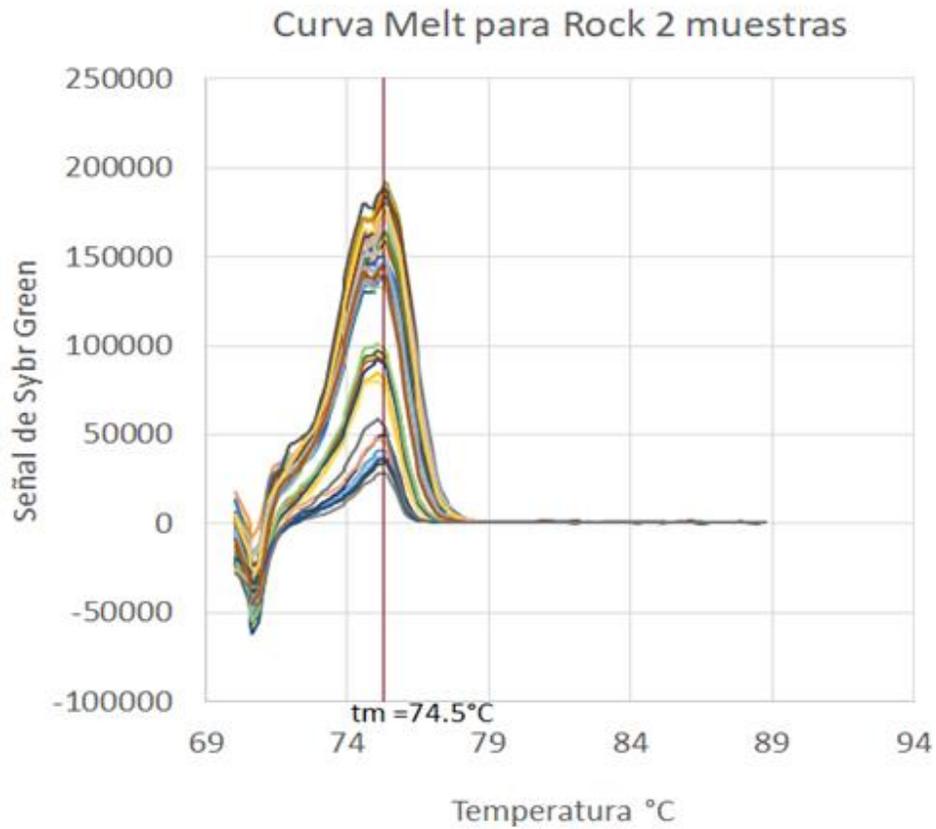


Figura 50. Curva de Validación global para Rock 2.

A



B

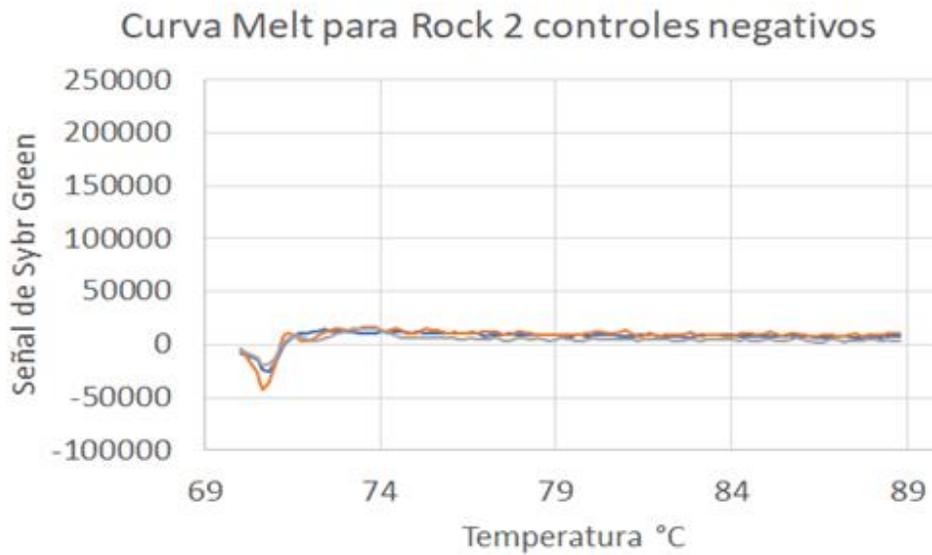


Figura 51. Curva Melt para el gen Rock 2.

A) Curva Melt para las muestras empleadas en la validación de Rock2. B) Curva Melt para los tres controles negativos empleadas en la validación de Rock2. Rango de temperatura empleado: 70°C – 90°C.

7.2 Resultados generales obtenidos de las curvas globales de validación

Los resultados generales de la validación para todos los genes evaluados se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11. Resultados obtenidos de las curvas globales de validación para los genes de mielina y reguladores negativos.

Gene	Pendiente	R ²	Eficiencia (%)	Valor p	Tm del amplicón (°C)
<i>gapdh</i>	-3.481 ± 0.04641	0.9924	93.76430365	< 0.0001	79.23
<i>beta-tubulina</i>	-3.476 ± 0.1353	0.9389	93.9376682	< 0.0001	80.53
<i>cnpasa</i>	-3.572 ± 0.06889	0,9843	90.5229818	< 0.0001	76.74
<i>mbp</i>	-3.552 ± 0.1758	0,9047	91.2122362	< 0.0001	77.59
<i>mog</i>	-3.529 ± 0.1463	0,9312	92.0146114	< 0.0001	77.97
<i>plp</i>	-3.436 ± 0.07240	0,9813	95.4578106	< 0.0001	75.82
<i>hes1</i>	-3.1502 ± 0.2875	0.8181	107.701753	< 0.0001	80.50
<i>hes5</i>	-3.490 ± 0.07074	0.9826	93.42674877	< 0.0001	75.00
<i>Rock2</i>	-3.526 ± 0.1286	0.9459	92.13544353	< 0.0001	74.52
<i>p57kip2</i>	-3.424 ± 0.07390	0.9804	95.9059134	< 0.0001	83.88
<i>id2</i>	-3.512 ± 0.1082	0.9608	92.6506484	< 0.0001	79.00
<i>id4</i>	-0.4550 ± 0.07274	0.4764	30196.299	< 0.0001	76.30

7.3 Análisis de los productos de qPCR obtenidos durante la validación mediante electroforesis en gel de agarosa.

Se realizó una búsqueda en BLAST para cada par de cebadores de cada gen. Esto para confirmar la especificidad y del sitio de unión de cada cebador con el gen de interés. Posteriormente, se realizó el cálculo teórico del tamaño del amplicón para cada reacción, como se resume en la Tabla 12. Con base a lo obtenido en BLAST, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 2% de los productos de amplificación obtenidos mediante qPCR. Los resultados se muestran en la Figura 52.

Tabla 12. Secuencia de primers y tamaño de amplicón utilizados para la validación de genes de mielina y reguladores negativos.

Gene	Forward	Reverse	Tamaño de amplicón (pb)
gapdh	GAA CGG GAA GCT CAC TGG C	GCA TGT CAG ATC CAC AAC GG	71
beta-tubulina	CAA CTA TGT GGG GGA CTC GG	TGG CTC TGG GCA CAT ACT TG	90
cnpasa	ATG CTG AGC TTG GCG AAG AA	GTA CCC CGT GAA GAT GGC C	52
mbp	CAA TGG ACC CGA CAG GAA AC	TGG CAT CTC CAG CGT GTT C	52
mog	CAG TTG TCA CGC AGC TAC GC	ATG CCC TGG CCC TAT CAC TC	52
plp	CTT TGG AGC GGG TGT GTC AT	TGT CGG GAT GTC CTA GCC AT	52
p57kip2	CAG GAC GAG AAT CAG GAG CTG A	TTG GCG AAG TCG TTC G	65
id2	AGA ACC AAA CGT CCA GGA CG	TGC TGA TGT CCG TGT TCA GG	52
id4	AAA GTG GAG ATC CTG CAG CAC	CAG CTG CAG GTC CAG GAT GT	52
hes1	GGA GAG GCT GCC AAG GTT TT	AAG CAA ATT GGC CGT CAG G	102
hes5	GGT TCC AGA GGC CAA ACA TC	GTT GCC ACA TTG ACC GTG AC	52
Rock2	GAT GGT TAC TAT GGA CGA GAA TGT GA	AGT GTC CCC TAC TAA CAT CTC AAA AAG	52

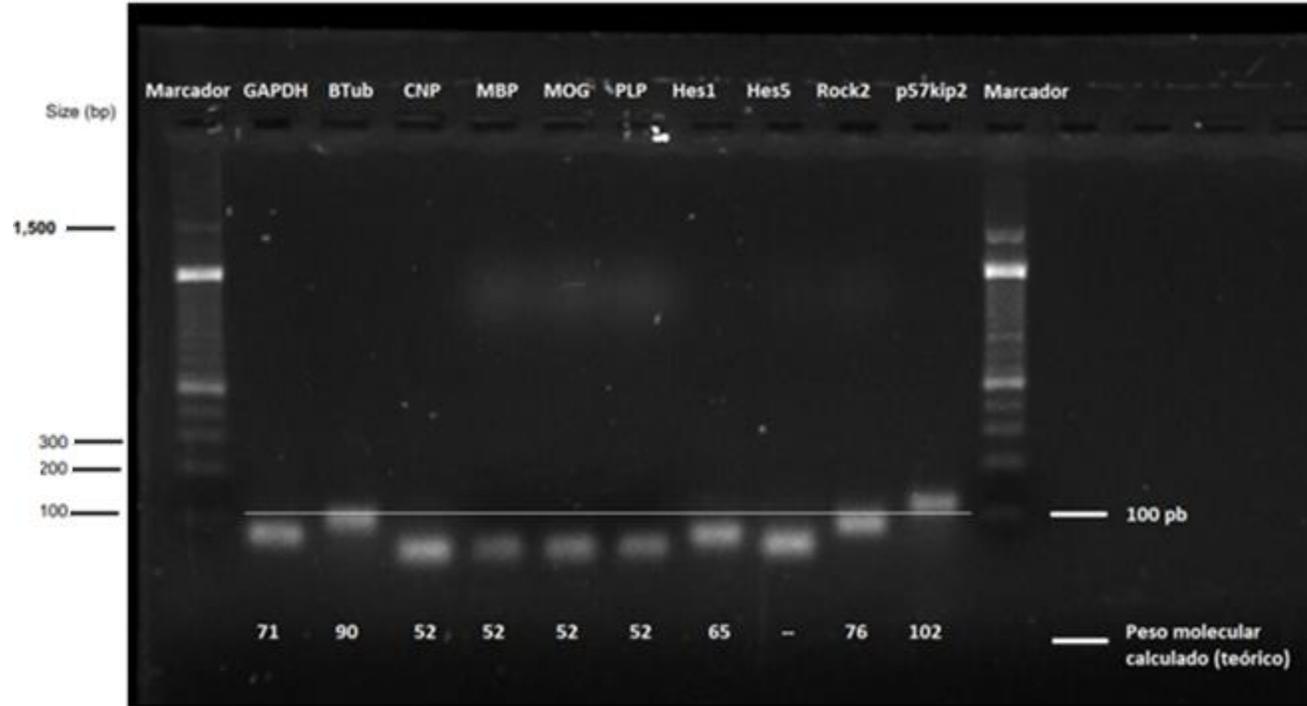


Figura 52. Análisis de los productos de amplificación por electroforesis en gel de agarosa.

Gel de agarosa al 2%. En el primer y doceavo pozo se cargó 2uL de marcador de peso molecular. Del segundo al onceavo pozo se cargaron 5uL de muestra. En la parte inferior del gel se apuntaron los pesos moleculares teóricos calculados para cada producto de PCR. Marcador de peso molecular: 100bp DNA Ladder de Invitrogen cat. 15628019.

7.3. Muestras infectadas con HHV6 y controles

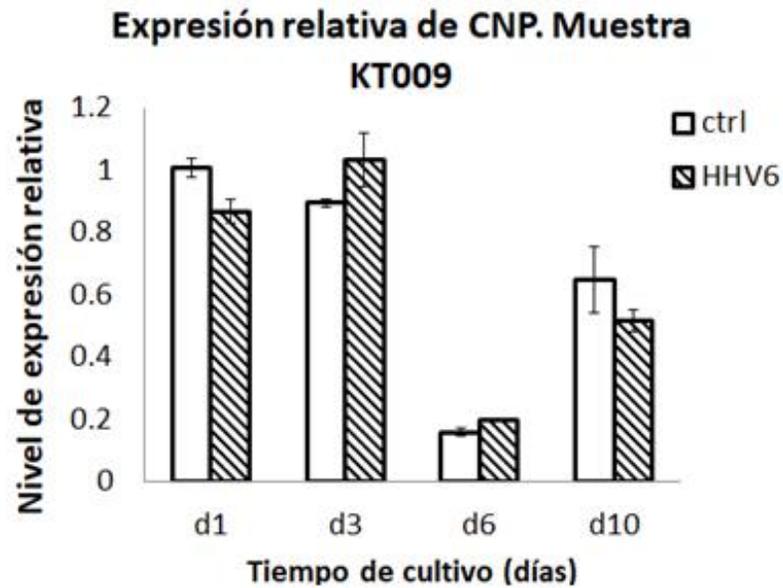
Los genes de mielina CNP y MBP se evaluaron mediante RT-qPCR previamente validados en las muestras KT009 y KT0011. Ambas muestras se obtuvieron a partir de dos cultivos de células oligodendrogiales: un cultivo control y un cultivo infectado con el virus HHV6_{AGS} mediante la exposición a células HSB-2 infectadas y no infectadas a través de una cámara de transwell de poro 0.4µm por 24 h. Para la muestra KT009 se extrajo RNA total de cada cultivo en los 1,3,6 y 10 días de cultivo. posteriores a la infección, y para la muestra KT0011 se realizó a los días 1,3 y 6. Posteriormente, se realizó una reacción de retrotranscripción para todas las muestras de RNA, obteniendo el cDNA correspondiente. Para realizar la reacción de RT-qPCR se empleó el gen gapdh como gen de referencia para el método de $\Delta\Delta Ct$. Los resultados de expresión relativa se resumen en la Tabla 13.

Tabla 13. Niveles de expresión relativa del gen CNP y MBP para las muestras KT009 y KT0011 obtenidos mediante el método de $\Delta\Delta Ct$.

Muestra KT009	Días de cultivo. Nivel de expresión relativa (método $\Delta\Delta Ct$.)			
CNP	d1	d3	d6	d10
ctrl	1.00639895	0.89466774	0.15852775	0.64545634
HHV6	0.86763384	1.03223454	0.19781732	0.51708715
Error estándar				
ctrl	0.0289546	0.0114049	0.01339759	0.1061304
HHV6	0.03609107	0.08558688	0.00574386	0.03496509
MBP				
ctrl	0.971589243	1.284047488	0.044194475	0.29634942
HHV6	0.676807085	1.524125224	0.0857453	0.308753843
Error estándar				
ctrl	0.044406242	0.010844371	0.003285225	0.049089393
HHV6	0.016994373	0.128275203	0.002232882	0.025206868
Muestra KT0011	Días de cultivo			
CNP	d1	d3	d6	
ctrl	0.92808297	0.90297995	0.42360466	
HHV6	0.84107541	0.87695057	0.21411674	
Error estándar				
ctrl	0.03294004	0.04046975	0.02365077	
HHV6	0.01050457	0.04551126	0.00547483	
MBP				
ctrl	0.91088664	1.6936	0.3826077	
HHV6	0.72851184	1.85511241	0.22353704	
Error estándar				
ctrl	0.09044073	0.14471254	0.04370817	
HHV6	0.01539203	0.16781542	0.01531883	

En la Figura 53 y 54 se muestran las gráficas de expresión relativa de cada gen para cada muestra donde se aprecia la expresión relativa de los cultivos control contra los cultivos infectados con HHV6 en un perfil temporal.

A



B

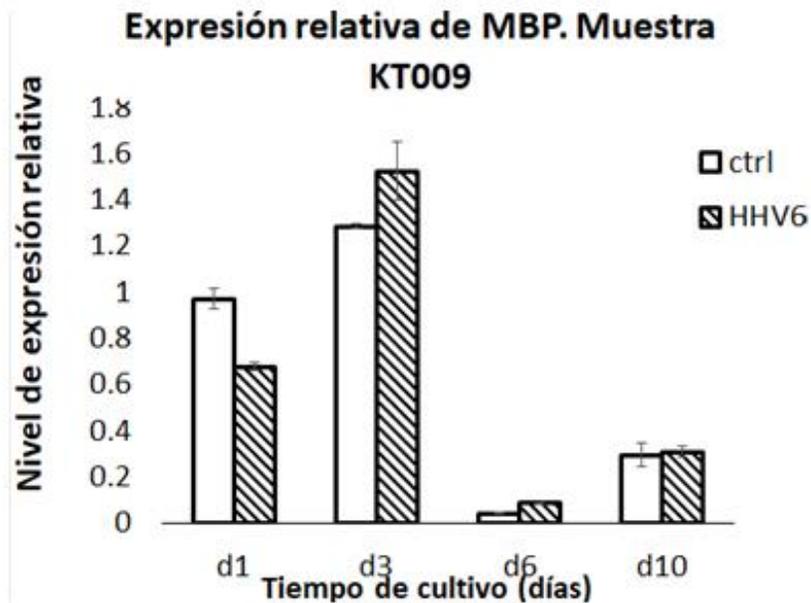
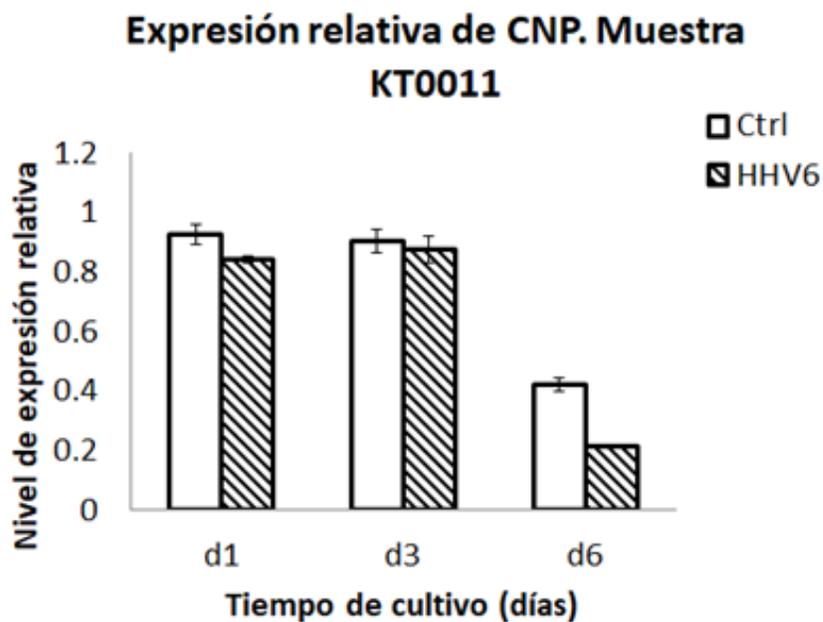


Figura 53. Expresión relativa de CNP y MBP en la muestra KT009.

A) Expresión relativa de CNP en la muestra KT009. B) Expresión relativa de MBP en la muestra KT009.

A



B

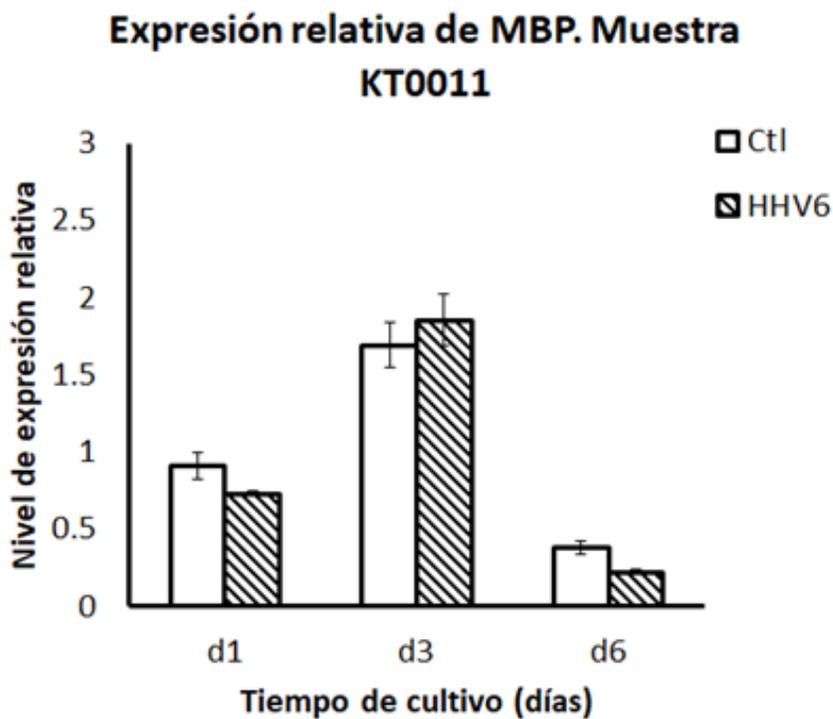


Figura 54. Expresión relativa de CNP y MBP en la muestra KT0011.

A) Expresión relativa de CNP en la muestra KT0011. B) Expresión relativa de MBP en la muestra KT0011.

7.3.1 Análisis estadístico. Prueba de *t* pareada

Se realizó la prueba estadística *t* pareada para evaluar la diferencia de expresión de los genes evaluados entre el cultivo control y el cultivo infectado con el virus HHV6 en las muestras KT009 y KT0011. Tablas 14 y 15.

Tabla 14. Prueba estadística *t* pareada para la muestra KT009

Muestra KT009	Días de cultivo			
CNP	d1	d3	d6	d10
ctrl-HHV6	0.13876511	-0.1375668	-0.03928957	0.12836919
Promedio	Error estándar	Valor t	Valor P	
0.022569483	0.067184555	0.335932603	0.759	
MBP				
ctrl-HHV6	0.294782158	-0.240077736	-0.041550825	-0.012404423
Promedio	Error estándar	Valor t	Valor P	
0.000187293	0.110458907	0.001695594	0.9988	

Tabla 15. Prueba estadística *t* pareada para la muestra KT0011

Muestra KT0011	Días de cultivo		
CNP	d1	d3	d6
ctrl-HHV6	0.08700756	0.02602938	0.20948792
Promedio	Error estándar	Valor t	Valor P
0.107508287	0.053942775	1.993006242	0.1845
MBP			
ctrl-HHV6	0.1823748	-0.16151241	0.15907066
Promedio	Error estándar	Valor t	Valor P
0.059977683	0.110949188	0.540586953	0.6429

8. DISCUSIÓN

8.1 Validación

Para obtener los valores de los parámetros antes mencionados durante el proceso de validación, se calcularon mediante la construcción de curvas realizando diluciones seriadas base Log5 (diluciones 1:5) de muestras de cDNA obtenidas de oligodendrocitos de rata Wistar para el modelo de nuestro interés. Cada curva se realizó por triplicado y a su vez tres réplicas de cada punto, obteniéndose los valores de C_t durante la PCR en tiempo real de cada gen. Los valores obtenidos de las tres curvas de validación para cada gen evaluado fueron graficados, en donde el valor X corresponde el Log5 de la dilución de las muestras, mientras que el valor Y corresponde al valor C_t obtenido de la PCR en tiempo real. La pendiente de la curva es la relación entre la variación del eje Y con respecto a la variación del eje X. Representa así, una razón de cambio entre ambas variables (x e y).

Existen al menos 4 factores que afectan la eficiencia de la reacción cuando se encuentran suficientes precursores (Booth, 2010). El daño térmico del molde y la polimerasa durante los pasos de desnaturalización

1. La competencia entre los cebadores y moldes durante la alineamiento o formación del ddDNA.
2. La unión de la polimerasa a los productos alineados (cebador-ssDNA).
3. La extensión de los complejos ternarios.

Así, cuando una reacción de PCR ocurre con un 100% de eficiencia, la pendiente negativa ideal es de -3.3, pero al ser variables matemáticas, el intervalo de la muestra se espera o se acepta entre -3.0 a -3.6 (+/- 10%). Así, el valor de la pendiente nos permite calcular la eficiencia de reacción expresado como porcentaje de la reacción de PCR. Una eficiencia del 100% equivale a una pendiente de -3.3, mientras que una eficiencia de 90% equivale a una pendiente de -3.0 y una eficiencia de 110% es equivalente a una pendiente de -3.6. Lo que indica que los componentes de la reacción de PCR están actuando de forma eficiente dentro de la reacción.

Así, la fórmula para calcular la eficiencia es:

$$E = \left(-1 + 10^{\left(\frac{1}{\text{pendiente}} \right)} \right) 100$$

El parámetro de linealidad r^2 determina la calidad del modelo para replicar los resultados, y la proporción de variación de los resultados que puede explicarse por el modelo. A su vez, las repeticiones por triplicado de las muestras y la variación con respecto a la pendiente indica la reproducibilidad de la técnica mediante el valor P.

La curva melt es una prueba que se realizó después de que se obtiene el amplicón, realizando una curva de temperaturas y midiendo los niveles de fluorescencia. Así, la curva de temperatura en un intervalo de 65 a 90°C con aumentos de 0.3%/15s. En este proceso, el DNA de doble cadena se disocia gradualmente y el equipo detecta los cambios de fluorescencia emitidos por el fluoróforo empleado. Los resultados se representan en un gráfico como la tasa de cambio de la fluorescencia emitido por el fluoróforo empleado frente a la temperatura.

Cuando el ensayo es específico para un solo producto, la gráfica presenta un único pico correspondiente a la temperatura de melting (T_m) del amplicón en cuestión, dicha temperatura está en función del contenido de adeninas, timinas, citosinas y guaninas (A,T,C,G) en la secuencia del producto. En cambio, si presenta más picos adicionales existe la formación de productos secundarios y se debe revisar cada paso de optimización para mejorar la especificidad. Los controles negativos, al no contener la muestra de estudio, no deben presentar ninguna variación de la fluorescencia basal del sistema y, por lo tanto, no presentar ningún pico en el gráfico Melt (Raymaekers *et al.*, 2009).

8.1.1 Genes constitutivos

Validamos los genes constitutivos Gapdh y β -tubulina como genes de referencia debido a que son ampliamente utilizados en la investigación, mostrando buenos resultados en distintos ensayos publicados. Es necesario utilizar genes de referencia para validar los resultados de la RT-qPCR. Este proceso controla las variaciones en el rendimiento de extracción, el rendimiento de transcripción reversa y la eficiencia de

la amplificación, lo que permite las comparaciones de las concentraciones de mRNA en diferentes muestras. En este proyecto se validaron dos genes de referencia de acuerdo a lo establecido en la guía MIQE. La normalización contra un gen de referencia único no es aceptable a menos que los investigadores presenten pruebas claras para los revisores que confirmen su expresión invariante en las condiciones experimentales descritas. Es necesario presentar por lo menos dos genes de referencia constitutivos que mantengan una expresión estable y alta durante todas las condiciones experimentales empleadas.

La curva de validación global para GAPDH y β -tubulina presentaron valores dentro de los parámetros establecidos por la guía MIQE antes mencionados, la curva Melt tanto de GAPDH como β -tubulina, presentó un único pico correspondiente a la T_m de cada gen, respectivamente. Los controles negativos de ambos genes no presentaron ningún cambio en la variación basal de fluorescencia, por lo que ambos genes aprueban el proceso de validación y pueden ser empleados como genes de referencia.

Cabe mencionar que la reacción de PCR para β -Tubulina presentó mayor variabilidad que para GAPDH, con lo que parece tener mayor precisión el sistema en este último gen tal como se observa en la Figura 33. Sin embargo, los valores de β -Tubulina cumplen con todos los parámetros de validación.

La temperatura de melting para GAPDH es de 79.23°C, mientras que para β -Tubulina es de 80.53°C, esta variación es debida a que el contenido de A,T,C,G es distinto entre el producto de ambos genes.

8.1.2 Genes de mielina.

La expresión de los genes que codifican las proteínas que constituyen la mielina son conocidos como genes de mielina. Son esenciales para la síntesis de las vainas de mielina en los axones nerviosos. La cuantificación de la expresión de los genes de mielina nos permite evaluar los efectos de las infecciones virales en el SNC en la capacidad de síntesis de mielina. Los genes de mielina evaluados fueron CNPasa, MBP, PLP y MOG. Las curvas de validación para CNPasa, MBP, PLP y MOG se

encuentran dentro de los parámetros de validación. Al ser curvas globales con concentraciones relativas, observamos en la Figura 37 que para el gen MBP, el parámetro r^2 es de 0.9047. Esto se debió a que una curva de las tres empleadas en la curva global, presenta valores menores de Ct para cada punto con respecto a las otras dos. Esto sugiere que dicha muestra contenía una concentración mayor de cDNA que las demás muestras. Cabe mencionar que cada curva se realizó con una muestra distinta del mismo día de cultivo, es decir, con una réplica biológica distinta. A pesar de que el parámetro r^2 se encuentra bajo, aprueba el proceso de validación. En relación a las curvas Melt, los cuatro genes (CNPasa, MBP, PLP y MOG) presentaron un único pico correspondiente a 76.74, 77.59, 75.82 y 77.97°C, respectivamente. Cada temperatura de melting corresponde a cada amplificación obtenido de cada gen.

Los controles negativos para CNPasa y MBP no mostraron ningún cambio en la fluorescencia basal del sistema. En cambio, para el gen MOG, se puede asumir la contaminación de un control negativo durante el proceso técnico de validación y no dentro del sistema, ya que sólo uno de los controles presentó un ligero pico. A su vez, la curva Melt para los controles negativos de PLP, mostraron un pico a una temperatura correspondiente a los 75°C, por lo cual se requiere repetir el ensayo para este gen.

De acuerdo a los resultados, CNPasa, MBP y MOG aprueban el proceso de validación.

8.1.3 Reguladores negativos de mielina

Los genes reguladores negativos de mielina han sido asociados a una menor producción de mielina cuando se encuentran sobreexpresados. Para evaluar cambios en la expresión de estos genes durante una infección viral, es necesario validar algunos de los reguladores negativos más importantes en el proceso de síntesis y disminución de mielina. Los genes evaluados son Hes1, Hes5, Id2, Id4, Rock2 y p57Kip2.

Las curvas globales de validación para Hes5, Rock2 y p57kip2 se encuentran dentro de los parámetros de validación. Las curvas Melt para estos genes muestran un único pico a T_m de 75.0°C, 74.52°C y 83.88°C, respectivamente. Los controles negativos para estos genes no presentan cambios en la fluorescencia basal del sistema. Para el gen Hes1, en cambio, aunque los resultados se encuentran dentro de los parámetros de validación, no fue posible realizar los cinco puntos de cada curva debido a que en la última dilución la concentración de cDNA presente en la muestra fue muy baja y no se logró observar el producto de amplificación por PCR. La curva Melt para Hes1 presentó un único pico a una temperatura de melting en 80.5°C, los controles negativos no presentaron cambios a excepción de uno, el cual puede asumirse una contaminación técnica durante el proceso.

El gen ID2 presentó una curva de validación global dentro de los parámetros de validación. Sin embargo, en la curva melt se observó un único pico a una T_m de 79.0°C y los controles negativos presentaron un pico a un t_m de 75°C, lo que indica una posible contaminación dentro del sistema. Es importante encontrar la fuente de contaminación y repetir el ensayo.

En el caso del gen ID4, la curva de validación se encontró fuera de los parámetros de validación. Esto se debió a una contaminación dentro del sistema que enmascara las diluciones seriadas de las muestras y se obtuvieron valores de Ct muy cercanos entre un punto y otro de la curva. Esto se puede corroborar al observar la figura 48 de la curva melt para ID4, las muestras presentan un único pico a una T_m de 76.3°C, mientras que los controles negativos presentaron el mismo pico a 76°C. Debido a esto se realizaron cambios en varios elementos del sistema sin éxito de encontrar la fuente de contaminación. Por lo tanto, ID4 no aprueba el proceso de validación.

En resumen, los genes: gapdh, β tubulina, cnp, mbp, mog, hes 5, rock2 y p57kip2 aprueban la validación de la técnica.

En cambio, los genes hes1, plp, Id2 e Id4 requerirán cambios mayores para seguir el proceso de validación.

8.1.4 Análisis los productos amplificados por PCR obtenidos de la validación por electroforesis en gel de agarosa

Los productos obtenidos de la reacción por PCR durante la validación de los genes constitutivos, genes de mielina y reguladores negativos fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Como se observa en la Figura 55, cada reacción de PCR correspondiente a cada gen a validar produjo una única banda visible en el gel. Esto, junto a los resultados de la curva Melt nos indica que se produjo un único producto de PCR durante la amplificación de cada gen. Empleamos el marcador molecular 100 pb DNA Ladder de Invitrogen cat. 15628019 que tiene un rango de 100pb-2000pb para comparar el peso molecular teórico calculado de cada amplicón con el peso molecular experimental. En la Tabla 12 se resumen los valores de peso molecular calculado con base a las secuencias de cada primer empleado, y en la Figura 55 se observa que el peso molecular experimental corresponde cualitativamente al peso molecular calculado. Por lo tanto, con esto se puede demostrar que el sistema es específico para los productos que se interesan validar.

8.2 Muestras infectadas con HHV6 y controles

En el laboratorio se realizó la extracción, la purificación y el cultivo de células OPC obtenidas de ratas Wistar neonatas. Posteriormente, las células se colocaron en las placas de 24 pozos con Poli-D-lisina y entraron en contacto con las células HSB-2 infectadas con HHV6 y células HSB-2 no infectadas como control. El periodo de incubación fue durante 24 h mediante una cámara de transwell de 0.4um de poro para permitir la infección. Posteriormente las OPC se colocaron en medio *Sato* con bajo contenido de suero bovino fetal (0.5%) para inducir su diferenciación hacia oligodendrocitos. Para cada cultivo (células infectadas y controles) se tomaron muestras a los días 1,3,6 y 9 posteriores a la infección y se extrajo el RNA total. Las muestras de RNA fueron sometidas a una reacción de retro transcripción para obtener el cDNA correspondiente. Durante la evaluación de los genes de mielina CNPasa y MBP en dos réplicas biológicas, KT009 y KT0011, se encontró que no hubo diferencia significativa entre los perfiles de expresión de estos genes durante la infección con HHV6 y los controles, contrario a lo que se esperaba obtener. Debido a

que en algunas muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes con esclerosis múltiple se han encontrado partículas virales de HHV6, el resultado que se esperaba sería una disminución de la expresión de los genes de mielina y un aumento en la expresión de los genes reguladores negativos.

9. CONCLUSIONES

I. La infección por Herpes Virus 6 en células precursoras de oligodendrocitos de rata no afectó la expresión de las proteínas principales de mielina MBP y PLP.

II. El modelo de cuantificación de la expresión de genes de mielina y sus reguladores negativos validado en este proyecto, puede ser empleado en futuros estudios y pruebas con distintos virus que presentan tropismo a células oligodendrogiales y que pudieran intervenir en la expresión de los genes de mielina.

10. PERSPECTIVAS

Para la validación del gen Hes1, será necesario obtener muestras con una concentración de cDNA del gen Hes1 más adecuada, como por ejemplo una línea celular que mantenga un nivel elevado de expresión del gen Hes1. Para validar los genes PLP, ID2 e ID4 es necesario realizar pruebas en los elementos del sistema, como el agua empleada, los reactivos y el stock de primers utilizados de estos genes para descartar la fuente que está produciendo la contaminación observada en los controles negativos. Para las muestras infectadas con HHV6 y controles es importante realizar nuevamente el ensayo con muestras recientes y evaluar tanto los genes de mielina como los genes reguladores negativos para contrastar la expresión de ambos tipos de genes. Además de realizar otros ensayos para evaluar el efecto de la infección de HHV6 sobre genes de ciclo celular. Por lo pronto, el modelo estandarizado en este proyecto puede ser utilizado para evaluar la expresión de genes de mielina y genes reguladores negativos de mielina en otros tipos de infecciones virales en células precursoras de oligodendrocitos además de HHV6 debido a que se ha encontrado relación de distintos virus capaces de infectar el sistema nervioso central en el desarrollo de enfermedades desmielinizantes.

10. REFERENCIAS.

- Abbott, N. J., Rönnbäck, L. and Hansson, E. (2006) 'Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier', *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1), pp. 41–53. doi: 10.1038/nrn1824.
- Agut, H., Bonnafous, P. and Gautheret-Dejean, A. (2015) 'Laboratory and Clinical Aspects of Human Herpesvirus 6 Infections', *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), pp. 313–335. doi: 10.1128/CMR.00122-14.
- AL-OBAIDI, M. M. J. *et al.* (2018) 'Disruption of the blood brain barrier is vital property of neurotropic viral infection of the central nervous system', *Acta virologica*, 62(01), pp. 16–27. doi: 10.4149/av_2018_102.
- Albright, A. V *et al.* (1998) 'The effect of human herpesvirus-6 (HHV-6) on cultured human neural cells: oligodendrocytes and microglia.', *Journal of neurovirology*, 4(5), pp. 486–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9839646> (Accessed: 11 July 2018).
- Allen, N. J. and Eroglu, C. (2017) 'Cell Biology of Astrocyte-Synapse Interactions', *Neuron*, 96(3), pp. 697–708. doi: 10.1016/j.neuron.2017.09.056.
- Almazán, G. *et al.* (2001) 'Re-evaluation of nestin as a marker of oligodendrocyte lineage cells.', *Microscopy research and technique*, 52(6), pp. 753–65. doi: 10.1002/jemt.1060.
- Armati Patricia and Mathey Emily (2010) *The Biology of Oligodendrocytes*. Edited by Cambridge University Press. Cambridge: Cambridge University Press.
- Bottenstein, J. E. (2003) *Neural stem cells : development and transplantation*. Kluwer Academic Publishers.
- Bustin, S. A. *et al.* (2009) 'The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments', *Clinical Chemistry*, 55(4), pp. 611–622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797.
- Bustin, S. and Huggett, J. (2017) 'qPCR primer design revisited.', *Biomolecular detection and quantification*. Elsevier, 14Bustin, pp. 19–28. doi: 10.1016/j.bdq.2017.11.001.
- Cardinali, D. P. (2007) *Neurociencia aplicada : sus fundamentos*. Médica

Panamericana.

Corley, R. B. (2004) *A guide to methods in the biomedical sciences*. Springer.

Crossman, A. R., Neary, D. (Professor of neurology) and Crossman, B. (no date) *Neuroanatomy : an illustrated colour text*.

Dahm, T. *et al.* (2016) 'Neuroinvasion and Inflammation in Viral Central Nervous System Infections.', *Mediators of inflammation*. Hindawi Limited, 2016, p. 8562805. doi: 10.1155/2016/8562805.

Daneman, R. and Prat, A. (2015) 'The blood-brain barrier.', *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 7(1), p. a020412. doi: 10.1101/cshperspect.a020412.

Dávila, F. de P. (2009) 'Células madre neurales, neurogénesis y neuroprotección', *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 0(0). doi: es/monoranf.v0i0.943.

Davson, H. (1993a) *An Introduction to the blood-brain barrier*. CRC Press.

Davson, H. (1993b) *An Introduction to the blood-brain barrier*. CRC Press.

Dorak, M. T. and Dorak, M. T. (2006) *Real-Time PCR*. Taylor and Francis.

Emery, B. *et al.* (2009) 'Myelin Gene Regulatory Factor Is a Critical Transcriptional Regulator Required for CNS Myelination', *Cell*, 138(1), pp. 172–185. doi: 10.1016/j.cell.2009.04.031.

Faiz, M. *et al.* (2015) 'Adult Neural Stem Cells from the Subventricular Zone Give Rise to Reactive Astrocytes in the Cortex after Stroke', *Cell Stem Cell*, 17(5), pp. 624–634. doi: 10.1016/j.stem.2015.08.002.

Fatemi, S. H. *et al.* (2009) 'Abnormal expression of myelination genes and alterations in white matter fractional anisotropy following prenatal viral influenza infection at E16 in mice', *Schizophrenia Research*, 112(1–3), pp. 46–53. doi: 10.1016/j.schres.2009.04.014.

Félétou, M. (2011) *The Endothelium, The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators*. Morgan & Claypool Life Sciences. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21850763> (Accessed: 8 July 2018).

Fields, R. D. (2014) 'Myelin formation and remodeling.', *Cell*. NIH Public Access,

156(1–2), pp. 15–7. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.038.

Garibyan, L. and Avashia, N. (2013) 'Polymerase chain reaction.', *The Journal of investigative dermatology*. NIH Public Access, 133(3), pp. 1–4. doi: 10.1038/jid.2013.1.

Goldenberg, M. M. (2012) 'Multiple sclerosis review.', *P & T: a peer-reviewed journal for formulary management*. MediMedia, USA, 37(3), pp. 175–84. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22605909> (Accessed: 8 July 2018).

Goodman, A. D. *et al.* (2003) 'Human Herpesvirus 6 Genome and Antigen in Acute Multiple Sclerosis Lesions', *The Journal of Infectious Diseases*, 187(9), pp. 1365–1376. doi: 10.1086/368172.

Gordon, J. *et al.* (2000) 'Human polyomavirus JCV and expression of myelin genes.', *Journal of neurovirology*, 6 Suppl 2, pp. S92-7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10871794> (Accessed: 3 January 2019).

Graber, H. U. *et al.* (1995) 'Restricted infection with canine distemper virus leads to down-regulation of myelin gene transcription in cultured oligodendrocytes', *Acta Neuropathologica*. Springer-Verlag, 90(3), pp. 312–318. doi: 10.1007/BF00296516.

Hammond, C. (Constance) (2001) *Cellular and molecular neurobiology*. Academic Press.

Higuchi, R. *et al.* (1993) 'Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions', *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, 11(9), pp. 1026–1030. doi: 10.1038/nbt0993-1026.

Jacobson, S. and Marcus, E. M. (2007) *Neuroanatomy for the neuroscientist*. Springer.

Jessen, K. R. and Mirsky, R. (2008) 'Negative regulation of myelination: relevance for development, injury, and demyelinating disease.', *Glia*, 56(14), pp. 1552–65. doi: 10.1002/glia.20761.

Jordan, C. A. *et al.* (1989) 'Expression of viral and myelin gene transcripts in a murine CNS demyelinating disease caused by a coronavirus', *Glia*. John Wiley & Sons, Ltd, 2(5), pp. 318–329. doi: 10.1002/glia.440020505.

Karussis, D. (2014) 'The diagnosis of multiple sclerosis and the various related demyelinating syndromes: A critical review', *Journal of Autoimmunity*, 48–49, pp.

134–142. doi: 10.1016/j.jaut.2014.01.022.

Kralik, P. and Ricchi, M. (2017) 'A Basic Guide to Real Time PCR in Microbial Diagnostics: Definitions, Parameters, and Everything.', *Frontiers in microbiology*. Frontiers Media SA, 8, p. 108. doi: 10.3389/fmicb.2017.00108.

Lee, J. Y. *et al.* (2017) 'Overcoming Monocarboxylate Transporter 8 (MCT8)-Deficiency to Promote Human Oligodendrocyte Differentiation and Myelination'. doi: 10.1016/j.ebiom.2017.10.016.

Leibovitch, E. C. and Jacobson, S. (2014) 'Evidence linking HHV-6 with multiple sclerosis: an update.', *Current opinion in virology*, 9, pp. 127–33. doi: 10.1016/j.coviro.2014.09.016.

Lois, C. and Alvarez-Buylla, A. (1994) 'Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain.', *Science (New York, N. Y.)*, 264(5162), pp. 1145–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8178174> (Accessed: 21 October 2018).

Martenson, R. E. (1992) *Myelin--biology and chemistry*. CRC Press.

Martínez-Cáceres, E. M. and Montalbán, X. (2000) *Cuestiones sobre la patogenia de la esclerosis múltiple*. Available at: <https://www.inmunologia.org/Upload/Articles/5/1/511.pdf> (Accessed: 4 January 2019).

McCarthy, K. D. and de Vellis, J. (1980) 'Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue.', *The Journal of cell biology*, 85(3), pp. 890–902. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6248568> (Accessed: 12 July 2018).

Michiels, C. (2003) 'Endothelial cell functions', *Journal of Cellular Physiology*, 196(3), pp. 430–443. doi: 10.1002/jcp.10333.

Mishra, A. *et al.* (2016) 'Astrocytes mediate neurovascular signaling to capillary pericytes but not to arterioles.', *Nature neuroscience*. Europe PMC Funders, 19(12), pp. 1619–1627. doi: 10.1038/nn.4428.

Nave, K.-A. and Werner, H. B. (2014) 'Myelination of the Nervous System: Mechanisms and Functions', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30(1), pp. 503–533. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013101.

Ndubaku, U. and de Bellard, M. E. (2008) 'Glial cells: old cells with new twists.', *Acta histochemica*. NIH Public Access, 110(3), pp. 182–95. doi:

10.1016/j.acthis.2007.10.003.

Nieuwenhuys, R. (Rudolf) *et al.* (2009) *El sistema nervioso central humano*. Médica Panamericana.

Nolan, T. and Bustin, S. A. (no date) *PCR technology : current innovations*.

Owens, G. P. *et al.* (2011) 'Viruses and Multiple Sclerosis', *The Neuroscientist*, 17(6), pp. 659–676. doi: 10.1177/1073858410386615.

Pantry, S. N. and Medveczky, P. G. (2017) 'Latency, Integration, and Reactivation of Human Herpesvirus-6.', *Viruses*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 9(7). doi: 10.3390/v9070194.

Patro, N., Naik, A. A. and Patro, I. K. (2018) 'Developmental Changes in Oligodendrocyte Genesis, Myelination, and Associated Behavioral Dysfunction in a Rat Model of Intra-generational Protein Malnutrition', *Molecular Neurobiology*. doi: 10.1007/s12035-018-1065-1.

Patton, K. T. (2015) *Anatomy and Physiology*. Elsevier Health Sciences.

Pinto, M. and Dobson, S. (2014) 'BK and JC virus: A review', *Journal of Infection*, 68, pp. S2–S8. doi: 10.1016/j.jinf.2013.09.009.

Podbielska, M. and Hogan, E. (2009) 'Molecular and immunogenic features of myelin lipids: incitants or modulators of multiple sclerosis?', *Multiple Sclerosis Journal*, 15(9), pp. 1011–1029. doi: 10.1177/1352458509106708.

Ponchel, F. *et al.* (2003) 'Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions.', *BMC biotechnology*. BioMed Central, 3, p. 18. doi: 10.1186/1472-6750-3-18.

Purves, D. and Williams, S. M. (Stephen M. (2001) *Neuroscience*. Sinauer Associates. Available at:

[https://books.google.com.mx/books?id=t9iGQgAACAAJ&dq=Neuroscience. 2nd edition.&source=gbs_book_other_versions](https://books.google.com.mx/books?id=t9iGQgAACAAJ&dq=Neuroscience.2nd+edition.&source=gbs_book_other_versions) (Accessed: 12 June 2018).

Raymaekers, M. *et al.* (2009) 'Checklist for optimization and validation of real-time PCR assays', *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 23(3), pp. 145–151. doi: 10.1002/jcla.20307.

Reynaud, J. M. *et al.* (2014) 'Human herpesvirus 6A infection in CD46 transgenic

mice: viral persistence in the brain and increased production of proinflammatory chemokines via Toll-like receptor 9.', *Journal of virology*. American Society for Microbiology (ASM), 88(10), pp. 5421–36. doi: 10.1128/JVI.03763-13.

Ross, M. H., Pawlina, W. and Negrete, J. H. (2007) *Histología : texto y atlas color con biología celular y molecular*. Médica Panamericana.

Ryan, M., Ibrahim, M. and Parmar, H. A. (2014) 'Secondary Demyelination Disorders and Destruction of White Matter', *Radiologic Clinics of North America*, 52(2), pp. 337–354. doi: 10.1016/j.rcl.2013.11.007.

Vandeveldde, M. and Zurbruggen, A. (2005) 'Demyelination in canine distemper virus infection: a review', *Acta Neuropathologica*, 109(1), pp. 56–68. doi: 10.1007/s00401-004-0958-4.

Verrier, J. D. *et al.* (2013) 'Role of CNPase in the oligodendrocytic extracellular 2',3'-cAMP-adenosine pathway.', *Glia*. NIH Public Access, 61(10), pp. 1595–606. doi: 10.1002/glia.22523.

11. ANEXOS

11.1 Índice de figuras

Figura 1. Anatomía del sistema nervioso central.....	8
Figura 2. Diagrama del sistema ventricular cerebral	8
Figura 3. Estructura y vías de permeabilidad de la barrera hemato-encefálica	10
Figura 4. Estructura de la neurona.	11
Figura 5. Clasificación estructural de las neuronas.	12
Figura 6. Pies de astrocitos formando parte de la barrera hemato-encefálica.....	14
Figura 7. Interacción entre un oligodendrocito y la superficie axonal	15
Figura 8. Etapas de diferenciación oligodendroglial y sus principales marcadores... 17	
Figura 9. Células de la microglía.	20
Figura 10. Células endimarias	21
Figura 11. Endotelio en vasos capilares del sistema nervioso central.....	23
Figura 12. Vías de diferenciación de células madre neurales y marcadores específicos de cada linaje.	25
Figura 13. Estructura y conformación de la vaina de mielina sobre una fibra nerviosa.	27
Figura 14. Localización cromosómica de los genes de mielina.	30
Figura 15. Proceso de síntesis de mielina en el SNC.....	32
Figura 16. Desmielinización de una fibra nerviosa.	38
Figura 17. Corte de médula espinal teñida con azul de Luxol. Grados de desmielinización en la médula espinal.	39
Figura 18. Principales regiones cerebrales donde se presenta infección de virus desmielinizantes.....	41
Figura 19. Perfiles de expresión de los principales genes de mielina en infección con CDV mediante hibridación in situ.	45
Figura 20. Estructura viral y del genoma del virus HHV6	47
Figura 21. Citopatología HHV6 en oligodendrocitos.....	51
Figura 22. Microscopia electrónica de barrido para oligodendrocitos infectados con HHV6.....	52
Figura 23. Expresión de HHV6 en una lesión periventricular de EM detectable por Inmuno histoquímica.	54
Figura 24. Fases de la reacción de PCR.....	57
Figura 25. Cinética de la reacción de qPCR.....	59
Figura 26. Ejemplo para optimización de la concentración de primers.....	66
Figura 27. Evaluación del ensayo por curva Melt.	68
Figura 28. Curva estándar para qPCR.	69
Figura 29. Obtención de cerebro de rata Wistar neonata.....	74
Figura 30. Procedimiento de extracción de RNA con el kit RNeasy kit de <i>Quiagen</i> .. 77	
Figura 31. Resultados generales de validación de los genes estándar GAPDH y β - tubulina.....	83
Figura 32. Curva de validación global para CNP.....	84
Figura 33. Curva Melt para el gen CNP.....	85

Figura 34. Curva de validación global para MBP.....	86
Figura 35. Curva Melt para el gen MBP.	87
Figura 36. Curva de validación global para PLP.....	88
Figura 37. Curva Melt para el gen PLP.	89
Figura 38. Curva de validación global para MOG.....	90
Figura 39. Curva Melt para el gen MOG.....	91
Figura 40. Curva de validación global para p57kip2.....	92
Figura 41. Curva Melt para el gen p57kip2.....	93
Figura 42. Curva de validación global para ID2.....	94
Figura 43. Curva Melt para el gen ID2.....	95
Figura 44. Curva de validación global para ID4.....	96
Figura 45. Curva Melt para el gen ID4.....	97
Figura 46. Curva de validación global para Hes1	98
Figura 47. Curva Melt para el gen Hes 1.....	99
Figura 48. Curva de validación global para el gen Hes 5.	100
Figura 49. Curva Melt para el gen Hes5.....	101
Figura 50. Curva de Validación global para Rock 2.....	102
Figura 51. Curva Melt para el gen Rock 2.	103
Figura 52. Análisis de los productos de amplificación por electroforesis en gel de agarosa.....	107
Figura 53. Expresión relativa de CNP y MBP en la muestra KT009.....	110
Figura 54. Expresión relativa de CNP y MBP en la muestra KT0011.....	111

11.2 Índice de tablas

Tabla 1. Principales marcadores de maduración en las células oligodendrogliales. .	18
Tabla 2. Principales reguladores positivos de la expresión de mielina.	34
Tabla 3. Principales reguladores negativos de la expresión de mielina.	36
Tabla 4. Características de los principales virus desmielinizantes en el sistema nervioso central.....	43
Tabla 5. Componentes de la reacción de PCR.....	56
Tabla 6. Características óptimas para el diseño de primers.	60
Tabla 7. Fundamento de los métodos SYBR Green y las sondas TaqMan.....	63
Tabla 8. Parámetros de validación para qPCR.....	71
Tabla 9. Lista de genes involucrados en el proceso de mielinización seleccionados para la validación.	80
Tabla 10. Muestras de cultivo celular empleadas para realizar las curvas de validación de los genes de interés.	81
Tabla 11. Resultados obtenidos de las curvas globales de validación para los genes de mielina y reguladores negativos.	104
Tabla 12. Secuencia de primers y tamaño de amplicón utilizados para la validación de genes de mielina y reguladores negativos.	106
Tabla 13. Niveles de expresión relativa del gen CNP y MBP para las muestras KT009 y KT0011 obtenidos mediante el método de $\Delta\Delta Ct$	109
Tabla 14. Prueba estadística t pareada para la muestra KT009.....	112
Tabla 15. Prueba estadística t pareada para la muestra KT0011.....	112