



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA MELATONINA EN LA MODULACIÓN DEL
CITOESQUELETO OLIGODENDROGLIAL DE LA RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA

PRESENTA:

LESLYE RODRÍGUEZ CÁRDENAS

Directora de tesis:

Dra. Marcela Valdés Tovar

Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz

Asesora interna:

Dra. Martha Asunción Sánchez Rodríguez

Ciudad de México, septiembre 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS POR EL APOYO RECIBIDO

Al Fondo Sectorial de Investigación para la Educación, SEP-CONACYT, por el apoyo para la formación de recursos humanos (nivel Licenciatura) proyecto Participación de la Melatonina en los Procesos de Mielinización y Remielinización en el Sistema Nervioso Central: Implicaciones para los Trastornos Neuropsiquiátricos con clave 287115.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la Beca para la Titulación Egresados de Alto Rendimiento de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Al Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, Subdirección de Investigaciones Clínicas, Laboratorio de Neurofarmacología.

A mi comité tutorial:

Dra. Marcela Valdés Tovar

Dra. Martha A. Sánchez Rodríguez

A cada uno de mis sinodales por el apoyo en la revisión de mí manuscrito de tesis:

M. en C. Ma. Teresa Griselda Fuentes Lara

M. en C. Rosa Elba Galván Duarte

Dra. Ma. Isabel Soto Cruz

DEDICATORIA

Me gustaría agradecer en estas líneas la ayuda que muchas personas y colegas me han prestado durante el proceso de realización de este trabajo.

Debo agradecer de manera especial y sincera, a mi directora de tesis, Dra. Marcela Valdés Tovar, por haberme guiado en la elaboración de este trabajo de titulación, por su paciencia ante mi inconsistencia, por su generosidad y su apoyo incondicional, por sus consejos, su cariño y motivación constante.

Al M. en C. José de Jesús Argueta Donohué y al Dr. Héctor Solís Chagoyán por haberme permitido aprovechar su competencia, experiencia y conocimiento en las aplicaciones científicas durante la elaboración de este proyecto.

Por el apoyo e inclusión en su grupo de investigación, por la amplia generosidad con sus conocimientos y experiencias a la Dra. Gloria Benítez King deseo agradecer en este apartado.

A mis compañeros de laboratorio M en C. Claudia I. Mejía Mondragón, M. en C. Julián Oikawa Sala, QFB. Zuly A. Sánchez Florentino, Biol.Exp. Olivia Huchín Espinosa de los Monteros, C.D. Salvador Alarcón Elizalde, pQFB. M. Michel Nava Camacho, por compartir conocimientos y experiencias profesionales y personales que fueron de gran valor.

Por todo el apoyo, la paciencia y soportar mis malos momentos, con mucho cariño a mi compañero pBiol. Guillermo Castro. Espero que llegues a ser cualquier cosa que quieras ser.

A todos mis compañeros y amigos, estén donde estén y sin excepción, por su apoyo incondicional en el transcurso de mi carrera universitaria.

En general, a mi familia que entendieron mi ausencia y me brindaron su cariño y apoyo absoluto

DEDICATORIA

Todo esto nunca hubiera sido posible sin el amparo incondicional que me otorgaron mis padres, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, por haberme apoyado en todo momento; con mucho amor y cariño, les dedico todo mi esfuerzo y trabajo puesto para la realización de esta tesis.

Leslye Rodríguez Cárdenas

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LA MELATONINA
EN LA MODULACIÓN DEL CITOESQUELETO
OLIGODENDROGLIAL DE LA RATA**

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	vii
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. MARCO TEÓRICO.....	5
3.1 Sistema nervioso.....	5
3.1.1 Neuronas.....	8
3.1.2 Neuroglía.....	9
3.1.2.1 Microglía.....	12
3.1.2.2 Macroglía.....	13
3.1.2.2.1 Astroglía.....	13
3.1.2.2.2 Oligodendroglía.....	15
3.2 Estructura y funciones de la mielina.....	16
3.3 Mielinización.....	21
3.3.1 Padecimientos desmielinizantes y dismielinizantes.....	25
3.3.2 Plasticidad de la mielina: remodelación y remielinización.....	26
3.4 Mecanismos de regulación del proceso de mielinización.....	27
3.4.1 Participación del citoesqueleto en la oligodendrogenesis.....	36
3.5 Melatonina.....	44
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	48
5. HIPÓTESIS.....	48
6. OBJETIVO GENERAL.....	48
6.1 Objetivos específicos.....	48
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	49
7.1 Diseño.....	49
7.2 Universo (población o muestra).....	49
7.3 Variables.....	49
7.4 Procedimientos experimentales.....	50
7.4.1 Animales de experimentación.....	50
7.4.2 Tratamiento farmacológico.....	50

7.4.3 Detección por Western Blot de tubulina- α y tubulina- α acetilada y detección inmunofluorescente de marcadores de diferenciación y maduración oligodendroglial y en OLGs de nervio óptico de rata.....	51
7.4.4 Detección inmunofluorescente de de tubulina- α acetilada y marcadores de diferenciación y maduración oligodendrogliales en OPCs de hipocampo de rata obtenidos por separación inmunomagnética.....	53
7.5 Análisis estadístico.....	53
8. RESULTADOS.....	55
9. DISCUSIÓN.....	65
10. CONCLUSIÓN	70
11. PERSPECTIVAS	70
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
13. APÉNDICE	85
13.1 Aislamiento y cultivo de oligodendrocitos de nervio óptico de rata.....	85
13.2 Aislamiento y cultivo de precursores de oligodendrocitos de hipocampo de rata por separación inmunomagnética	86
13.3 Tinción fluorescente de los microtúbulos de actina	88
13.4 Detección de marcadores de diferenciación y maduración oligodendroglial y de tubulina- α acetilada por inmunofluorescencia.....	88
13.5 Inmunodetección de tubulina- α y tubulina- α acetilada por Western Blot	90

LISTA DE ABREVIATURAS

SNC sistema nervioso central

SNP sistema nervioso periférico

DTI resonancia magnética con tensor de difusión (diffusion tensor imaging)

MHC-II complejo mayor de histocompatibilidad clase II

GFAP proteína fibrilar ácida de la glía

BHE barrera hematoencefálica

TNF- α factor de necrosis tumoral

MAG glicoproteína asociada a mielina

Gal-C galactocerebrósido C

I.Q. coeficiente intelectual

EM esclerosis múltiple

TDAH trastorno por déficit de atención e hiperactividad

TOC trastorno obsesivo compulsivo

RMN resonancia magnética nuclear

OLG oligodendrocito

OPC célula precursora de oligodendrocitos

NEP precursor neuroepitelial

PDGF factor de crecimiento derivado de plaquetas

bFGF factor de crecimiento básico de fibroblastos

BDNF factor neurotrófico derivado de cerebro

IGF factor de crecimiento insulínico

HGF factor de crecimiento de hepatocitos

GGF factor de crecimiento glial

ECM matriz extracelular

NG2 sulfato de condroitina

MBP proteína básica de mielina

PLP proteína proteolípídica
MAG glicoproteína asociada a mielina
MOG glicoproteína oligodendrocítica de mielina
CNPasa 2,3-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa
GTP trifosfato de guanosina
GDP difosfato de guanosina
ATP trifosfato de adenosina
ADP difosfato de adenosina
SIRT2 silenciador de la información tipo 2
MEL melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina)
PKC proteína cinasa C
MT1 receptor de melatonina 1
MT2 receptor de melatonina 2
NSC células madre neuronales
ROS especies reactivas de oxígeno
PPTM poros de permeabilidad transitoria mitocondrial

1. RESUMEN

Los oligodendrocitos son las células gliales que forman la mielina en el sistema nervioso central. Estos provienen de células precursoras (OPCs) que se diferencian y maduran hasta adquirir la capacidad mielinizante. El proceso de diferenciación oligodendroglial implica un incremento drástico en la complejidad morfológica celular, por lo que el rearrreglo dinámico del citoesqueleto tiene un papel clave. Este proceso es regulado por diversos factores solubles, entre ellos se propone la melatonina, que es una indolamina endógena que modula la organización del citoesqueleto en diversas estirpes celulares e induce la polarización morfo-funcional neuronal. El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de la melatonina en la diferenciación de los OPCs y en el citoesqueleto oligodendroglial.

Para ello, OPCs aislados del hipocampo mediante separación inmunomagnética, o bien pre-oligodendrocitos de nervio óptico de rata se incubaron con melatonina [100nM] o el vehículo (etanol 0.0004%) durante 24, 48 y 72h. Los marcadores de linaje A2B5 y Olig2, y de estadio de diferenciación O4 y MBP se detectaron mediante inmunofluorescencia. El número de filipodios -estructuras formadas por microfilamentos de actina- y la complejidad morfológica por la técnica de Sholl, se evaluó en imágenes obtenidas por microscopía de fluorescencia de células teñidas con faloidina rodaminada. La cantidad relativa de tubulina-alfa acetilada se determinó mediante Western blot.

La población de OPCs aislada tuvo una pureza del 98% y 96% para los marcadores de linaje oligodendroglial A2B5 y Olig2, respectivamente. En OPCs tratados 72h con melatonina, la intensidad de fluorescencia de los marcadores de diferenciación O4 y MBP fue 85% mayor ($p < 0.001$), respecto al vehículo. El número de filipodios aumentó significativamente ($p < 0.05$) en las células incubadas 24h con melatonina. La complejidad morfológica también incrementó con este tratamiento. La cantidad relativa de tubulina-alfa acetilada fue significativamente mayor ($p < 0.05$) en extractos de OPCs tratados con melatonina durante 48h.

El tratamiento con melatonina incrementó la proporción de oligodendrocitos que expresan marcadores moleculares de estadios avanzados de diferenciación y también la

complejidad morfológica de estas células, lo que sugiere que esta indolamina induce el proceso de diferenciación oligodendroglial. Este efecto podría estar mediado por la acción de la melatonina sobre el citoesqueleto al incrementar el número de filipodios, que son protrusiones delgadas que anteceden a la formación y extensión de las ramificaciones. Además, la melatonina incrementa la complejidad de las ramificaciones oligodendrogliales, lo cual es congruente con la evidencia previa de nuestro grupo de trabajo, ya que la melatonina favorece árboles dendríticos más complejos e intrincados en neuronas hilares hipocampales. Por otra parte, se sabe que la acetilación de la tubulina-alfa proporciona estabilidad al citoesqueleto microtubular en oligodendrocitos maduros. En las células tratadas con melatonina la proporción de tubulina-alfa acetilada fue mayor, lo que sugiere que esta indolamina favorece esta modificación postraduccional y con ello la estabilidad de las ramificaciones de los oligodendrocitos. En conclusión, la melatonina favorece la diferenciación oligodendroglial y uno de los mecanismos para ejercer este efecto es la modulación del citoesqueleto.

2. INTRODUCCIÓN

Las células que componen el sistema nervioso son las neuronas y un grupo de células con funciones diversas que se conoce como glía o neuroglía. Las neuronas se especializan en generar y transmitir el impulso nervioso mediante el cual se lleva a cabo el procesamiento de información. La neuroglía está encargada de mantener la homeostasis del sistema, para ello tiene funciones de soporte metabólico, participa en la modulación de la acción sináptica e interviene en la recuperación de la lesión neural, entre otras funciones.

Uno de los componentes de la neuroglía son los oligodendrocitos (OLGs). Los OLGs son células altamente ramificadas encargadas de la producción y mantenimiento de mielina en el sistema nervioso central (SNC). Estos provienen de células precursoras de oligodendrocitos (OPCs), que migran hasta sus sitios de acción donde se diferencian y comienzan con el proceso de mielinización.

La mielina es una estructura especializada formada por múltiples capas de membrana que rodean a los axones por segmentos. Al ser una estructura rica en lípidos aísla dichos segmentos (internodos) entre los cuales se forman en el axón los nodos de Ranvier. La formación de estos dominios funcionales confiere a los axones un aumento en la velocidad de conducción del impulso nervioso, ya que se realiza de forma saltatoria entre nodos de Ranvier. La importancia de la mielina en el funcionamiento óptimo del SNC ha sido evidente en las enfermedades humanas tales como la esclerosis múltiple (EM) en la que se pierde la integridad de la vaina de mielina por un mecanismo autoinmune. Además, la mayoría de los padecimientos neuropsiquiátricos y neurodegenerativos presentan alteraciones estructurales y/o funcionales en la materia blanca (formada principalmente por axones mielinizados y los cuerpos celulares de los OLGs), sin embargo, el origen y los mecanismos implicados en estas alteraciones no se conocen hasta la fecha.

Para que ocurra un adecuado proceso de mielinización, los OLGs deben pasar por un proceso de diferenciación altamente regulado, para lo cual es necesario un cambio dinámico del citoesqueleto oligodendroglial hacia una morfología elaborada, ya que es

necesario generar prolongaciones con múltiples ramificaciones, que se ensanchan en sus extremos distales para envolver un tramo de axón con su propia membrana celular. El proceso de diferenciación de los OLGs puede ser regulado por moléculas del microambiente celular como podría ser la melatonina. La función de esta molécula endógena como un modulador del citoesqueleto en diversas estirpes celulares, entre ellas las neuronas y sus precursores, fue documentada por Benitez-King (2006). Las evidencias de este grupo de trabajo sugieren que la melatonina podría contribuir al restablecimiento de la organización del citoesqueleto en enfermedades neurodegenerativas y neuropsiquiátricas⁽¹⁾. Además, múltiples datos experimentales demuestran que la melatonina tiene un efecto protector y reparador del daño (estructural y funcional) en la materia blanca en diversos modelos animales.

Estas evidencias en conjunto sugieren que la melatonina podría tener potencial terapéutico en enfermedades neurológicas y neuropsiquiátricas que involucran estados patológicos de los OLGs y la mielina. Sin embargo, no se conoce si la melatonina participa en los procesos fisiológicos de mielinización y remielinización (reparación de la mielina) en el SNC. Así, el presente trabajo propone que la melatonina podría participar en la diferenciación y maduración oligodendroglial requerida para adquirir la capacidad de mielinización, a través de la modulación del citoesqueleto de los OLGs. La relevancia de este proyecto consiste en aportar conocimiento científico respecto al papel de esta indolamina endógena en la regulación de la mielinización, ya que este proceso está implicado en el neurodesarrollo, en la plasticidad neuronal y en la neurodegeneración. La apropiada mielinización y un balance homeostático en el recambio y remodelación de la mielina contribuyen al funcionamiento óptimo del sistema nervioso, por lo que conocer los mecanismos que subyacen a la modulación fisiológica de este proceso es el punto de partida para comenzar a dilucidar cómo puede estar alterado en estados patológicos e identificar moléculas que eventualmente podrían convertirse en alternativas terapéuticas para los padecimientos neuropsiquiátricos que cursan con un déficit/disfunción de la materia blanca.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Sistema nervioso

El sistema nervioso es uno de los más complejos del organismo. Está constituido por un tejido extraordinariamente especializado en la comunicación biológica a través de señales eléctricas y químicas: el tejido nervioso⁽²⁾. Esta red intrincada de miles de millones de células está organizada en dos subdivisiones principales: el sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico⁽³⁾.

El sistema nervioso central (SNC) está formado por el encéfalo y la médula espinal. El SNC procesa diversos tipos de información sensitiva aferente, controla los movimientos voluntarios y es también la fuente de los pensamientos, emociones y recuerdos^(3,4).

Por otro lado, el sistema nervioso periférico (SNP) está formado por todo el tejido nervioso que se encuentra fuera del encéfalo y la médula espinal, que incluye nervios conformados por miles de axones, ganglios constituidos por los cuerpos celulares de las neuronas, plexos entéricos que son redes extensas de neuronas localizadas en las paredes de los órganos del tubo digestivo y, receptores sensoriales que son estructuras que detectan los cambios en el medio ambiente externo o interno como los receptores del tacto en la piel, los fotorreceptores del ojo y los receptores olfatorios en la nariz⁽³⁾.

A nivel celular, el tejido nervioso está compuesto por neuronas y glía –también llamada neuroglía–. Estas células se distribuyen de forma distinta en las diversas regiones del sistema nervioso y según su localización presentan variaciones estructurales y funcionales^(2,3).

Las neuronas realizan la mayoría de las funciones propias del sistema nervioso debido a que son células especializadas en la transmisión y recepción de señales bioeléctricas y neuroquímicas, capaces de alcanzar grandes longitudes y de realizar conexiones intrincadas con otras células^(2,5).

Las células gliales superan en número, diversidad celular y funciones a las neuronas. La glía sostiene, nutre y protege a las neuronas, mantiene el líquido intersticial que las rodea

y regula la actividad neuronal mediante factores solubles y contacto celular. Además cada vez se atribuye mayor importancia funcional a las interacciones neuro-gliales^(2,6).

La disposición agrupada de las células que lo conforman permite distinguir en el sistema nervioso dos regiones bien delimitadas, una de apariencia grisácea y otra de aspecto blanquecino brillante, que se conocen como materia gris y materia blanca, respectivamente. En la materia gris predominan los cuerpos o somas neuronales, las prolongaciones dendríticas y la porción inicial de las prolongaciones axonales, así como las terminaciones axonales procedentes de neuronas de otras regiones cerebrales. En cambio, la materia blanca está compuesta de millones de axones cubiertos con mielina (fibras mielínicas) o sin ella (fibras amielínicas), los somas de los oligodendrocitos que forman la mielina, otras células de la neuroglía y no incluye somas neuronales. En la médula espinal, la materia blanca envuelve un núcleo interno de materia gris; por su parte, una capa delgada de materia gris cubre la superficie de las porciones más grandes del encéfalo, el cerebro y el cerebelo^(2,3)(figura 1).

Evidencia reciente de estudios de imagen tanto en modelos animales como en humanos, muestran que la materia blanca tiene una plasticidad dinámica dependiente de la experiencia, lo que contribuye al aprendizaje en el cerebro adulto^(7,8). Consistente con lo anterior, estudios de muestras *post mortem* y de imágenes cerebrales *in vivo* han revelado el desarrollo continuo de la materia blanca en la edad adulta⁽⁹⁻¹¹⁾.

La medición de la difusión y direccionalidad de las moléculas de agua a través de los tejidos (difusividad y anisotropía fraccional) en imágenes obtenidas mediante resonancia magnética con tensor de difusión (diffusion tensor imaging, DTI) permiten evaluar la microestructura de la materia blanca y características como el calibre axonal, la densidad de las fibras, la integridad de la mielina y la trayectoria de los tractos, que se conoce como tractografía^(10,11). En la materia gris las señales de DTI son bajas porque el agua difunde simétricamente, pero en la materia blanca se genera una señal intensa en un patrón irregular que expone las principales rutas de información que fluyen entre las regiones cerebrales, ya que el agua difunde asimétricamente a lo largo de conjuntos de fibras axonales⁽¹²⁾. Estudios longitudinales de DTI en sujetos sanos, muestran un incremento robusto en la anisotropía fraccional y disminución de la difusividad media durante la

infancia y la adolescencia, en varias regiones de la materia blanca cerebral. Esto se ha relacionado con un incremento en la formación y consolidación de conexiones y circuitos neuronales. En cambio, en el envejecimiento los estudios muestran resultados opuestos, con disminución de la anisotropía fraccional e incremento de la difusividad media^(10,11).

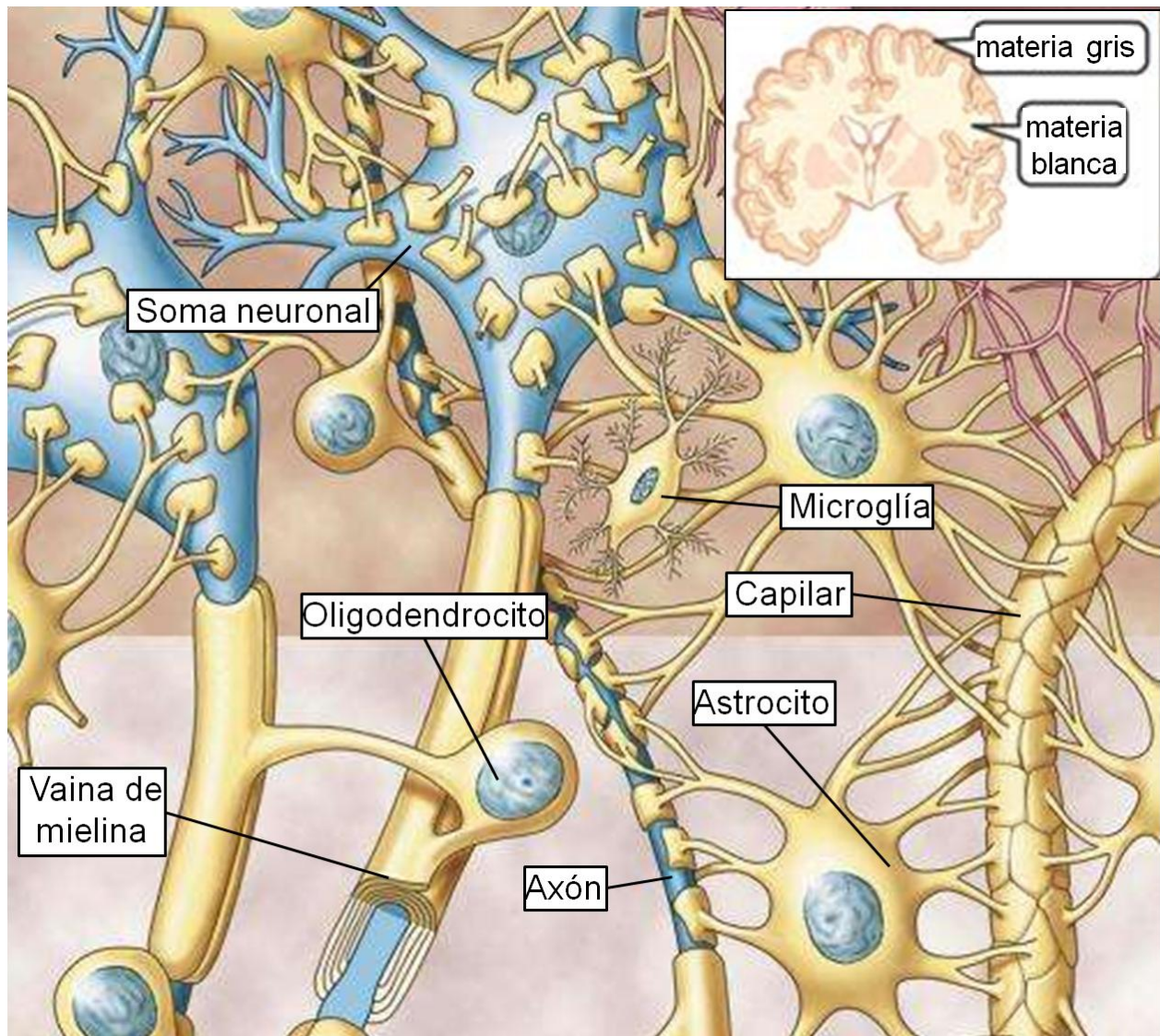


Figura 1. Esquema representativo de la composición celular de la materia gris y la materia blanca. En la materia gris (arriba) predominan los somas neuronales, las dendritas y la parte inicial de los axones. En la materia blanca (abajo) se encuentran los axones neuronales cubiertos con mielina o sin ella, los oligodendrocitos y otras células de la neuroglía.

También, estudios en humanos y en modelos animales de cómo la habilidad de aprender tiene un impacto en la remodelación de la materia blanca. También, factores del estilo de vida como el ejercicio y el sueño se han encontrado asociados a cambios de la materia blanca y son mediadores potencialmente importantes en la plasticidad de la misma durante la edad adulta [Ver revisión de: Sampaio-Baptista, et al. (2017)⁽⁷⁾].

3.1.1 Neuronas

Las neuronas poseen todas las características generales de una célula eucariótica, pero su especialización en recibir, conducir y transmitir un impulso bioeléctrico -el potencial de acción o impulso nervioso- las hacen singulares y diferentes a otras poblaciones celulares⁽²⁾. La generación de un potencial de acción neuronal es una señal eléctrica que se propaga a lo largo de la superficie de la membrana plasmática de una neurona, se inicia y desplaza por el movimiento de iones (sodio y potasio) entre el líquido intersticial y el interior de la neurona a través de canales iónicos específicos en su membrana plasmática. El potencial de acción se transmite de unas neuronas a otras a través de las conexiones sinápticas, con la generación de circuitos neuronales, o bien se transmite a los órganos efectores del sistema nervioso periférico donde efectúa una función específica^(2,3).

La morfología típica de una neurona consta de 3 partes: 1) un cuerpo celular, 2) dendritas y 3) un axón. El cuerpo celular, conocido como pericarion o soma, contiene el núcleo rodeado por citoplasma, en el que se hallan los organelos celulares; del contorno del soma neuronal surgen prolongaciones (también llamadas procesos, proyecciones o fibras) especializadas. La mayoría de las neuronas tienen dos tipos de prolongaciones por lo general dispuestas en polos opuestos de la célula: las dendritas y el axón, ambas dotadas de un citoesqueleto de microtúbulos y microfilamentos de actina y filamentos intermedios de características particulares (neurofilamentos). Las dendritas habitualmente son cortas, agudizadas y presentan múltiples ramificaciones mientras que el axón o cilindroeje, se caracteriza por ser una prolongación única y de mayor longitud que parte de una región del soma denominada como axonal^(2,3)(figura 2).

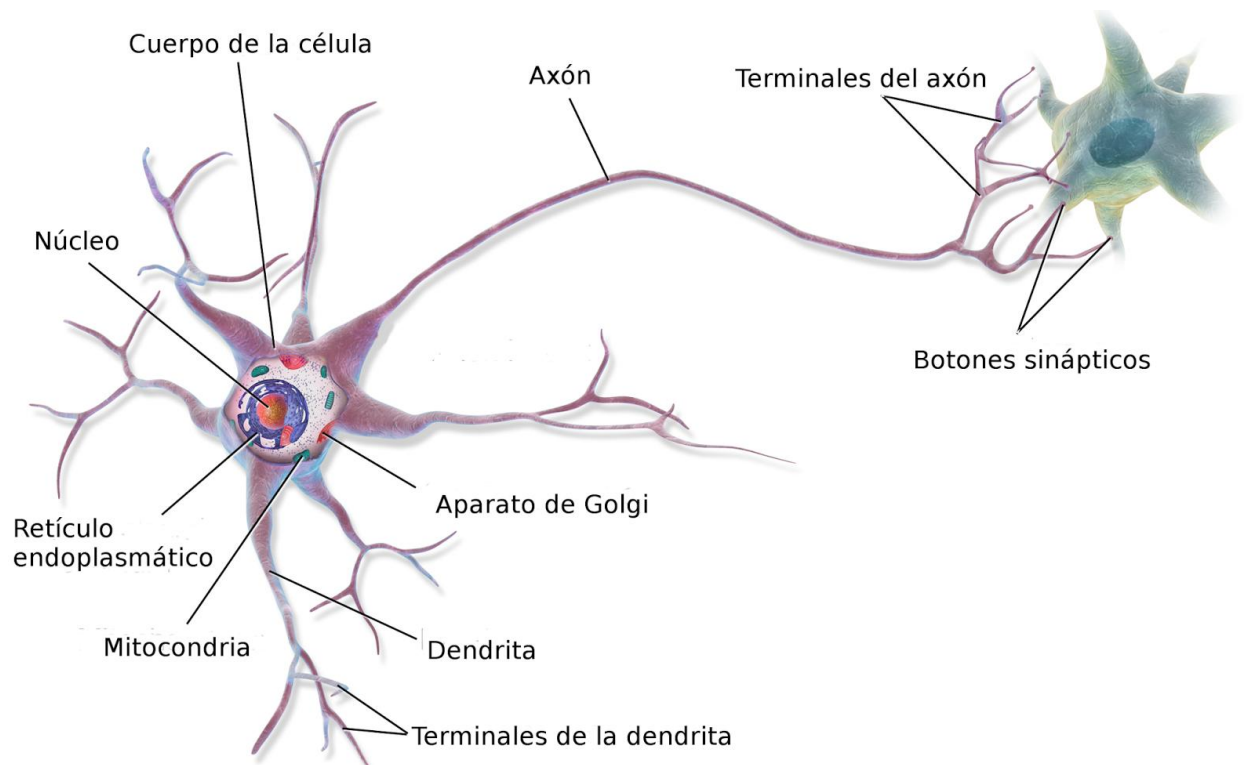


Figura 2. Esquema de una neurona y sus partes. Una neurona típica se conforma del cuerpo celular, pericarion o soma donde se encuentran los organelos celulares y prolongaciones especializadas dispuestas en polos opuestos del soma: las dendritas y el axón. Tomado de Fernández Calderón; 2018⁽¹³⁾.

3.1.2 Neuroglía

En 1856 Rudolf Virchow introdujo el concepto de neuroglía (*néuron-*, nervio; y *-glía*, unión o pegamento) como un tejido conectivo del cerebro, a pesar de que admitió que “la neuroglía también contiene un cierto número de elementos celulares”. Sin embargo, las primeras células gliales fueron descritas antes de la conceptualización de Virchow en la tesis doctoral de Robert Remak en 1838, en la que describió las fibras nerviosas y visualizó el recubrimiento alrededor de las mismas formado por las células de Schwann⁽¹⁴⁾.

El desarrollo de la técnica de tinción con cromato de plata reportada por Camilo Golgi, generó grandes avances en la neuroanatomía celular. Golgi fue el primero en demostrar que la neuroglía representa una población celular distinta de las células nerviosas y que algunas células gliales (probablemente astrocitos protoplásmicos) establecían contacto entre los vasos sanguíneos y las fibras nerviosas a través de sus prolongaciones. Golgi

fue el primero en proponer que las células gliales participaban en la transferencia de sustancias metabólicas de la sangre al parénquima cerebral. También describió otra población celular (oligodendrocitos o astrocitos fibrosos) con prolongaciones paralelas a los tractos de las fibras axonales⁽¹⁴⁾.

En 1889, Wilhelm His demostró el origen común de las neuronas y la neuroglía, ya que ambas poblaciones celulares derivan del neuroectodermo. Años después, Pío del Río-Hortega describió las células microgliales como el único tipo de células intrínsecas cerebrales de origen mesodérmico y no ectodérmico⁽¹⁴⁾.

En 1919, Del Río-Hortega identificó las otras dos clases principales de células gliales: los oligodendrocitos y la microglía. No fue hasta el uso de la microscopía electrónica en 1950 que quedó claro que los oligodendrocitos en el SNC y las células de Schwann en el SNP forman la mielina, que previamente se describía como una secreción axonal. También Del Río-Hortega descubrió que la microglía protege al cerebro de daño mediante un proceso de remodelación morfológico y funcional conocido como la activación microglial⁽¹⁴⁾.

La neuroglía o simplemente glía, agrupa a los componentes celulares no neuronales del tejido nervioso y representa más de la mitad del volumen del SNC que varía con la especie⁽³⁾. La neuroglía participa en diversos aspectos de la neurotransmisión y produce factores de crecimiento que aseguran la sobrevivencia de las neuronas.

En general, las células gliales son entre 5 y 25 veces más numerosas que las neuronas⁽³⁾ y se considera que éstas no generan ni propagan potenciales de acción. Las células gliales también tienen prolongaciones complejas que se extienden desde sus cuerpos celulares, pero estas no cumplen los mismos propósitos que las prolongaciones neuronales⁽¹⁵⁾. Las funciones que están bien establecidas de las células gliales son: formar la barrera hematoencefálica, mantener el medio iónico extracelular, modular la velocidad de propagación del impulso nervioso, modular la acción sináptica al regular la recaptura de neurotransmisores en la hendidura sináptica o cerca de ella, proporcionar un andamiaje para ciertos aspectos del desarrollo neuronal y participar en la reparación de la lesión neural (o en algunos casos impedirla). En este contexto, las células gliales

pueden actuar como células madre en algunas regiones encefálicas, promueven el crecimiento de las neuronas dañadas en regiones donde puede ocurrir una regeneración útil e impiden la regeneración en otras regiones donde el nuevo crecimiento descontrolado podría producir más daños que beneficios⁽¹⁵⁾.

Hoy en día se reconoce que en el SNC hay tres tipos principales de células gliales que se clasifican de acuerdo con su tamaño celular en microglía y macroglía. Tanto las neuronas como la macroglía se originan de células neuroepiteliales, mientras que la microglía deriva en mayor medida de células precursoras hematopoyéticas^(14,15). La microglía es un sólo tipo celular mientras que la macroglía comprende dos poblaciones celulares diferentes: los astrocitos y los oligodendrocitos^(2,15). Además de las tres clases principales de glía diferenciada, también se encuentran en todo el SNC del adulto células madre gliales, que retienen la capacidad de proliferar y generar precursores comprometidos con los linajes astrogliales u oligodendrogliales, células ependimales, y en el SNP, las células de Schwann y las células satélite^(3,15).

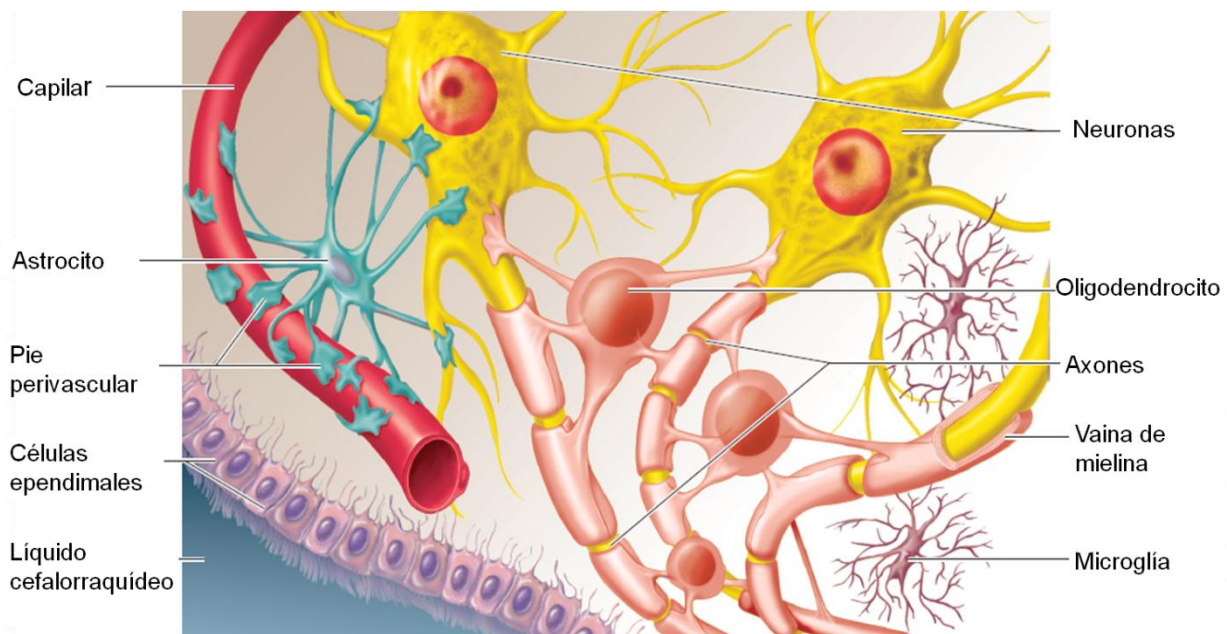


Figura 3. Esquema de las principales células gliales del sistema nervioso central. Los principales componentes celulares de la neuroglía son la microglía y la macroglía (astrocitos y oligodendrocitos). Modificado de Fox, et al.,2017⁽¹⁶⁾.

3.1.2.1 Microglía

La microglía (*micro-*, pequeño) son células pequeñas que tienen prolongaciones delgadas con numerosas proyecciones en forma de espinas. Las células microgliales provienen de células precursoras hematopoyéticas que colonizan el sistema nervioso desde etapas tempranas del desarrollo embrionario. Después de invadir el SNC, los precursores microgliales se diseminan de forma relativamente homogénea a través del tejido nervioso y adquieren un fenotipo específico que claramente los distingue de sus precursores⁽¹⁴⁾.

La microglía representa la defensa endógena del SNC contra patógenos y factores que causan o derivan de un daño tisular. La microglía elimina los restos celulares presentes en sitios donde hubo una lesión o los generados por el recambio celular normal^(2,15). Además la microglía, como sus análogos los macrófagos, secreta moléculas de señalización (sobre todo citocinas y quimiocinas) que modulan la inflamación local e influyen en la supervivencia o la muerte celular⁽¹⁵⁾.

En el SNC la microglía existe bajo condiciones fisiológicas en su forma ramificada o como generalmente se le denomina en “estado de reposo” que se caracteriza por un cuerpo celular pequeño y múltiples prolongaciones delgadas y elaboradas. Dichas prolongaciones y sus ramificaciones se extienden a través del tejido nervioso para detectar señales de degeneración celular o la presencia de agentes extraños a través de los receptores expresados en su membrana plasmática. Si esto ocurre, la microglía inicia un proceso de respuesta activa que desencadena su transformación morfológica para adoptar una forma ameboides. Este proceso, conocido como activación microglial, conlleva hacia un cambio de nivel funcional, ya que se induce la expresión de propiedades migratorias, proliferativas y fagocíticas, así como la capacidad de liberar diversas enzimas, receptores y proteínas solubles. Algunas células de la microglía regresan al estado de reposo y otras mediante quimiotaxis se reúnen alrededor del sitio de lesión donde comienzan a multiplicarse y a remover restos celulares^(2,14,17,18).

En presencia de una lesión las células microgliales pueden desencadenar la respuesta inmune adaptativa en el SNC al actuar como células presentadoras de antígenos. Bajo condiciones específicas, se estimula la expresión del complejo molecular de presentación de antígenos, el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II, por sus siglas en inglés); la expresión de este complejo es esencial para la interacción de las células microgliales con los linfocitos T en la inducción de la respuesta inmune⁽¹⁴⁾.

3.1.2.2 Macroglía

3.1.2.2.1 Astroglía

Los astrocitos (*astro-*, estrella) recibieron este nombre por la forma estrellada en la que se acomodan los filamentos intermedios en su citoplasma, sin embargo, su morfología real es altamente heterogénea. Los astrocitos tienen muchas prolongaciones celulares. Son las células más numerosas y diversas de la neuroglía en el SNC^(3,14). Una característica típica de los astrocitos es la expresión de la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) y la vimentina de los filamentos intermedios que forman su citoesqueleto⁽¹⁴⁾.

En el tejido nervioso la astroglía se asocia tanto a las neuronas como a los vasos sanguíneos⁽²⁾. De acuerdo con su distribución en el sistema nervioso existen dos tipos de astrocitos: los astrocitos protoplásmicos presentes en la materia gris y los astrocitos fibrosos que se asocian a las prolongaciones nerviosas en la materia blanca^(2,14). Los astrocitos protoplásmicos tienen muchas prolongaciones cortas, las cuales son extremadamente elaboradas y complejas. Estas prolongaciones hacen contacto con los vasos sanguíneos a través de sus terminales en forma de botón (“end-feet”) perivasculares. Además establecen múltiples contactos con las neuronas⁽¹⁴⁾. En cambio, los astrocitos fibrosos tienen prolongaciones largas y menos elaboradas que los astrocitos protoplásmicos. Las prolongaciones de los astrocitos fibrosos también establecen terminales tipo *end-feet* perivasculares o subpiales. Además, las prolongaciones de los astrocitos fibrosos tienen numerosas ramificaciones que hacen contacto con los axones en los nodos de Ranvier⁽¹⁴⁾.

Las células astrogliales tienen múltiples funciones, una de ellas es definir la microarquitectura del parénquima cerebral mediante la división de la materia gris en

unidades estructurales relativamente independientes⁽¹⁴⁾. En su papel nutricional, los astrocitos integran los circuitos neuronales con el flujo sanguíneo local mediante la formación de dominios microanatómicos astrocito-neurona-vaso sanguíneo, conocidos como unidades neurovasculares. También participan en la regulación del flujo sanguíneo local mediante la liberación de agentes vasoactivos y contribuyen a generar una barrera de permeabilidad limitada de los vasos sanguíneos hacia el tejido nervioso: la barrera hematoencefálica (BHE)^(2,14).

Con el objetivo de mantener un entorno químico apropiado para la señalización celular, los astrocitos regulan la concentración de iones, neurotransmisores y metabolitos, así como el movimiento de agua mediante múltiples cascadas moleculares. Por otra parte, su papel en la homeostasis del glutamato liberado durante la transmisión sináptica contribuye a prevenir la muerte neuronal por excitotoxicidad⁽¹⁴⁾.

La astrogliía regula la formación, maduración, mantenimiento y estabilidad de las sinapsis y así influye en la funcionalidad de los circuitos neuronales. Los astrocitos secretan numerosos factores indispensables para la sinaptogénesis, y sin ellos, la formación de las sinapsis disminuye. Subsecuentemente, los astrocitos influyen en la maduración de las sinapsis mediante varios sistemas de señalización, por ejemplo al regular la densidad de receptores postsinápticos o por la liberación de mediadores solubles como el factor de necrosis tumoral (TNF α)^(5,14).

La evidencia de una relación morfo-funcional entre las células astrogliales y las sinapsis sugirió el concepto de la sinapsis tripartita, formada por tres partes equivalentes en importancia: la terminal presináptica, la membrana neuronal postsináptica, y el astrocito que rodea la sinapsis. Así, la liberación de neurotransmisores de la terminal presináptica activa receptores tanto en la membrana postsináptica neuronal como en las membranas perisinápticas astrogliales. Esto resulta en la generación de un potencial postsináptico en la neurona y una señalización de Ca²⁺ en el astrocito. Este ión se propaga a través del cuerpo celular del astrocito y desencadena la liberación de moléculas de los astrocitos (gliotransmisores), los cuales pueden estimular a la membrana neuronal pre- y postsináptica⁽¹⁴⁾.

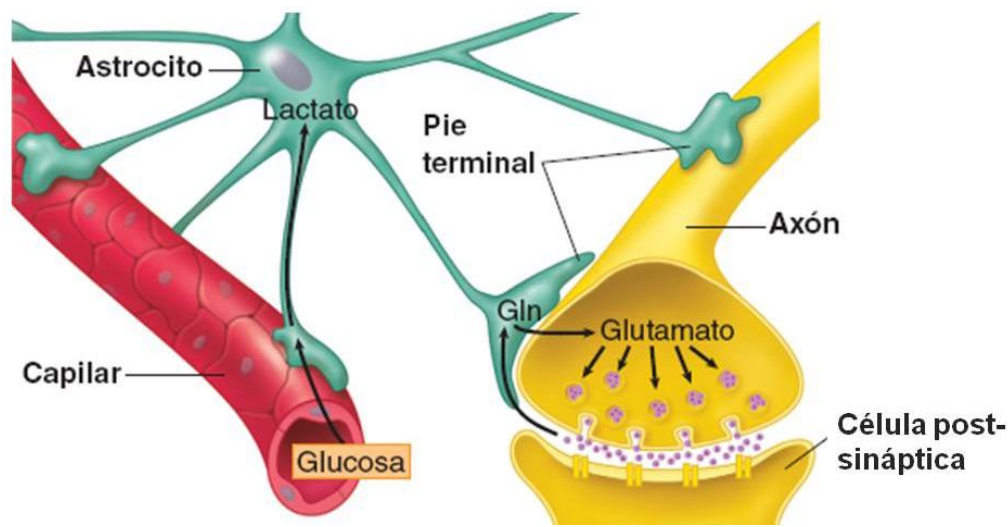


Figura 4. Esquema de las principales funciones de los astrocitos. Los astrocitos forman las unidades neurovasculares y contribuyen a prevenir la muerte neuronal por excitotoxicidad al intervenir en la homeostasis del glutamato liberado durante la transmisión sináptica. Imagen tomada y editada de Fox et al; 2007⁽¹⁶⁾.

3.1.2.2.2 Oligodendroglía

Los oligodendrocitos (*oligo-*, poco; y *-dendrón*, árbol) son células gliales altamente ramificadas que se asemejan a los astrocitos pero son más pequeñas y con menos prolongaciones. Su soma mide entre 10 y 20 μm de diámetro⁽¹⁹⁾, tienen un núcleo pequeño y esférico rico en heterocromatina y su citoplasma contiene abundante retículo endoplásmico rugoso (RER), polirribosomas libres, un aparato de Golgi desarrollado y un alto contenido de microtúbulos⁽²⁾.

En el SNC los oligodendrocitos (OLGs) se disponen asociados, de forma sucesiva, a lo largo del trayecto de los axones ya que los extremos de sus prolongaciones forman una envoltura laminada rica en lípidos, llamada mielina, alrededor de varios axones simultáneamente^(2,3). En el SNP, las células que forman la mielina se denominan células de Schwann, y cada una de estas células puede mielinizar un segmento de un axón^(2,15,20). A pesar de tener la misma ultraestructura, la mielina del SNC y del SNP no tiene la misma composición proteica⁽¹⁴⁾. Además de la capacidad de generar las vainas

de mielina, los OLGs proveen de soporte metabólico a los axones que envuelven. Los productos de la glucólisis de los OLGs (lactato o piruvato) pueden difundir a través de los transportadores de monocarboxilato en la mielina paranodal en axones subyacentes, lo que acelera el metabolismo mitocondrial y promueve la función integrada de los axones⁽²¹⁾.

También, se ha reportado que los OLGs juegan un papel inmunomodulador ya que expresan varias moléculas involucradas en los procesos inmunológicos como citocinas, quimiocinas, moléculas presentadoras de antígenos, receptores y proteínas reguladoras del complemento, entre otras [Ver revisión de: Zeiz, Enz & Schaeren-Wiemers; 2016⁽²²⁾].

3.2 Estructura y funciones de la mielina

La mielina es una estructura especializada formada por la membrana plasmática de las células mielinizantes y tiene una composición molecular y arquitectura únicas. Como se mencionó previamente, en el SNC, la mielina está formada por los extremos distales de las prolongaciones de los OLGs, que se ensanchan y envuelven fragmentos de axones.

La mielina está formada por múltiples capas de membrana con una estructura periódica característica: la línea mayor densa y la línea de interperiodo, respectivamente, como se ha revelado por microscopía electrónica. La línea mayor densa representa el conjunto de las membranas de mielina citoplasmática condensada, mientras que la línea de interperiodo consiste del espacio intersticial entre las membranas⁽²³⁾ (figura 5).

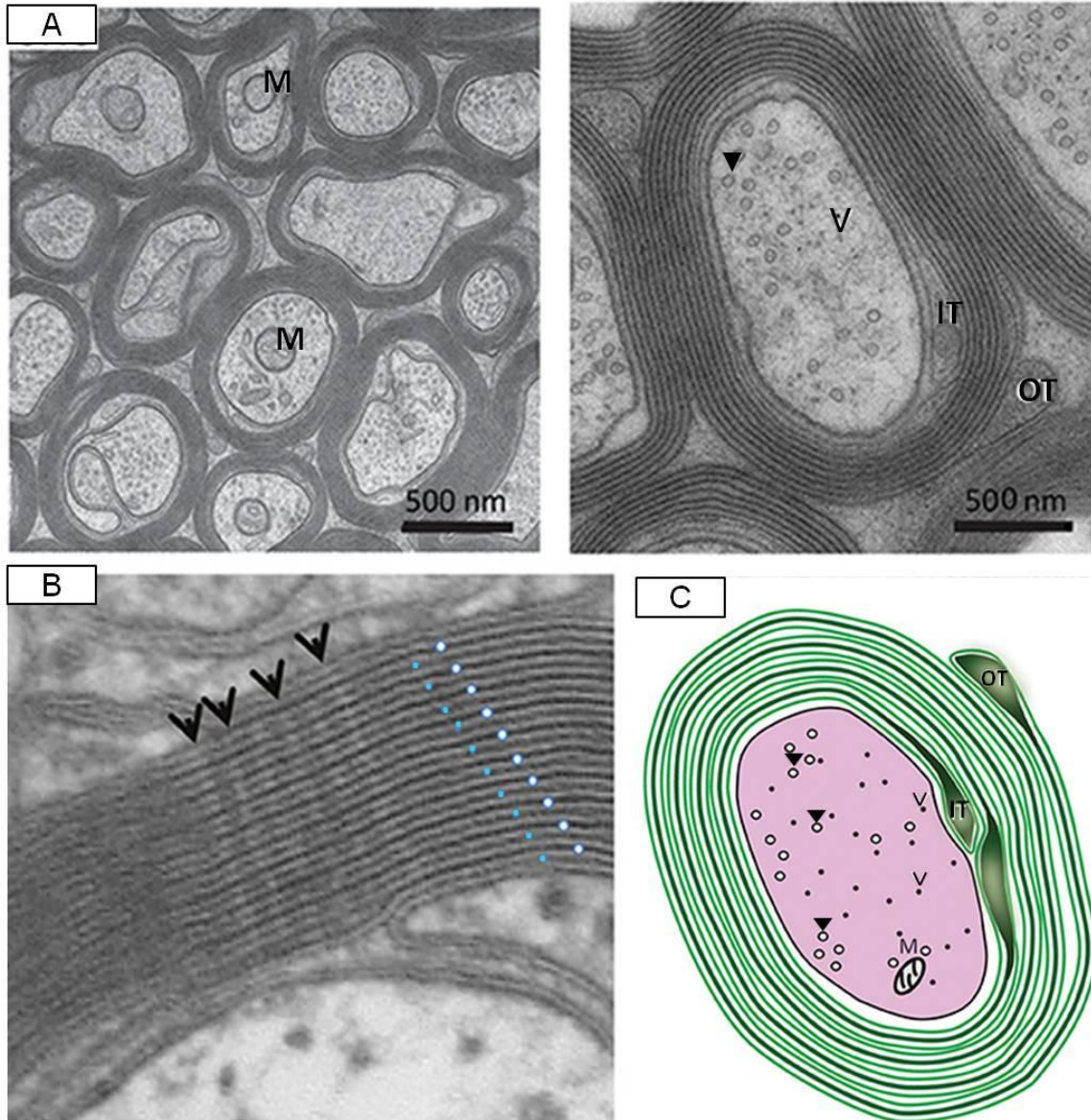


Figura 5. Ultraestructura de un axón mielinizado en el SNC. A) En el SNC, los axones mielinizados están empaquetados dentro de la materia blanca (imagen: nervio óptico de ratón) y a menudo están en contacto con las vainas de mielina de las fibras vecinas. En una magnificación los elementos del citoesqueleto axonal son visibles: microtúbulos (flechas) y microfilamentos (cabezas de flecha). B) Vaina con múltiples capas de mielina. La periodicidad regular de la mielina compacta (línea mayor densa) refleja las superficies intracelulares gliales fusionadas (puntos blancos), y los 2 nm de espacio interperiodo entre las superficies extracelulares de las envolturas adyacentes (puntos azules), las flechas señalan los componentes radiales. C) Representación esquemática de una fibra mielinizada: la membrana plasmática de la célula glial (verde), línea mayor densa (gris), mitocondria (M), membrana externa (OT); membrana interna (IT). Tomado y editado de Stassart, Möbius, Nave & Edgar; 2018⁽²⁴⁾.

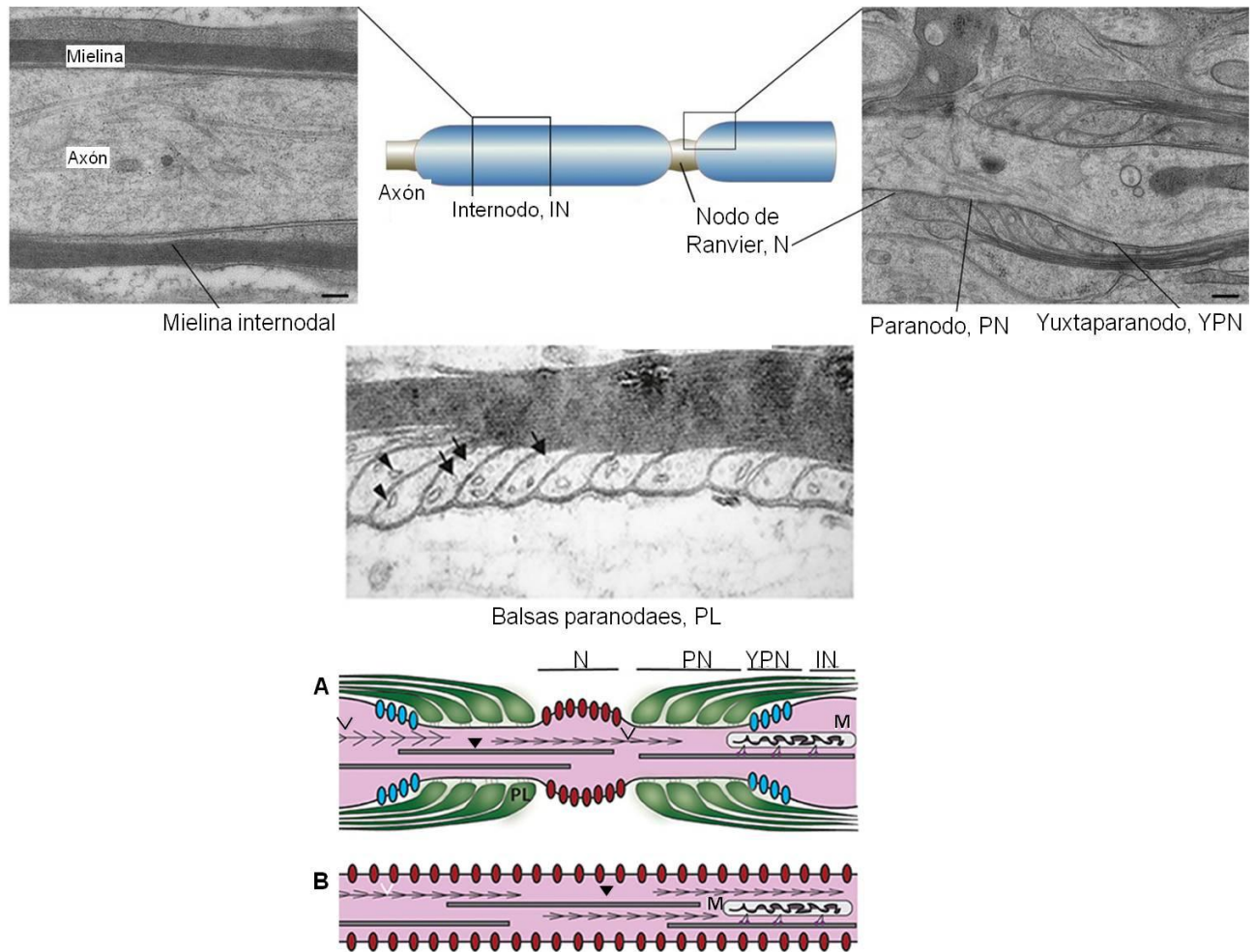


Figura 6. Composición molecular y ultraestructura de un axón del SNC mielinizado. En el panel superior se observa un diagrama esquemático e imágenes de microscopía electrónica que muestran los diferentes dominios de un axón mielinizado: nodo de Ranvier (N), internodo (IN), paranodo (PN) y yuxtaparanodo (YPN). Barra 80 nm. Abajo, imagen de las balsas paranodales (PL) que contienen microtúbulos (flechas) y vesículas (cabezas de flecha). En el panel inferior, en A representación esquemática de los elementos de un nodo: balsas paranodales de la vaina de mielina (verde), canales de Na^+ dependientes de voltaje (rojo), canales de K^+ dependientes de voltaje (azul), neurofilamentos (cabezas de flecha), microtúbulos (cabezas de flecha abiertas) y mitocondria (M); en B se observa una representación esquemática de un axón no mielinizado con una distribución uniforme de canales de Na^+ dependientes de voltaje a lo largo del axonema. Modificado de Simons, Misgeld & Kerschensteiner, 2014; Stassart et al., 2018^(24,25).

La mielina recubre segmentos de axón que son denominados internodos o segmentos internodales, ya que entre ellos hay regiones del axón no mielinizadas que se denominan nodos de Ranvier⁽¹⁴⁾ (figura 5). Éstos son dominios axonales especializados que contienen una alta densidad de canales iónicos distribuidos en regiones específicas para que la transmisión del impulso nervioso se lleve a cabo de forma saltatoria. Los potenciales de acción son únicamente desencadenados en el nodo, después se transmiten al siguiente nodo donde se genera el siguiente potencial de acción, y así sucesivamente de tal forma que el potencial de acción pareciera saltar de nodo en nodo⁽¹⁴⁾. De esta manera, la mielina aumenta la velocidad de conducción de un impulso eléctrico a lo largo del axón (figura 7).

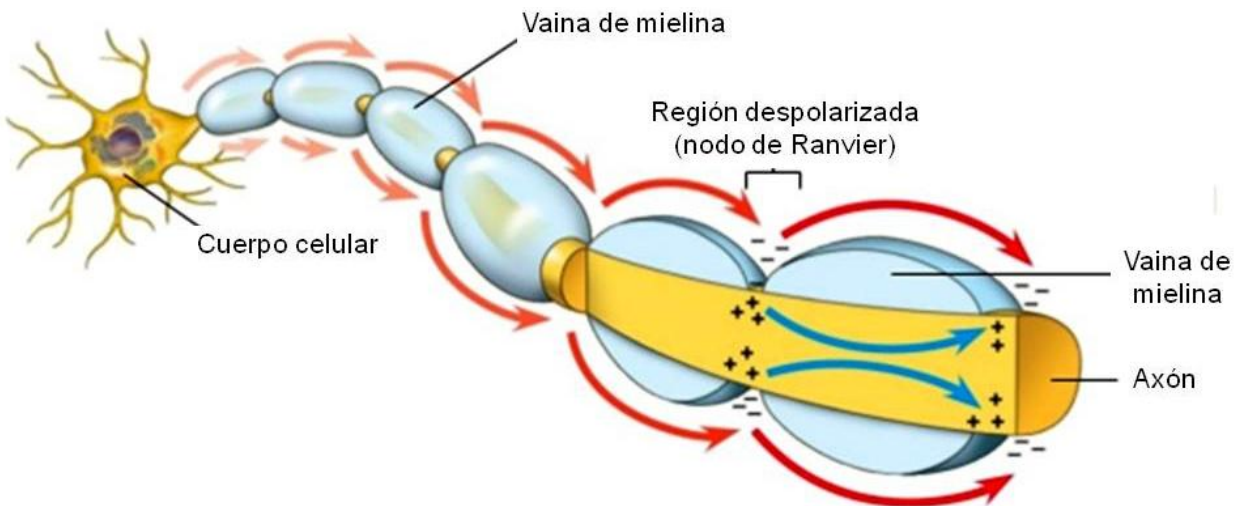


Figura 7. Conducción saltatoria del impulso nervioso. La señal eléctrica o impulso nervioso se transfiere de nodo a nodo lo que aumenta la velocidad de transmisión del mismo en axones mielinizados. Tomada y editada de Lehninger, Nelson & Cox, 2009⁽²⁶⁾.

El final del segmento internodal contiene más citoplasma y forma las llamadas balsas paranodales que tienen uniones con el axón^(14,23). En las regiones paranodales y las adyacentes (denominadas yuxtaparanodales) (figura 5) hay una distribución específica de los canales iónicos responsables de la transmisión de los potenciales de acción, así como diversas moléculas que participan en la señalización bidireccional OLG-axón. Durante el proceso de mielinización, los OLGs insertan más internodos que son óptimos para una rápida señalización a través de ciertos axones⁽¹²⁾.

La función primaria de la mielinización es regular la velocidad de conducción necesaria para una coordinación de las señales a diferentes distancias y con ello proveer las bases para un procesamiento adecuado de la información mediante la sincronización del impulso nervioso. La velocidad de conducción depende de diversos factores como el diámetro axonal, el espesor y la compactación de la vaina de mielina, el número y la longitud de los nodos de Ranvier, la estructura nodal y la densidad y distribución de los canales iónicos en el nodo y en la región paranodal^(7,27,28).

La resistencia a la corriente eléctrica se reduce a medida que aumenta el calibre de las fibras nerviosas, por lo que las fibras de mayor calibre conducen los impulsos nerviosos a velocidades más altas. La mielina regula el diámetro axonal mediante la señalización de proteínas de mielina, como la glicoproteína asociada a mielina (MAG) que ha sido implicada en la fosforilación de los neurofilamentos, lo que a su vez afecta el calibre axonal y el transporte axoplásmico⁽²⁹⁻³¹⁾. Además, el espesor de la vaina de mielina en los axones mantiene una relación estrecha entre el diámetro axonal con y sin mielina, donde las vainas de mielina más delgadas o gruesas que lo necesario para alcanzar la relación óptima (0.65)⁽³²⁾ reducen la velocidad de conducción⁽²⁷⁾.

En los procesos neurobiológicos es necesaria la conexión funcional entre regiones distantes del cerebro. Como se mencionó antes, reducir la resistencia a la corriente eléctrica acelera la velocidad de transmisión del impulso nervioso en axones de gran diámetro. Esta estrategia para acelerar los impulsos conduce al gigantismo de los axones en los circuitos neuronales. Sin embargo, esta adaptación necesita un gran espacio y un elevado gasto metabólico debido a la activación y mantenimiento de los axones⁽³³⁾. La conducción saltatoria del impulso nervioso permite una alta velocidad de transmisión a través de axones delgados y con bajo costo metabólico, características que han permitido el desarrollo de sistemas nerviosos más compactos y de mayor complejidad^(33,34). Las ventajas evolutivas que aporta este mecanismo explican por qué han surgido diferentes versiones de la vaina de mielina a lo largo de la evolución. Por otra parte, pone en perspectiva la gravedad de los problemas asociados a las enfermedades desmielinizantes⁽³⁵⁾.

Al estar formada por múltiples capas de membrana plasmática, la mielina está compuesta principalmente por moléculas hidrófobas, incluidos lípidos y proteínas proteolipídicas, que juntos ejercen una fuerza repulsiva hacia el citosol acuoso y el fluido extracelular. Además, las fuerzas de atracción intermoleculares de los lípidos dan como resultado la formación de una membrana de mielina compacta y estrechamente organizada⁽²³⁾.

Estudios de la composición molecular de la mielina revelan que su contenido *in situ* de agua es cercano al 40%, además de un alto contenido de lípidos (70-85% de su peso total seco) y el resto en proteínas (15-30%). La composición lipídica en la mielina es particular, la característica más relevante es el enriquecimiento en glicosfingolípidos (~27%) y plasmalógenos (~16%)⁽²³⁾. En el SNC el contenido de lípidos en la mielina es caracterizada por altos niveles de galactolípidos (~32% del peso seco de lípidos), que incluyen el galactocerebrósido C (Gal-C) y su derivado sulfatado, sulfatida, colesterol (~26% del peso total de lípidos) y fosfolípidos^(14,23,36).

3.3 Mielinización

Los OLGs están programados para mielinizar diferentes segmentos de varios axones. Cada OLG emite alrededor de 15 prolongaciones extensas y aplanadas en sus extremos que se enrollan alrededor de los axones y forman la vaina de mielina. A diferencia de la mielinización en el SNP donde las células de Schwann envuelven el axón con el cuerpo celular y el núcleo y forman una estructura denominada neurolema, los axones mielinizados por los OLGs carecen de esta estructura⁽³⁾. La mielinización indiscriminada de fibras nerviosas se ha visto regulada por dos posibles mecanismos: el tamaño de la fibra y las moléculas inhibitorias⁽³⁷⁾. Los OLGs son capaces de detectar el diámetro de la estructura a mielinizar y requieren un diámetro mínimo para el proceso, así, los OLGs mielinizan únicamente fibras de calibres mayores a 0.4 μm y la mielinización indiscriminada de dendritas se previene mediante moléculas inhibitorias secretadas o expresadas en la membrana de las dendritas, como la molécula de adhesión de la unión (junctional adhesion molecule, JAM2) que inhibe la mielinización mediante contacto celular⁽³⁸⁾.

Para mielinizar correctamente, un OLG debe extender varias prolongaciones que contactarán y envolverán cada una un segmento de axón. De tal forma que la progresión a lo largo del linaje oligodendroglial ocurre mediante un programa altamente regulado de migración, proliferación, diferenciación y mielinización. Además, con el objetivo de asegurar la mielinización los OLGs tienen una tasa metabólica alta. Algunos estudios señalan que durante el pico de mielinización, los OLGs producen 3 veces su peso en mielina y más de 100 veces en membrana de soporte por día^(39,40). Estas características convierten a los OLGs en células altamente vulnerables a diversos tipos de daño⁽³⁹⁾.

El proceso general de la formación de mielina, que ocurre tras la migración de las células precursoras que dan lugar a los oligodendrocitos (OPCs, oligodendrocyte precursor cells) de la zona subventricular a diferentes regiones del cerebro puede ser dividida en tres eventos específicos: 1) diseminación celular, que incluye el proceso de diferenciación caracterizado por la formación de prolongaciones altamente ramificadas; 2) el establecimiento y estabilización de las interacciones OLG-axonales, elaboración de láminas membranales y formación de envolturas primarias, y 3) compactación de las capas de mielina (formación de la vaina de mielina madura)⁽⁴¹⁾.

Durante la primera etapa de la mielinización, las prolongaciones oligodendrogliales están extendidas y ramificadas. Los mecanismos exactos previos a los de envoltura y compactación de la mielina son eventos morfológicamente complejos que no están completamente claros. Varias teorías se han presentado a través de los años, basadas en la habilidad de un OLG de mielinizar varios axones, lo que supone que cada prolongación oligodendroglial debe realizar los movimientos necesarios para envolver un segmento axonal mientras que el cuerpo celular permanece inmóvil. Un modelo del envolvimiento axonal propone que el borde distal de cada prolongación oligodendroglial se extiende a lo largo del segmento de axón a mielinizar en forma de lámina, genera una envoltura inicial y después se mueve debajo de la lámina de crecimiento (Figura 8 B-C).

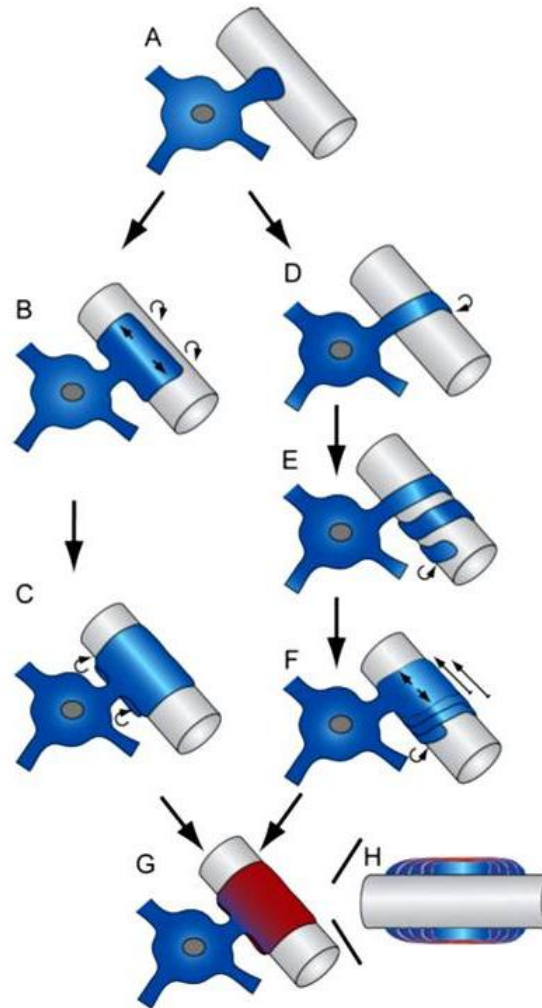


Figura 8. Dos modelos de mielinización. Después del contacto de una prolongación oligodendroglial con un axón (A), el borde de ésta podría extenderse a lo largo del axón en forma de lámina (B) y luego moverse debajo de sí mismo (C) para formar las múltiples capas de la vaina de mielina madura (G). Alternativamente, el borde de la prolongación podría envolverse alrededor del axón (D), y una vez que se haya formado el número apropiado de vueltas, se extiende lateralmente (E, F) para concluir la formación de la vaina. H representa una sección longitudinal a través de un axón mielinizado, que detalla las diferentes capas de la vaina de mielina. Tomada de Bauer et al., (2009)⁽⁴¹⁾.

Otro modelo sugiere que el borde de la prolongación permanece compacto y únicamente cuando un número suficiente de envolturas se han generado alrededor del axón, se extiende lateralmente en láminas superpuestas (Figura 8 D-F). Estas dos teorías no son mutuamente exclusivas y podría existir algún mecanismo intermedio. Ambos modelos demuestran claramente la necesidad de los cambios morfológicos de los oligodendrocitos que subyace a la formación de la vaina de mielina⁽⁴¹⁾.

Cualquiera que sea el mecanismo, la subsecuente fase de compactación es la parte más importante en la formación de la vaina de mielina, porque involucra la extrusión tanto del citoplasma como del líquido extracelular que queda entre las láminas de membrana e involucra la interconexión de las láminas intracelular y extracelular mediante la interacción de proteínas especializadas, es por lo tanto responsable de la función de aislamiento altamente específica de la vaina de mielina⁽⁴¹⁾. Los eventos morfológicos y moleculares de la extrusión del citoplasma no se conocen completamente.

El proceso de formación de mielina es parte del neurodesarrollo. En roedores comienza aproximadamente al nacer y es completada cerca de los dos meses después del nacimiento. En humanos, la mielinización comienza durante la segunda mitad de la vida fetal y continúa hasta aproximadamente los 20 años de edad⁽¹⁴⁾, lo que coincide con el periodo en el que la corteza cerebral humana se somete a una remodelación masiva de las conexiones sinápticas⁽²⁷⁾.

La mielinización de las regiones apropiadas del cerebro coincide con el desarrollo de funciones cognitivas específicas^(42,43), como la lectura⁽⁴⁴⁾, el desarrollo del vocabulario⁽⁴⁵⁾ y la eficiencia en la toma de decisiones^(9,46). En concordancia con lo anterior, se han descrito diferencias en la estructura de la materia blanca correlacionadas con diferencias individuales en el desarrollo cognitivo normal⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾, en el coeficiente intelectual (I.Q.)^(49,50), la habilidad de lectura⁽⁵¹⁻⁵³⁾, la memoria^(51,54) y la competencia musical^(55,56). Además, se ha demostrado que el aprendizaje de habilidades complejas, como tocar el piano, se acompañan de un incremento en la organización de la estructura de la materia blanca en los tractos cerebrales involucrados con el trabajo musical^(27,55).

La mielinización procede típicamente en una dirección caudal a rostral⁽⁵⁷⁾. En los humanos, los nervios periféricos y el puente troncoencefálico están bien mielinizados desde el nacimiento⁽⁵⁸⁾. A los 6 meses, el genu del cuerpo calloso es mielinizado y entre los 8 y 12 meses, la mielinización tiene lugar en los lóbulos frontales, parietales y occipitales. El volumen de la materia blanca se incrementa progresivamente aproximadamente un 12% de los 4 a los 22 años de edad, y en la corteza prefrontal la mielinización es completada únicamente en la adolescencia/ adultez temprana^(59,60). En comparación, algunos estudios han revelado que la mielinización en las ratas parece

comenzar en las regiones caudal y el tronco cerebral y procede al cerebro anterior, lo que involucra las regiones mediales antes de las laterales, como en los humanos⁽⁵⁷⁾.

3.3.1 Padecimientos desmielinizantes y dismielinizantes

Cambios en la integridad de la mielina pueden producir deficiencia y/o desincronización en la conducción del impulso nervioso entre regiones distales, lo que puede manifestarse clínicamente como parálisis, disfunción sensorial-motora, daño cognitivo, retraso mental o incluso la muerte. La mielina puede ser dañada por enfermedades autoinmunes, como en el síndrome de Guillain-Barré en el SNP y la esclerosis múltiple (EM) en el SNC⁽²⁷⁾.

Las enfermedades desmielinizantes son aquellas en la que existe un proceso patológico dirigido contra la mielina sana y pueden clasificarse en primarias como la EM y alteraciones en la mielina secundarias a otras causas como la encefalopatía postanóxica tardía o la desmielinización osmótica. En contraste, las enfermedades dismielinizantes o leucodistrofias son aquellas en las que hay una formación inadecuada de la mielina⁽⁶¹⁾ o, como sucede en las adrenoleucodistrofias, hay una afectación de los mecanismos moleculares para mantenerla⁽⁶²⁾.

Existen otros padecimientos que afectan la mielina: de origen infeccioso (leucoencefalopatía multifocal progresiva), tóxico-metabólico (intoxicación por monóxido de carbono, déficit de vitamina B12, intoxicación por mercurio, ambliopía, alcohol, tabaco, desmielinización osmótica, síndrome de Marchiafava-Bignami, hipoxia, radiación), vascular (enfermedad de Binswanger) y paraneoplásico (encefalitis límbica, degeneración cerebelosa, síndrome opsoclono-mioclono)^(63,64).

A su vez, en múltiples padecimientos neuropsiquiátricos los pacientes presentan diferencias estructurales en tractos de la materia blanca o anomalías en los genes de las proteínas que conforman la mielina, entre ellas la dislexia, el trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH), la depresión, el trastorno bipolar, algunos trastornos del lenguaje como el tartamudeo, el autismo, el trastorno obsesivo compulsivo (TOC), el trastorno por estrés postraumático, deficiencia cognitiva en la Enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Tourette, la esquizofrenia y varios trastornos idiosincráticos como

amusia congénita (*tone deafness*) y la mitomanía⁽²⁷⁾. Mediante imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) se revela la pérdida de materia blanca subcortical en pacientes con esquizofrenia, depresión y trastorno bipolar⁽²⁰⁾. También algunos polimorfismos de varios genes de mielina han emergido como factores de riesgo inesperados para la esquizofrenia^(65,66), la depresión⁽⁶⁶⁾ y el TOC⁽⁶⁷⁾.

Dada la relación funcional entre la mielina y los axones, las enfermedades desmielinizantes son también neurodegenerativas, progresivas y crónicas, con consecuencias devastadoras para los pacientes, quienes pierden sus funciones básicas y con ello su calidad de vida. Estas enfermedades a la fecha no tienen cura, por lo que el entendimiento de la biología y fisiología de los OLGs y sus interacciones con las neuronas y con otras células gliales, así como los factores que intervienen en la regulación del proceso de mielinización tiene implicaciones importantes tanto para dilucidar la fisiopatología de los padecimientos antes mencionados como para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas.

3.3.2 Plasticidad de la mielina: remodelación y remielinización

La plasticidad de la mielina se refiere a la respuesta de las células con capacidad mielinizante (o sus precursoras) ante la actividad neuronal. La mielina puede ser remodelada por mecanismos dependientes de la actividad neuronal y la experiencia. Por lo tanto se considera que la mielinización es un proceso dinámico, sujeto a remodelación y a reparación en caso de daño (remielinización), además de ser un proceso adaptativo⁽⁶⁸⁾.

Una pérdida focal de mielina en el cerebro adulto es seguida por la remielinización; esta plasticidad puede reflejar la función reparadora del cerebro adulto⁽²⁰⁾. Las células OPCs son consideradas como una fuente de remielinización en enfermedades desmielinizantes⁽¹⁴⁾. En experimentos con modelos animales de desmielinización, los OPCs que expresan el marcador NG2 son las células que proliferan y migran hacia los sitios de lesión y se diferencian en nuevos oligodendrocitos capaces de remielinizar. Al considerar la capacidad del sistema nervioso para la remielinización, un parámetro crítico es la proporción de OPCs que se diferencian a OLGs maduros, debido a que esto podría

determinar el número de divisiones celulares que necesita atravesar un progenitor para el mantenimiento del número de células oligodendrogiales⁽⁴⁾. Como se mencionó anteriormente, la generación de estos OLGs diferenciados y la formación de mielina se ven influenciados tanto durante el desarrollo como en la edad adulta por la experiencia y los niveles de actividad neuronal. Esto condujo al concepto de mielinización adaptativa, donde los cambios continuos de la mielina en función de la actividad representan una forma de plasticidad neuronal y refinamiento del funcionamiento de los circuitos neuronales⁽⁶⁹⁾.

La plasticidad de la mielina puede ocurrir a través de diferentes rutas. Puede ocurrir la mielinización *de novo* en segmentos previamente no mielinizados o se pueden reemplazar los segmentos de mielina retraídos o dañados de OLGs preexistentes, también se puede llevar a cabo un aumento del grosor o adelgazamiento así como cambios en la compactación de la vaina de mielina, el alargamiento o acortamiento de los internodos existentes, así como cambios adaptativos en la estructura de los nodos de Ranvier (figura 9)⁽⁷⁰⁾.

En este aspecto, se ha observado que durante la remielinización, el proceso de oligodendrogénesis es necesario y crítico⁽⁷¹⁾. Por esa razón es de suma importancia entender cómo se lleva a cabo este proceso en condiciones fisiológicas.

3.4 Mecanismos de regulación del proceso de mielinización

Los OPCs se distribuyen de manera ubicua en el SNC; estos originalmente derivan en forma más o menos equilibrada de todas las partes de las zonas germinales embrionarias, las llamadas zonas ventriculares⁽⁷²⁾. En la médula espinal los OPCs se originan de las regiones ventrales del tubo neural, en el nervio óptico éstos migran hacia el nervio desde el tercer ventrículo⁽¹⁴⁾, y migran como precursores hasta su lugar de destino donde se diferencian en OLGs maduros con capacidad de iniciar el proceso de mielinización⁽⁷³⁾.

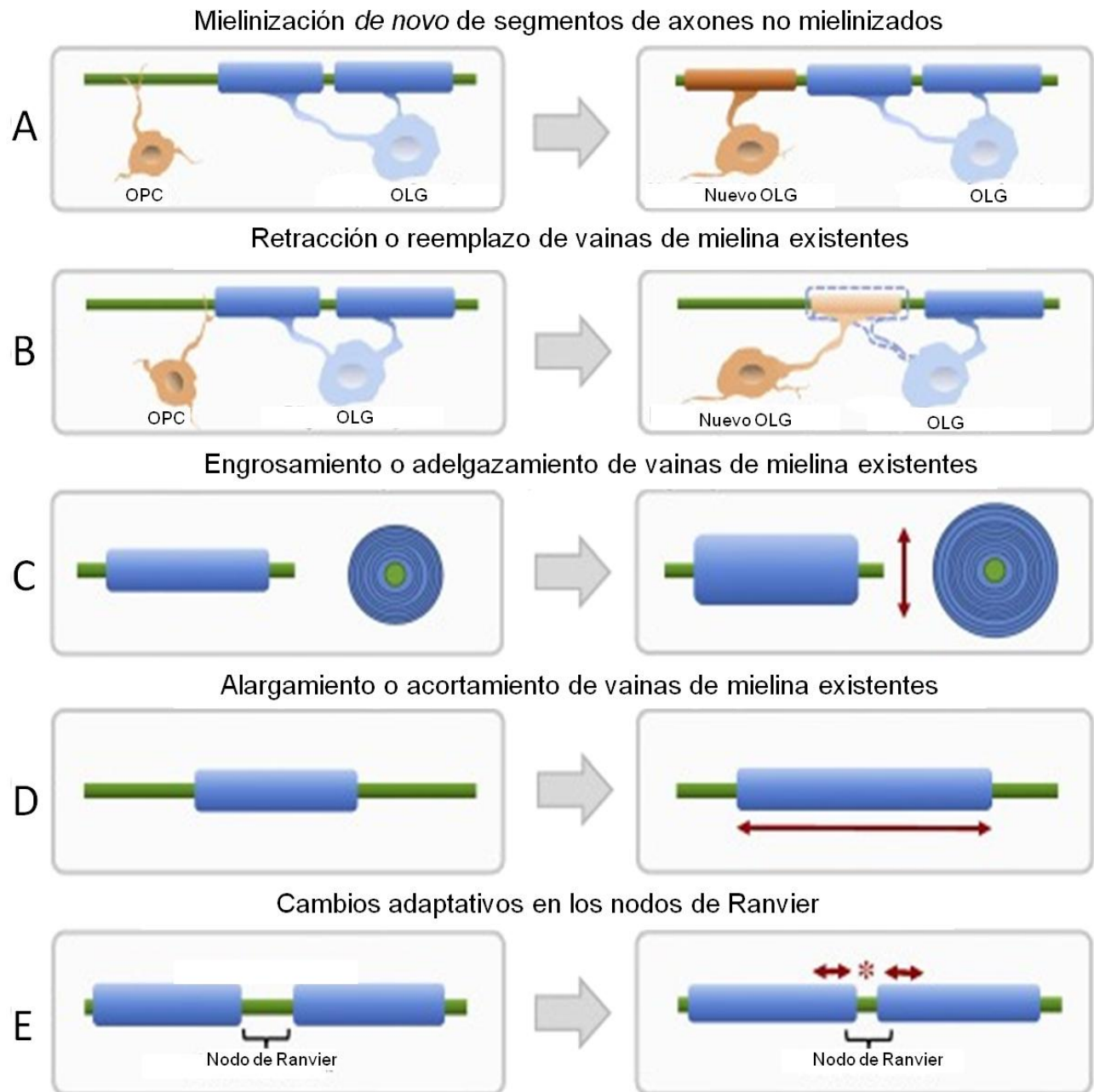


Figura 9. Plasticidad de la mielina. Los axones (verde) en el SNC envueltos por segmentos de mielina (azul) pueden tener diferentes cambios dinámicos en la mielinización durante la edad adulta. (A) La mielinización *de novo* (segmento naranja) puede ocurrir en segmentos previamente no mielinizados o (B) la mielina puede ser reemplazada si la formada por OLGs preexistentes está dañada. Además, OLGs preexistentes pueden ajustar parámetros de la vaina de mielina para modificar la velocidad de la conducción nerviosa. Así la remodelación de la mielina puede ser lograda mediante cambios en el grosor (C), o en la longitud de los segmentos de mielina (D). Adicionalmente se ha sugerido que puede haber cambios adaptativos en los nodos de Ranvier como otro mecanismo para sincronizar el transporte de información en el SNC (E). Modificado de Kaller et al., 2017⁽⁷⁰⁾.

Tanto las neuronas como los diversos tipos de células de la macroglía del SNC maduro son generadas a partir de un grupo homogéneo de células precursoras en regiones ventrales del tubo neural embrionario, los llamados precursores neuroepiteliales (neural epithelial precursor, NEPs). En estadios tempranos, los NEPs son multipotenciales con la capacidad de generar todos los tipos de neuronas y macroglía en el SNC; con el tiempo, su potencialidad es restringida por exposición a señales microambientales⁽⁷²⁾. En general, la gliogénesis ocurre después de la generación de neuronas durante el desarrollo embrionario^(72,74), sin embargo, también se ha sugerido que el destino de la glía podría especificarse tan pronto como el destino de las células neuronales⁽⁷⁴⁾. A diferencia de las neuronas, que pierden la capacidad de proliferación poco después de que se especifican, los precursores de OLGs se especifican inicialmente como células migratorias proliferativas. Estas OPCs no se encuentran únicamente en el cerebro en desarrollo si no también en el cerebro adulto^(4,14,72).

En el proceso de oligodendrogénesis, las células progenitoras deben especificarse, proliferar, migrar de las zonas germinales a la materia blanca y finalmente diferenciarse de su estadio de precursor al OLG inmaduro y después al OLG maduro con capacidad mielinizante^(64,75). Durante la migración, los OPCs extienden múltiples prolongaciones mediante las que exploran el microambiente celular y, según la retroalimentación recibida a través de factores solubles o mediante contacto celular, los OPCs pueden continuar su migración, proliferar o diferenciarse e iniciar el proceso de mielinización⁽⁷³⁾. Además, los OPCs son capaces de migrar hacia regiones de demanda para reemplazar células dañadas o muertas⁽⁷⁶⁾.

La proliferación y diferenciación de las OPCs es regulada por factores de crecimiento liberados predominantemente por las neuronas y los astrocitos, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (platelet-derived growth factor, PDGF), el factor de crecimiento básico de fibroblastos (basic fibroblast growth factor, bFGF) y el factor neurotrófico derivado de cerebro (brain-derived neurotrophic factor, BDNF)^(64,77). Además, hay evidencia de que la insulina y el factor de crecimiento insulínico (insulin-like growth factor, IGF-1) son potentes reguladores del desarrollo oligodendroglial. En los OPCs están presentes tanto los receptores de insulina como los del IGF-1. En cultivo, el

IGF-1 incrementa la proliferación de los OPCs e incrementa el número de OLGs maduros con marcaje positivo a GalC, posiblemente porque este factor inhibe la apoptosis⁽⁶⁴⁾.

Se ha demostrado que tanto el PDGF como el bFGF inducen la proliferación de las OPCs, el crecimiento de las prolongaciones primarias y la migración celular de manera Ca^{2+} -dependiente⁽⁴¹⁾. En OPCs el PDGF α actúa como un mitógeno, un factor de diferenciación e incrementa la sobrevivencia. En OLGs maduros, el efecto mitogénico del PDGF α deja de expresarse, sin embargo el efecto de supervivencia permanece, lo que sugiere que bajos niveles de PDGF α son suficientes para la sobrevivencia pero no para inducir la proliferación⁽⁶⁴⁾.

Por otro lado, el factor de crecimiento de hepatocitos (hepatocyte growth factor, HGF) y el factor de crecimiento glial (glial growth factor, GGF) -también denominado neuregulina 1 tipo II-, son mitogénicos e inhiben la diferenciación^(41,64,78). Juntos, estos factores de crecimiento están involucrados en la regulación del citoesqueleto oligodendroglial durante la proliferación de estas células, en estadios tempranos de migración, en el crecimiento de prolongaciones y en el establecimiento de contactos con axones; pero están poco involucrados en el envolvimiento de los axones y la compactación de la vaina de mielina en desarrollo^(41,64).

Por otro lado, los axones promueven la proliferación de las OPCs, ya que según el número (y longitud) de los axones se establece el número de OLGs con capacidad mielinizante necesarios para la mielinización. Además se sabe que las neuronas liberan PDGF y otros mitógenos^(79,80).

En contraste con los factores de crecimiento, el microambiente generado por la matriz extracelular (ECM) de los OLGs que se preparan para la mielinización juega un papel importante en las vías de transducción de señales intracelulares y la regulación del citoesqueleto. Se sabe que la ECM estimula la proliferación y migración de los OPCs⁽⁶⁴⁾ y está constituida de varios tipos de proteínas, entre ellas fibronectina, vitronectina, colágeno y laminina⁽⁸¹⁻⁸³⁾. Además, de forma intrínseca controlan el número de OLGs necesarios para la mielinización; los OLGs producidos en exceso son eliminados por apoptosis⁽¹⁴⁾.

Se ha sugerido que el número de veces que un OPC se divide antes de su diferenciación es controlada por un sistema de reloj biológico⁽⁶⁴⁾. Este mecanismo de reloj consiste en dos componentes: un componente de conteo del tiempo o las divisiones celulares y un componente efector que detiene la proliferación celular. El mecanismo contador está compuesto por proteínas mitogénicas hidrófilas, como la hormona tiroidea, glucocorticoides y ácido retinoico, que activan receptores intracelulares⁽⁸⁴⁾. Estas señales desencadenan el componente efector del reloj una vez que el componente del conteo llega a determinado tiempo, lo que detiene la división celular y como consecuencia la diferenciación procede⁽⁸⁵⁾.

El número final de OLGs en cualquier región del SNC depende del número de precursores que migran hasta ahí, del número de veces que el precursor se divide antes de su diferenciación y del número de OLGs y OPCs que se somete a muerte celular en la región⁽⁸⁶⁾. En cultivo de células de linaje oligodendroglial de nervio óptico se ha observado que las células precursoras cultivadas de forma individual en ausencia de mitógenos o en altas densidades sin mitógenos u otros linajes celulares, se detiene inmediatamente la división y se diferencian prematuramente a OLGs, lo que sugiere que la proliferación de las OPCs depende de señales provenientes de otras células^(87,88).

Los estadios de diferenciación y maduración que atraviesan las OPCs son identificables con base en su capacidad proliferativa y migratoria, el incremento dramático en su complejidad morfológica y la expresión diferencial de marcadores antigénicos específicos antes de su asociación final con los axones y el inicio de la mielinización⁽⁷²⁾.

La proliferación y migración de las células gliales es un proceso esencialmente prenatal, mientras que la diferenciación y maduración se llevan a cabo durante toda la infancia⁽³⁹⁾. El origen y diferenciación de los OLGs ha sido estudiada extensamente en modelos animales, y está bien documentada especialmente en roedores⁽⁷¹⁾. Sin embargo, en humanos, únicamente pocos estudios han evaluado el desarrollo temporal de los OLGs⁽³⁹⁾. La mayoría de los autores dividen los estadios de maduración de los OLGs en cuatro diferentes etapas: células precursoras de oligodendrocitos (OPCs), pre-oligodendrocitos (u OPCs tardíos), OLGs inmaduros o pre-mielinizantes y OLGs maduros o mielinizantes⁽³⁹⁾ (figura 10).

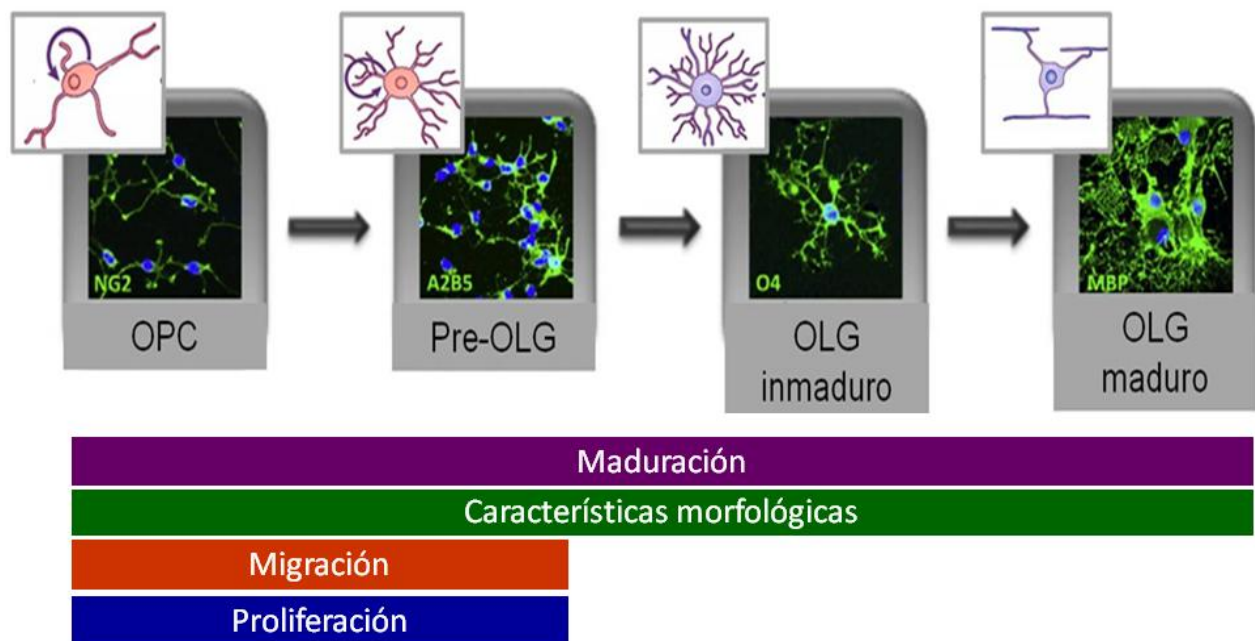


Figura 10. Esquema de las cuatro etapas de maduración oligodendroglial. Los estadios de células progenitoras de oligodendrocitos, pre-oligodendrocitos, oligodendrocitos inmaduros y oligodendrocitos maduros son identificables de acuerdo con el incremento en su complejidad morfológica, la expresión diferencial de marcadores moleculares y la capacidad de proliferar y migrar o de diferenciarse y madurar. Modificada de Barateiro & Fernandes, 2014⁽³⁹⁾.

Los primeros OPCs son observados en el encéfalo seguido de grandes cantidades de OPCs en las eminencias ganglionares, la zona ventricular cortical y la zona subventricular^(39,71). Estas células tienen una morfología uni- o bipolar con prolongaciones cortas que emanan por lo general de los polos de las células^(39,89) y son caracterizados por la expresión del receptor de PDGF α (PDGFR α)⁽⁹⁰⁾. Este receptor está presente únicamente en células en las que el linaje oligodendroglial se ha especificado y es probablemente el marcador de mayor confianza de los precursores de oligodendrocitos *in vivo*⁽⁶⁴⁾.

Posteriormente aparecen los pre-oligodendrocitos que junto con los OPCs son los estadios predominantes de OLGs que expresan el proteoglicano de sulfato de condroitina (NG2), aunque también se encuentran en menor cantidad en OLGs inmaduros^(39,91). En el SNC, el NG2 se expresa en los OPCs, pero no en otros tipos de células progenitoras neurales. El NG2 es una proteína membranal que cumple múltiples funciones en el SNC

como la señalización intracelular dentro del OPC, con efectos en la migración e interacción con el citoesqueleto. Además se ha reportado recientemente que la región extracelular del NG2, aparte de su función de adhesión, actúa como un componente de la ECM con la capacidad de alterar las propiedades de redes neuronales definidas⁽⁹²⁾. PDGFR α y NG2 co-localizan tanto *in vitro* como *in vivo* y son regulados a la baja en la diferenciación por lo que no se encuentran en OLGs maduros⁽⁶⁴⁾.

Otras moléculas que se expresan en OPCs son el factor transcripcional Olig2 y el gangliósido A2B5^(14,39,93). La proteína Olig2 conserva su expresión incluso después de que los OPCs se diferencian en oligodendrocitos maduros⁽⁹⁴⁾.

Durante la diferenciación, los OPCs dan lugar a pre-oligodendrocitos que extienden múltiples prolongaciones cortas y empiezan a expresar la sulfatida reconocida por el anticuerpo O4⁽⁹⁵⁾ y la proteína GPR17⁽⁹⁶⁾, que persiste hasta el estadio de OLG inmaduro⁽³⁹⁾. La expresión de los marcadores A2B5 y NG2 se pierde gradualmente y los OLGs inmaduros continúan con la expresión de glicoproteínas de membrana como el galactocerebrósido C (GalC) o el galactocerebrósido O1^(71,74). En este punto, los OLGs se han vuelto células post-mitóticas con prolongaciones multipolares largas y ramificadas, y están comprometidos con el linaje oligodendroglial^(39,97).

Cuando los OLGs maduran adquieren una forma redonda con prolongaciones complejas multipolares que extienden membranas que pueden formar la vaina de mielina alrededor de los axones^(14,74,93). Alrededor de las 30 semanas de gestación humana, las células que expresan O4 aumentan y muestran una compleja morfología multipolar; éstas se observan sobre todo en la materia blanca cerebral más profunda, son escasamente distribuidas en la materia blanca superficial y no son detectadas en la corteza cerebral^(91,98,99). Esta transformación morfológica corresponde al desarrollo y a la conversión funcional de un progenitor en un OLG y está determinada por la expresión ordenada de proteínas de mielina. Las principales proteínas de mielina que son las primeras en expresarse con niveles detectables son la proteína básica de mielina (MBP, myelin basic protein), la proteína proteolipídica (PLP: proteolipidic protein), la glicoproteína asociada a mielina (MAG, myelin-associated glycoprotein) y finalmente la

glicoproteína oligodendrocítica de mielina (MOG: myelin oligodendrocytic protein)^(14,71,74,100).

Las primeras células que expresan MBP son observadas entre las 20 y 28 semanas de gestación en regiones subcorticales, pero son únicamente visualizadas extensamente entre las 36 y 40 semanas, con un incremento de materia blanca mielinizada de 1 a 5% del volumen total del cerebro^(91,98,99). Las proteínas MBP y PLP, están localizadas exclusivamente en las prolongaciones donde forman las vainas de mielina, excepto durante el periodo de mielinización o en condiciones patológicas en las cuales estas proteínas se acumulan en los cuerpos celulares^(74,101).

La enzima CNPasa (2,3-nucleótido cíclico 3'-fosfodiesterasa) es una de las proteínas específicas de expresión temprana implicada en la biogénesis de la mielina y se encuentra en la mielina no compacta en OLGs maduros⁽¹⁰²⁾. Esta proteína es capaz de unirse al ARN y a la tubulina y contribuir a la dinámica de la formación de prolongaciones y ramificaciones *in vitro*^(102,103). Como la PLP, la CNPasa no es esencial para la mielinización, pero es requerida para la integridad axonal⁽²⁰⁾. Estudios en los que se utilizan marcadores específicos para los tipos celulares como la CNPasa o los factores transcripcionales Olig1 y Olig2 demuestran que la ruta celular hacia el destino oligodendroglial es especificado tempranamente en el día embrionario (E) 10-12.5 en roedores; tiempo en el que se lleva a cabo la neurogénesis⁽⁷⁴⁾.

A diferencia del humano, en roedores (rata y ratón) se presenta la primera señal de OPCs alrededor del E9.5 en el telencéfalo⁽³⁹⁾. En el día postnatal (P) 2, tanto las ratas como los ratones presentan pre-oligodendrocitos como el estadio predominante de OLGs en la materia blanca cerebral, con una menor población de OLGs inmaduros. En P7, la materia blanca contiene más del 80% de OLGs inmaduros que tienen potencial para el inicio de la mielinización⁽¹⁰⁴⁾.

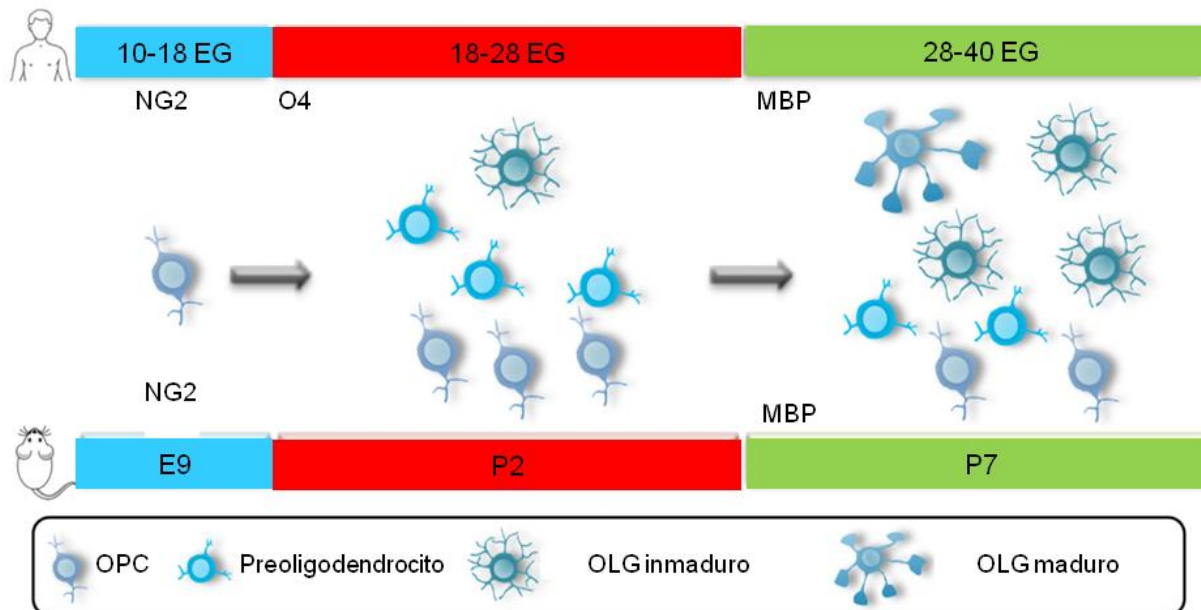


Figura 11. Progresión del linaje oligodendroglial en la materia blanca cerebral en humanos y roedores. Los OPCs (NG2+) aparecen entre la semana de edad gestacional (EG) 10 y 18 en humanos y alrededor del día embrionario (E) 9 en roedores. En el día postnatal (P) 2 de roedores hay OPCs, preoligodendrocitos y una menor cantidad de oligodendrocitos (O4+) de forma similar que los humanos entre las 18 y 28 EG. En el día P7 de roedores se observa similitud con los humanos entre las 28 y 40 EG con predominancia de oligodendrocitos inmaduros y un aumento progresivo de oligodendrocitos maduros que expresan proteína básica de mielina (MBP). Modificada de Barateiro, Brites & Fernandes, 2016⁽¹⁰⁵⁾.

Al comparar la progresión del linaje oligodendroglial en la materia blanca cerebral de roedores y humanos (Figura 11), se observa similitud en la proporción alta de preoligodendrocitos y pocos OLGs inmaduros en el día P2 y alrededor de 18-27 semanas de gestación humana, respectivamente. Más tarde, en P7, la materia blanca de roedores presenta un estado de maduración similar al observado en humanos entre las semanas 30-36 de gestación^(39,91). Finalmente, las primeras células que expresan MBP son observadas alrededor del día P7 en ratones y se vuelve más abundante en P14 tanto en cerebro de rata y ratón^(39,101,106), de forma similar a la extensión de la mielinización en algunos infantes a término⁽⁹⁸⁾.

Los estadios de maduración que atraviesa el OLG revelan la importancia de la compleja morfología de estas células y su asociación íntima a su funcionalidad, ya que son las prolongaciones de los OLGs las responsables de la formación y mantenimiento de la vaina de mielina alrededor de los axones en el SNC⁽³⁾. La generación y el mantenimiento de esta morfología compleja requiere el rearrreglo dinámico del citoesqueleto oligodendroglial.

3.4.1 Participación del citoesqueleto en la oligodendrogénesis

El citoesqueleto de los OLGs está compuesto por microtúbulos y microfilamentos, pero está desprovisto de filamentos intermedios, a pesar de que los progenitores oligodendrogliales han mostrado tener vimentina⁽¹⁹⁾.

Los elementos del citoesqueleto llevan a cabo distintas funciones en los OLGs. Mientras que los microfilamentos median el crecimiento de procesos primarios y la estabilidad básica de la célula como consecuencia de su localización intermedia debajo de la membrana plasmática, los microtúbulos soportan la arquitectura de la célula y proporcionan una mayor estabilidad mecánica a los procesos. Ambos sirven como vías de transporte para organelos celulares, vesículas, proteínas, y gránulos de ARNm, que son transportados a lo largo de los microtúbulos y microfilamentos por proteínas motoras como las cinecinas, dineínas y la miosina^(19,41,107).

Tanto los microtúbulos como los microfilamentos son polímeros polarizados constituidos por distintas subunidades proteicas. Los microtúbulos están formados por subunidades heterodiméricas de tubulina- α y - β , que se ensamblan paralelamente para formar su estructura característica de cilindro hueco. Los microfilamentos están constituidos por actina, que puede encontrarse en la célula en dos conformaciones: en forma globular o monomérica (actina G) o filamentosa o polimerizada (actina F). A partir de dos monómeros de actina se forma un dímero y tras la unión de otro monómero se forma el trímero, que es la unidad estable a partir de la cual se forma un filamento⁽²⁶⁾.

Dado que los protofilamentos de los microtúbulos están alineados en paralelo con la misma polaridad, los microtúbulos son estructuras polares. El extremo “más” (*plus-end* o extremo libre) es capaz de polimerizarse a gran velocidad mientras que el extremo “menos” (*minus-end*) tiene tendencia a despolimerizarse si no está estabilizado. Esta estabilidad es conferida en la mayoría de las células animales por la unión con el centrosoma. Para que se lleve a cabo la despolimerización (inestabilidad dinámica de los microtúbulos) se necesita un aporte de energía que proviene de la hidrólisis de GTP (trifosfato de guanosa). El GTP se une a la subunidad de tubulina- α de la molécula de tubulina heterodimérica y cuando la molécula de tubulina se incorpora al extremo de un microtúbulo, esta molécula de GTP es hidrolizada a GDP (difosfato de guanosa), lo que debilita las uniones entre las subunidades de tubulina lo que conlleva a la despolimerización⁽¹⁰⁸⁾.

Después de su polimerización las subunidades de tubulina- α pueden ser modificadas covalentemente mediante acetilación en el residuo de lisina 40 (K40) y la eliminación de un residuo de tirosina (destirosinación) del extremo carboxilo terminal de la tubulina- α . Estas reacciones enzimáticas se revierten cuando la molécula de tubulina se despolimeriza. La acetilación de tubulina proporciona un indicio útil de la estabilidad de los microtúbulos⁽¹⁰⁸⁾, mientras que la destirosinación es un marcador de longevidad de los microtúbulos, ya que se ha visto *in vivo* que los microtúbulos que conservan el residuo de tirosina experimentan renovación en minutos mientras que aquellos microtúbulos en los que se llevo a cabo un proceso de destirosinación pueden permanecer así incluso horas^(109,110).

Otras modificaciones postraduccionales que puede presentar la tubulina tanto α como β son fosforilación, poliglutaminación y poliglicosidación. En los OLGs se ha reportado tubulina- α tirosinada en el cuerpo celular y en los procesos cortos y largos. La tubulina- α acetilada se distribuye de manera similar pero no está presente en la parte distal de los procesos^(19,41), mientras que la tubulina- α tirosinada sí se encuentra en las regiones distales⁽⁹³⁾.

La acetilación de tubulina- α está correlacionada con la estabilidad de los procesos en los OLGs en estadio maduro⁽⁹³⁾. Para incrementar la dinámica de los microtúbulos necesaria

en las etapas iniciales de la diferenciación oligodendroglial la tubulina debe estar desacetilada, proceso que es mediado por el silenciador de la información tipo 2 (SIRT2) que se expresa en los OLGs y se localiza principalmente en las prolongaciones oligodendrogliales, en regiones con alta flexibilidad de microtúbulos y de alta rotación (inestabilidad dinámica). Mientras que esta enzima desacetilasa está presente en el citoplasma de las capas de mielina no compacta, ésta no se encuentra en láminas de mielina compacta y se ha asumido que está involucrada en la remodelación substancial del citoesqueleto requerido para la compactación de la mielina^(111,112). La expresión de SIRT2 se relaciona con cambios morfológicos significativos y con prolongaciones altamente ramificadas. En conjunto con la expresión incrementada de la CNPasa constituye un indicativo de que las células entran en un estadio de premielinización^(41,112).

También se ha reportado recientemente que los OLGs expresan una isoforma específica de tubulina- β , denominada tubulina- β_{IV} , la cual no se ha encontrado en ningún otro tipo de célula del SNC. Esta proteína se distribuye en las prolongaciones proximales de OLGs premielinizantes y en prolongaciones distales de células mielinizantes. La expresión de una isoforma especializada de tubulina enfatiza la importancia del citoesqueleto oligodendroglial durante los diferentes estadios de maduración relacionados con su capacidad mielinizante⁽¹¹³⁾.

Al igual que los microtúbulos el microfilamento de actina es una estructura polar, con dos extremos estructuralmente distintos: un extremo negativo (-) relativamente inerte y de crecimiento lento y un extremo positivo (+) de crecimiento rápido.

En la polimerización, los monómeros de actina-G se unen al nucleótido ATP (trifosfato de adenosina). El polímero de actina-F despliega un extremo positivo y un extremo negativo y crece asimétricamente ya que el extremo positivo crece más rápido que el extremo negativo durante la fase de elongación. La hidrólisis de ATP a ADP (difosfato de adenosina) confiere inestabilidad a la actina que da pie para la despolarización. Para evitar la despolarización ocurre el proceso denominado "trampa de ATP", que consiste en el acomodo consecutivo de una molécula de actina-G sobre la zona "de escape" del ATP⁽¹⁰⁸⁾.

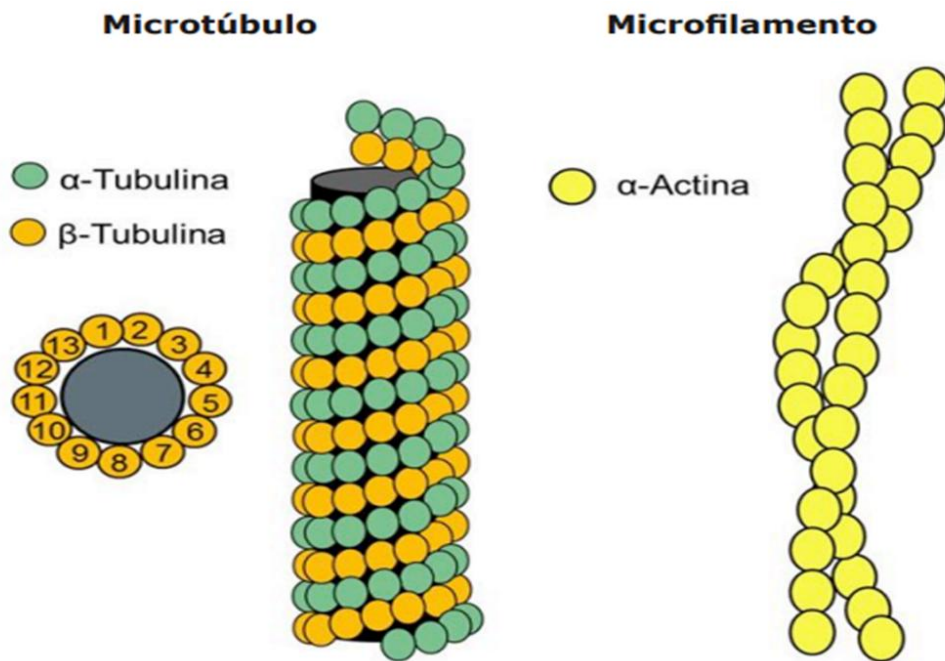


Figura 12. Esquema representativo de los componentes del citoesqueleto oligodendroglial. Los microtúbulos son cilindros huecos formados por dímeros de α - y β - tubulina. Los microfilamentos, polímeros de actina, son flexibles y se localizan principalmente en la parte cortical de la célula. Imagen tomada de Calderón Salinas, 2016⁽¹¹⁴⁾.

Durante el desarrollo de los OLGs, los microtúbulos se acomodan en un grupo denso de haces dentro de las prolongaciones, los cuales se liberan en la región inmediata proximal a los bordes delanteros de los mismos. En estas regiones los microtúbulos se separan y se extienden en los dominios ricos en microfilamentos, sin llegar a la región más distal del borde delantero⁽⁹³⁾ (figura 13).

Los microtúbulos en las prolongaciones están acomodados en filamentos paralelos al eje principal mientras que en el cuerpo celular forman un patrón en forma de malla en todo el citoplasma. Así mismo, la orientación de los microtúbulos es uniforme en las prolongaciones oligodendrogliales cortas y no uniforme en las más largas⁽¹⁹⁾.

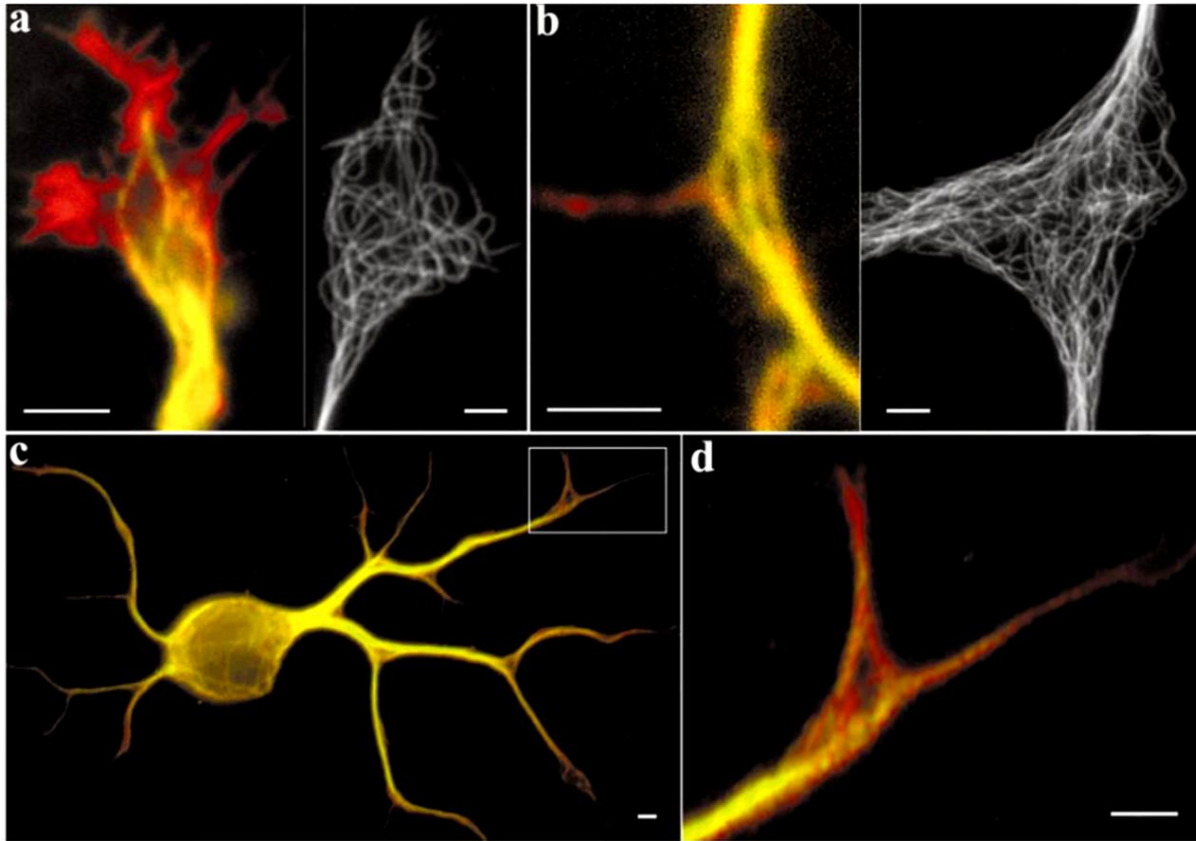


Figura 13. Organización y composición de los microtúbulos en los bordes delanteros y sitios de formación de ramificaciones. (a, b) Los microfilamentos (rojo) y microtúbulos (verde) en oligodendrocitos (OLGs) de 2 días *in vitro* (DIV). Los microtúbulos agrupados en las prolongaciones se destensan a medida que se acercan al borde de la prolongación (a) o a los sitios de formación de ramificaciones (b); (c, d) los microtúbulos en el borde de las prolongaciones y en las nuevas ramificaciones de OLGs (2 DIV) están enriquecidas con tubulina tiosinada (rojo), comparando con microtúbulos primarios acetilados (verde) en la porción central de procesos estables. Los microtúbulos aparecen amarillos cuando la tubulina tiosinada y acetilada co-localizan. Barra 5 μm . Tomada de Song et al., 2001⁽⁹³⁾,

Por su parte, los microfilamentos se distribuyen en todas las regiones de los OLGs durante su desarrollo y su orientación general dentro de la célula es aleatoria, densa y en forma de malla cortical tridimensional rígida, localizada directamente debajo de la membrana plasmática⁽⁹³⁾. En los OLGs, los microfilamentos están concentrados particularmente en los bordes delanteros de las prolongaciones y en el área donde se forman nuevas ramificaciones. En cambio, en los OPCs los microfilamentos y los microtúbulos se encuentran en el cuerpo celular y las prolongaciones, pero notablemente, los microtúbulos no se extienden a las partes más distales de los bordes delanteros donde los microfilamentos están presentes. Mientras que en OLGs inmaduros los

microfilamentos se encuentran en los bordes delanteros y los sitios de derivación (formación de ramificaciones) (Figura 14)⁽⁹³⁾.

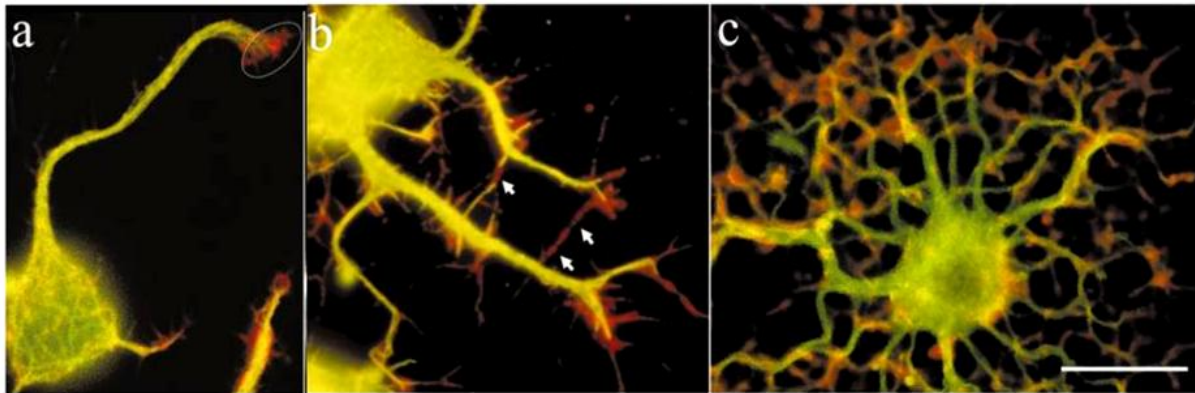


Figura 14. Distribución de microfilamentos y microtúbulos en el desarrollo oligodendroglial. Tinción doble (microfilamentos en rojo y microtúbulos en verde) de la célula precursora de oligodendrocitos. (a) Después de 24h de cultivo se observaron los microfilamentos en el cuerpo celular y en las prolongaciones, así como en los bordes distales de las mismas (círculo). Los microtúbulos se visualizaron en las mismas estructuras, pero no se extendieron hasta a la región más distal. (b) A las 36h, los microfilamentos se observaron en nuevas conexiones que se formaron entre las prolongaciones de la célula (flechas). (c) En OLGs maduros (7 días in vitro) también se observó el patrón antes mencionado. Barra = 50 μ m. Tomada y editada de Song et al., 2001⁽⁹³⁾.

Los microfilamentos juegan un papel clave en el crecimiento de las pequeñas protrusiones membranales que anteceden al desarrollo de las prolongaciones. Estas protrusiones se forman por la polimerización y el ensanchamiento de filamentos simples que resulta en la generación de filopodios y lamelipodios. Los filopodios son estructuras estrechas formadas por haces de actina, con sus extremos positivos orientados hacia la membrana, mientras que los lamelipodios son más amplios y contienen redes de actina dispuestas en forma ortogonal⁽¹¹⁵⁾. Estudios sugieren que los filopodios se forman primero y tras su ensanchamiento se convierten en lamelipodios por subdivisión de los microfilamentos, de esta manera empujan hacia afuera los bordes frontales de los procesos oligodendrogliales^(41,93).

A su vez, distintas proteínas interactúan con el citoesqueleto oligodendroglial, cuya localización subcelular y expresión en el OLG pueden ser un indicativo del estadio de maduración y de estabilización de la célula. Las proteínas específicas de mielina MBP y MOG, entre otras, están estrechamente asociadas con el citoesqueleto y regulan su

función⁽⁴¹⁾. La MBP se une a proteínas cargadas negativamente como a los filamentos de actina y microtúbulos *in vitro* y puede estar unido de forma reticular a la proteína PLP⁽¹¹⁶⁾. La MBP induce la polimerización de actina-F (así como el agrupamiento de microfilamentos) esta actividad es dependiente de la fosforilación de MBP. En general, el estado de fosforilación de la MBP determina su distribución subcelular, ya que la MBP fosforilada se localiza principalmente en el cuerpo celular mientras que la desfosforilada está presente en la periferia⁽¹¹⁶⁾. En estadios tardíos en el proceso de mielinización, la MBP está predominantemente desfosforilada, lo cual permite su interacción con los lípidos de membrana y se ha postulado que puede actuar como una proteína de anclaje para el citoesqueleto de actina⁽⁴¹⁾. Por su parte, la glicoproteína MOG tiene un dominio extracelular similar a la región variable de las inmunoglobulinas lo que sugiere una función de adhesión celular⁽¹¹⁷⁾. Además, la MOG puede tener un efecto regulador sobre la MBP, porque se expresa relativamente tarde en el desarrollo, lo que puede indicar un contra balance de la actividad estabilizadora de los microtúbulos por la MBP⁽⁴¹⁾.

Un cambio morfológico complejo como la generación, crecimiento y ramificación de prolongaciones no solo requiere una remodelación pronunciada del citoesqueleto, sino también una extensión significativa de la superficie membranal, así como alteraciones en la composición de la membrana que la preparan para recubrir segmentos axonales. Una característica eminente en la remodelación de la membrana en los OLGs es la generación de microdominios especializados denominados balsas lipídicas, compuestas de colesterol y glucoesfingolípidos, así como fosfolípidos con cadenas saturadas de acilos. Debido a que los glucoesfingolípidos no son detectables en precursores celulares, se ha asumido que la formación de las balsas lipídicas se incrementa durante la diferenciación y crecimiento de los procesos oligodendrogiales⁽⁴¹⁾.

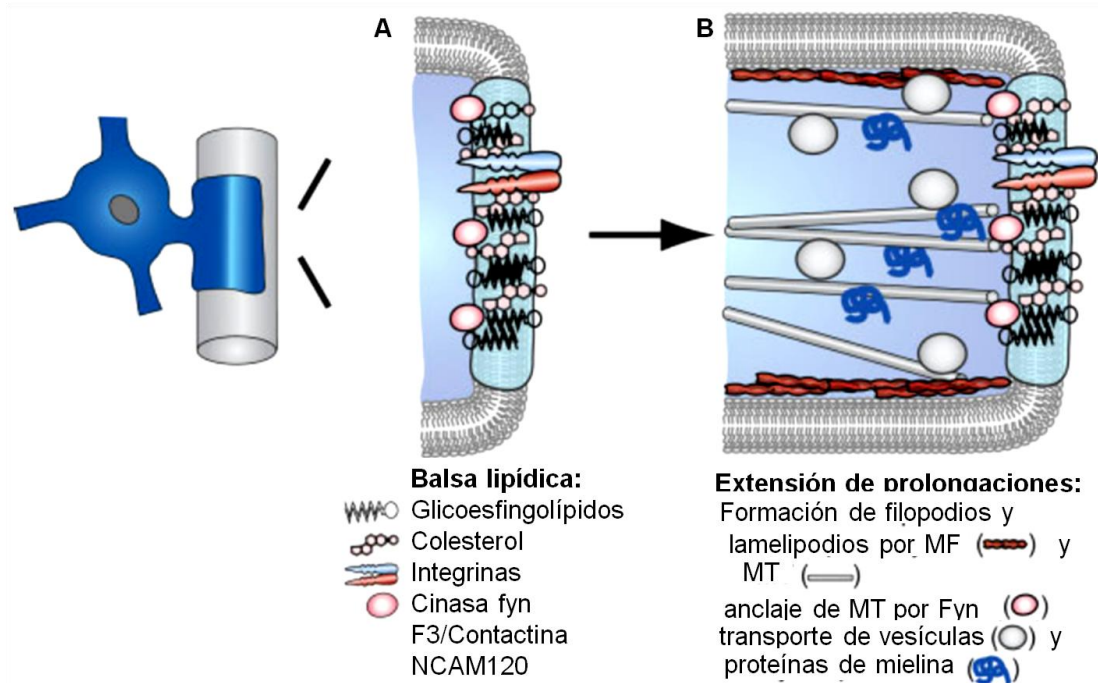


Figura 15. Papel de las balsas lipídicas en el crecimiento prolongaciones. Las balsas lipídicas se forman tras la maduración oligodendroglial y la formación de contactos con los axones. (A) Las balsas se constituyen de grandes cantidades de glicosfingolípidos y colesterol y están enriquecidas de cinasa Fyn, F3/contactina, integrinas y NCAM120. (B) La composición de las balsas conlleva la polimerización de los microfilamentos (MF) y los microtúbulos (MT), el anclaje de los MT por la cinasa Fyn, y el transporte directo de vesículas, proteínas de mielina, y ARNm para la formación de la vaina de mielina. Tomada y editada de Bauer et al., 2009⁽⁴¹⁾.

Dos líneas de evidencia sugieren que las balsas lipídicas de los OLGs tienen un papel directo en el reacomodo específico del citoesqueleto para permitir la mielinización después del contacto con el axón, y mediante experimentos de cultivo celular se ha demostrado que el recubrimiento de MBP en las balsas depende de la formación del contacto neurona-glía^(41,118).

Debido a que la extrusión de citoplasma en la fase de compactación de la mielina requiere una posición cercana de las membranas plasmáticas, se ha especulado que este proceso está basado en la retracción, desensamble o reorganización del citoesqueleto. Se han propuesto diversas moléculas que podrían contribuir a la retracción de los microtúbulos, entre ellos la proteína SIRT2, mencionada previamente⁽⁴¹⁾.

La dinámica de los cambios en la organización del citoesqueleto ocurre en diversos procesos biológicos de acuerdo con el tipo celular y sus funciones específicas. Además, la organización específica de los tres principales componentes del citoesqueleto es necesaria para su óptima funcionalidad. Se ha sugerido que en procesos patológicos del SNC, tales como las enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas, ocurre una organización anormal del citoesqueleto neuronal⁽¹⁾. Como ya se mencionó, la mayoría de estos padecimientos presentan alteraciones de la materia blanca y también se ha reportado un déficit de melatonina^(119,120), una indolamina endógena involucrada en múltiples procesos fisiológicos en el organismo y un importante modulador del citoesqueleto en diversas estirpes celulares⁽¹⁾.

3.5 Melatonina

Como se mencionó anteriormente, la diferenciación y maduración de los OLGs puede regularse mediante moléculas presentes en el microambiente extracelular. Una de las moléculas endógenas que podría influir en este proceso es la melatonina (MEL).

La MEL (N-acetil-5-metoxitriptamina) es sintetizada y secretada principalmente por la glándula pineal durante la fase oscura del ciclo de iluminación ambiental y es rápidamente liberada tanto al líquido cefalorraquídeo como al flujo sanguíneo donde los niveles altos alcanzan concentraciones nanomolares⁽¹²¹⁾. Sin embargo también se sintetiza en otros tejidos y células, incluyendo la retina^(122,123), células de la médula ósea humana y murina⁽¹²⁴⁾, las plaquetas⁽¹²⁵⁾, el tracto gastrointestinal⁽¹²⁶⁾, la piel⁽¹²⁷⁾ y los linfocitos^(128,129). En cuanto a las células gliales, se ha reportado que los astrocitos pueden sintetizar esta indolamina⁽¹³⁰⁾.

La MEL es un modulador de múltiples procesos fisiológicos. En mamíferos, la información fotoperiódica es transmitida al resto del organismo a través de la secreción de la MEL por la glándula pineal. De esta manera regula diversos ritmos biológicos como el ciclo sueño/vigilia, la reproducción, así como ritmos de síntesis de proteínas en el cerebro y en el sistema neuroendocrino para producir cambios adaptativos en la fisiología en general^(129,131–134).

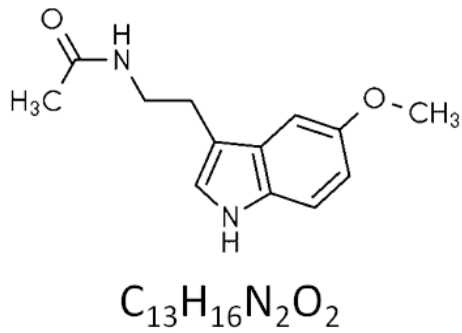


Figura 16. Estructura química de la melatonina. La N-acetil-5-metoxitriptamina es una indolamina que se sintetiza principalmente en la glándula pineal y participa en múltiples procesos celulares, neuroendocrinos y neurofisiológicos.

Al tener una estructura química anfifílica, la MEL puede difundir a través de las bicapas lipídicas de las membranas⁽¹³⁵⁾. Una vez dentro de las células actúa directamente como captador de radicales libres (*scavenger*) y neutraliza radicales como el hidroxilo y el peroxilo, entre otros. Además, tiene un efecto indirecto al inducir la síntesis de enzimas antioxidantes. De esta manera previene la peroxidación de la membrana lipídica y la apoptosis⁽¹³⁶⁾. También puede interactuar con moléculas que actúan como sitios de unión intracelulares para modular cascadas de señalización. Entre estos blancos intracelulares están las proteínas calmodulina y PKC⁽¹³⁷⁾ y los receptores nucleares de tipo retinoidal ROR y RZR⁽¹³⁸⁾.

La MEL también ejerce su efecto en las células mediante la activación de sus receptores específicos de membrana MT1 y MT2. Estos son receptores de siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G. Estos receptores se expresan fuertemente tanto en astrocitos como en células microgliales, y en un grado menor en neuronas y OLGs inmaduros⁽¹³⁹⁾.

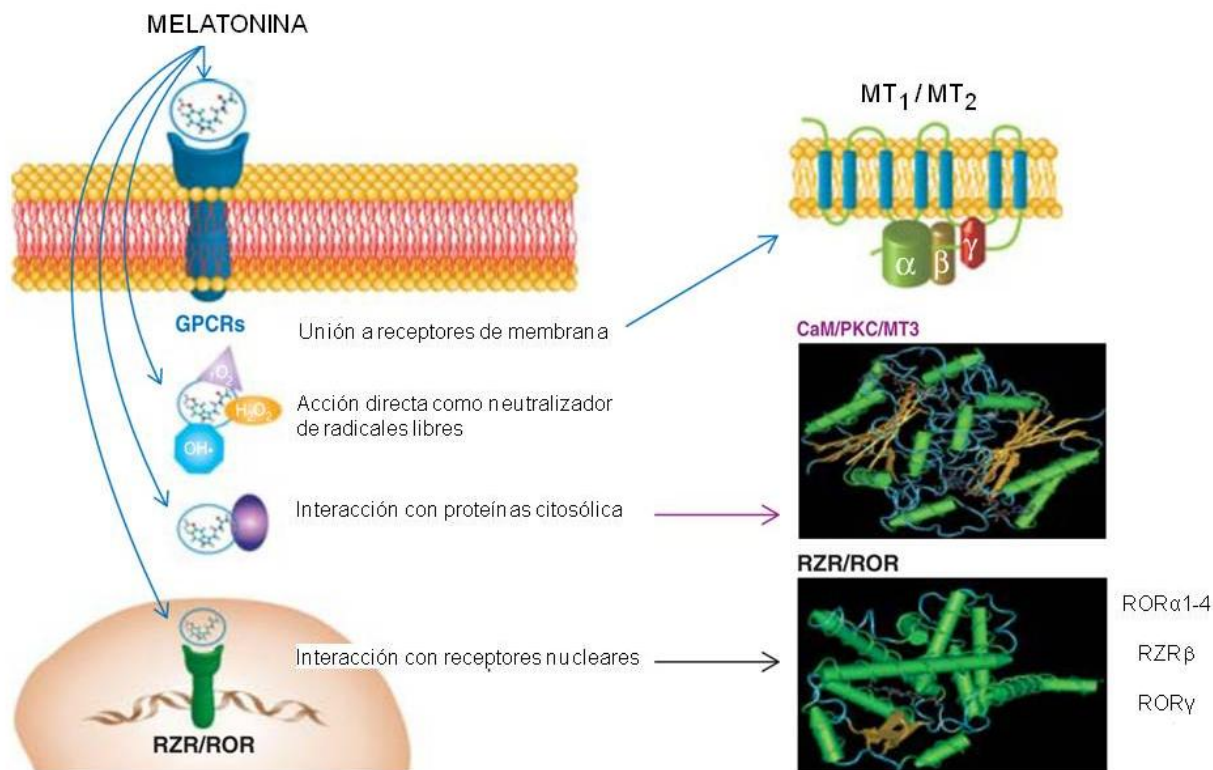


Figura 17. Mecanismos de acción de la melatonina. Los mecanismos de acción de la MEL son múltiples. La MEL puede atravesar la membrana plasmática, incluso el núcleo, gracias a su carácter lipofílico; unirse a receptores de membrana plasmática (MT1 y MT2); actuar sobre receptores nucleares (ROR/RZR), sobre proteínas citosólicas de unión a calcio (calmodulina, calreticulina); sobre la mitocondria al mantener la homeostasis mitocondrial y depura radicales libres. Imagen tomada y editada de Guerrero, Carrillo-Vico & Lardone, 2007⁽¹⁴⁰⁾.

Como se mencionó previamente, la fisiología de la MEL es muy versátil. En lo que al sistema nervioso se refiere, se ha reportado que esta indolamina tiene efectos desde la etapa embrionaria para la regulación de diversos procesos fisiológicos, entre ellos el neurodesarrollo. Si el aporte materno de la MEL durante la gestación es deficiente en cuanto a su concentración o está desincronizado respecto de su ritmo circadiano se pueden generar diversas alteraciones en la progenie⁽¹⁴¹⁾. Nuestro grupo de trabajo ha demostrado que la MEL es un factor de diferenciación neuronal, que favorece la proliferación y la supervivencia de nuevas neuronas⁽¹⁴²⁾. Además, estimula la polarización morfofuncional de células progenitoras neurales y de neuronas adultas ya que promueve el desarrollo de sus proyecciones especializadas (dendritas y axones)^(143,144).

La MEL cruza fácilmente la BHE donde protege tanto a las neuronas como a la neuroglía del daño oxidativo y de la muerte celular⁽¹⁴⁵⁾. Dentro de todas las células, incluidas neuronas y neuroglía, esta indolamina previene la formación aumentada de especies reactivas de oxígeno (ROS) que provocan la despolarización de la membrana mitocondrial y la subsecuente apertura de los poros de permeabilidad transitoria mitocondrial (PPTM) y la liberación de citocromo c; de este modo reduce la pérdida de células cerebrales por apoptosis⁽¹⁴⁶⁾. Esta acción combinada de la MEL en el SNC junto con su habilidad de cruzar rápidamente la BHE y entrar a las células, hacen a esta indolamina un agente neuroprotector muy relevante en términos neurofisiológicos⁽¹⁴⁷⁾.

La MEL también ejerce un efecto protector potente en la materia blanca en desarrollo, ya que atenúa defectos en mielinización inducidos por condiciones de hipoxia y/o isquemia prenatal o neonatal en roedores y en ovinos^(139,148). En estos estudios se reportó que la melatonina podría actuar a través de sus receptores membranales para promover la maduración oligodendroglial y así contrarrestar el daño en la mielina junto con la modulación de la astrogliosis y la activación microglial *in vivo* e *in vitro*⁽¹³⁹⁾.

Cabe destacar que se ha inferido un papel de la MEL en la diferenciación oligodendroglial, ya que en los estudios en donde se observa un efecto protector de esta indolamina ante el daño a la materia blanca no se ha encontrado un efecto en la proliferación de los precursores de OLGs^(139,148,149). A su vez Ghareghani y colaboradores (2016) demostraron que la MEL mejora la viabilidad y proliferación de células madre neuronales (NSC: neural stem cells), lo cual es consistente con estudios previos^(150,151). También demostraron que la MEL podría influir en la diferenciación de OLGs a partir de las NSC, sin embargo, se desconocen los mecanismos implicados que podrían estar a nivel de la especificación del linaje.

Como ya se mencionó, tanto el proceso de diferenciación como la formación y compactación adecuada de la vaina de mielina requieren de una reorganización dinámica de los diferentes elementos del citoesqueleto oligodendroglial. En este sentido, Benítez-King (2006) documentó que la MEL actúa como un modulador del citoesqueleto e influye en la organización de sus componentes en diversas estirpes celulares. Además, la MEL protege el citoesqueleto contra el daño causado por los radicales libres lo que contribuye

a la sobrevivencia celular⁽¹⁾. Más aún, uno de los blancos de esta indolamina para actuar como un factor de diferenciación neuronal es este componente celular. Dado que algunos elementos de las vías de señalización intracelulares y las moléculas que regulan la dinámica del citoesqueleto pueden ser comunes en células de diversas estirpes, la MEL podría incidir sobre la formación o remodelación de la vaina de mielina a través de la modulación del rearrreglo del citoesqueleto oligodendroglial.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Si bien se sabe que la melatonina tiene un efecto neuroprotector y reparador ante el daño de la materia blanca, no se conoce si la melatonina modula los procesos fisiológicos de mielinización/remielinización en el SNC.

5. HIPÓTESIS

La melatonina favorece el proceso de diferenciación y maduración de los oligodendrocitos mediante la modulación del citoesqueleto oligodendroglial.

6. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la melatonina en la modulación del citoesqueleto oligodendroglial implicado en la diferenciación y maduración de dichas células, necesaria para el proceso de mielinización.

6.1 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la melatonina en la diferenciación y maduración oligodendroglial.
- Evaluar el efecto de la melatonina en la formación de filopodios y lamelipodios.
- Evaluar la modulación del citoesqueleto microtubular mediante la determinación de la cantidad relativa de tubulina- α acetilada.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Diseño

Se trata de un estudio de tipo experimental, con mediciones después de los tratamientos.

7.2 Universo (población o muestra)

Poblaciones de estudio: Oligodendrocitos de nervio óptico y células precursoras de oligodendrocitos de hipocampo de rata.

Muestra: Cultivos realizados de estas poblaciones celulares

Procedimiento para coleccionar la muestra: Aleatorio

7.3 Variables

Independientes: Tratamiento, tiempo de incubación

Dependientes:

- a) Número y longitud de filopodios
- b) Número y área de lamelipodios
- c) Número de intersecciones (análisis de Sholl)
- d) Proporción de células con prolongaciones y/o ramificaciones
- e) Señal densitométrica normalizada de tubulina- α acetilada
- f) Intensidad de fluorescencia de marcadores de diferenciación O4 y MBP

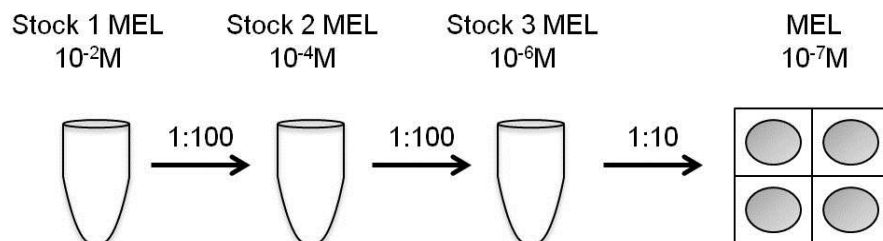
7.4 Procedimientos experimentales

7.4.1 Animales de experimentación

Ratas hembra de la cepa Wistar, de siete o diez días postnatales de edad (P7 o P10, respectivamente), proporcionados por el Bioterio del INPRFM. Los animales están alojados bajo un ciclo luz-oscuridad de 12:12 horas, con alimento y agua disponibles *ad libitum*. Los procedimientos de manejo y sacrificio de los animales se realizan de acuerdo con la normatividad vigente (NOM-069-ZOO-199) y el protocolo de investigación fue aprobado previo a su inicio por el Comité de Ética en Investigación Institucional (CEI/C/065/2017).

7.4.2 Tratamiento farmacológico

Se empleó MEL (SIGMA Lot 128H0473) en la concentración de 10^{-7} M (100 nM). Dado que la MEL no es soluble en agua, se utiliza la mínima cantidad de etanol absoluto para su disolución (concentración final de etanol 0.0004%) y se completa al volumen necesario para alcanzar la concentración deseada con el mismo medio en el que se incuban las células. Para ello se realizan diluciones seriales y se considera el volumen final en la siembra celular como se muestra en el siguiente esquema:



Para descartar que los efectos observados sean debidos al etanol en el que disuelve la MEL, se realizó la incubación con dicho vehículo (VEH; etanol 0.0004%) en paralelo a la incubación con MEL en todos los casos.

7.4.3 Detección por Western Blot de tubulina- α y tubulina- α acetilada y detección inmunofluorescente de marcadores de diferenciación y maduración oligodendroglial y en OLGs de nervio óptico de rata

Se sacrificaron los animales de experimentación y se disecaron los nervios ópticos a partir de los cuales se obtuvo una suspensión celular tras la disgregación mecánica y enzimática del tejido. Las células obtenidas se sembraron en placas de 4 pozos o en cajas de cultivo T25 y se aplicó el tratamiento farmacológico de melatonina 100 nM o vehículo. De las células cultivadas en cajas T25, se realizó la lisis celular con buffer RIPA y se obtuvieron los extractos proteicos para el análisis por Western Blot de la tubulina- α y la tubulina- α acetilada. Las células sembradas en placas de 4 pozos se procesaron para la inmunodetección de los marcadores Olig2 (24h), O4 y MBP (48h) y la tinción de contraste de núcleos (DAPI) y microfilamentos de actina (TRITC-faloidina) (figura18). Para ver el procedimiento detallado, ver apéndice.

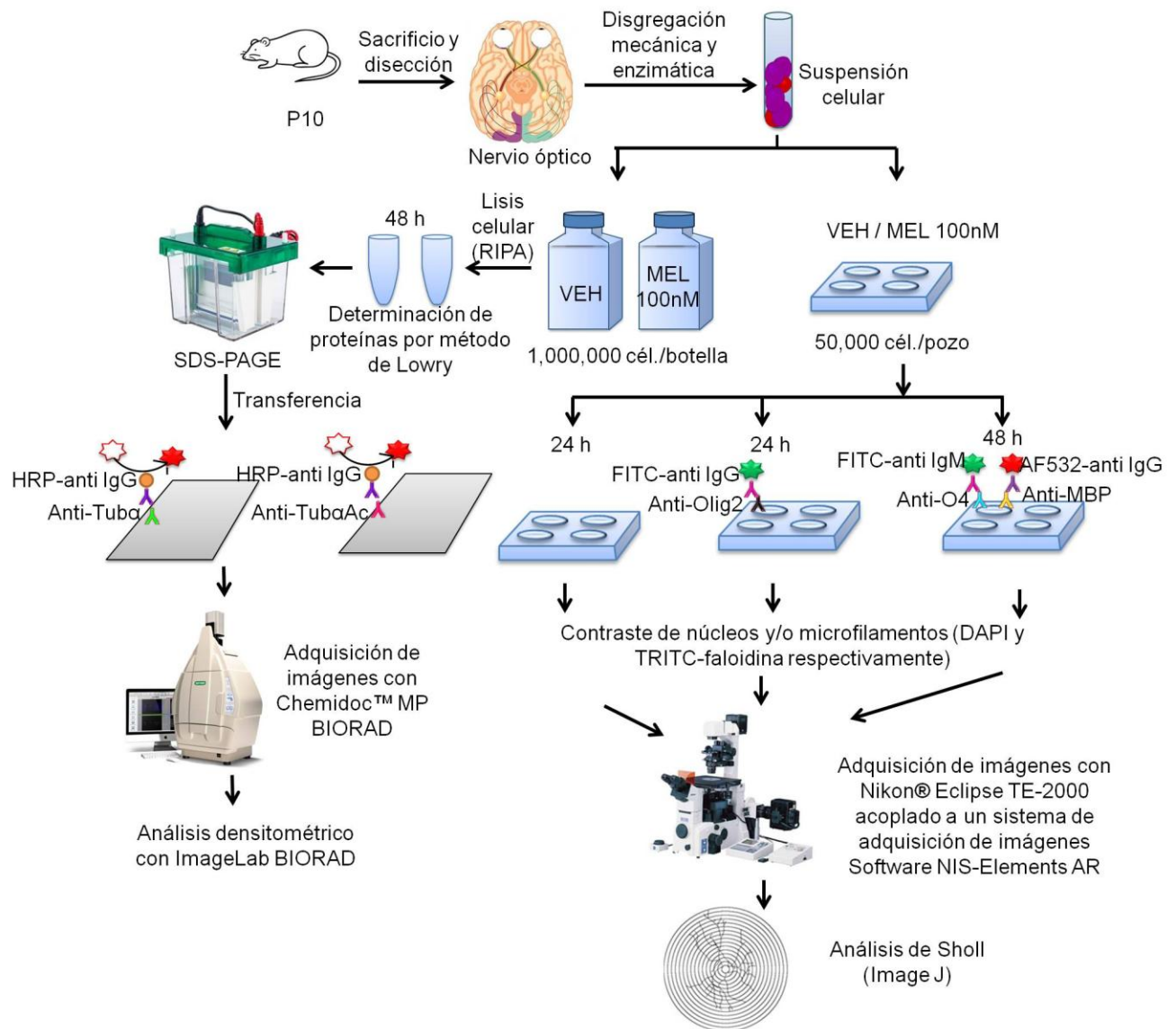


Figura 18. Diagrama de la detección por Western Blot de la tubulina- α y la tubulina- α acetilada y la detección inmunofluorescente de distintos marcadores oligodendrogliales en OLGs de nervio óptico de rata.

7.4.4 Detección inmunofluorescente de de tubulina- α acetilada y marcadores de diferenciación y maduración oligodendrogiales en OPCs de hipocampo de rata obtenidos por separación inmunomagnética

Se sacrifican los animales de experimentación y se disecan los hipocampos. Se obtiene una suspensión celular tras la disgregación mecánica y enzimática del tejido. A partir de la suspensión celular, se obtienen por separación inmunomagnética las células con marcaje A2B5 positivo. Se siembran las células obtenidas en cajas de 4 pozos, se aplica el tratamiento farmacológico y se incuban a 37°C, 5% CO₂. Una vez fijadas las células se realiza la inmunodetección de los marcadores Olig2 y A2B5 (3h), tubulina- α acetilada (24 y 48h) y O4 y MBP (72h). A su vez se realiza la tinción de contraste de núcleos (DAPI) (figura 19). El procedimiento a detalle se encuentra en el apéndice.

7.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante los programas estadísticos Sigma Plot y R. Se realizó la comparación entre tratamientos (VEH y MEL) mediante la prueba de t de Student con o sin la corrección de Welch y mediante la prueba de Suma de Rangos de Mann-Whitney cuando la distribución de los datos no fue normal.

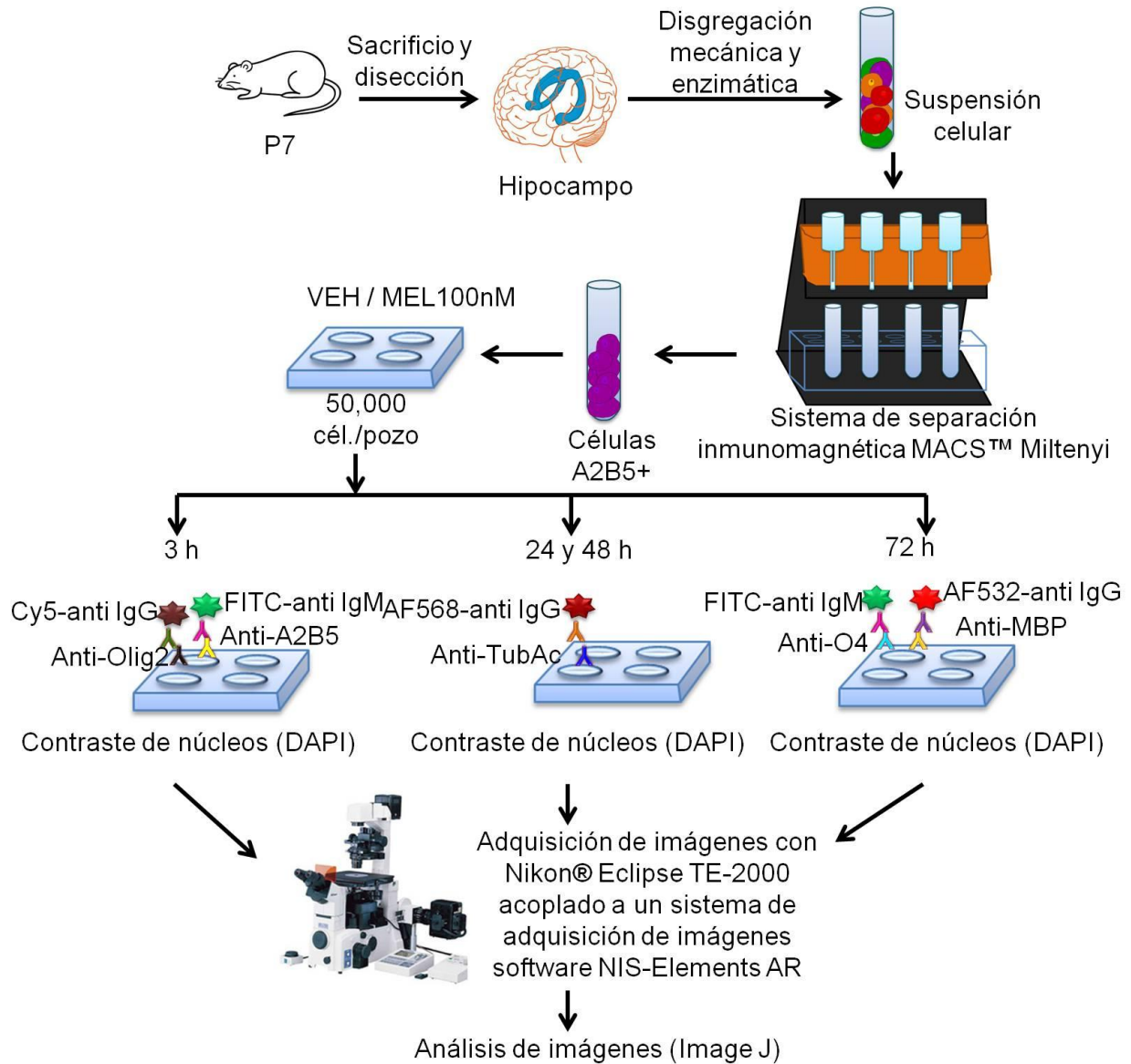


Figura 19. Diagrama de la detección por inmunofluorescencia de tubulina- α acetilada y marcadores oligodendrogliales en OPCs de hipocampo de rata.

8. RESULTADOS

En este trabajo se aislaron dos poblaciones celulares: OLGs del nervio óptico y OPCs del hipocampo de la rata para estudiar el efecto de la melatonina sobre la modulación del citoesqueleto y la diferenciación oligodendroglial. La figura 20 muestra la caracterización de la población celular obtenida del nervio óptico.

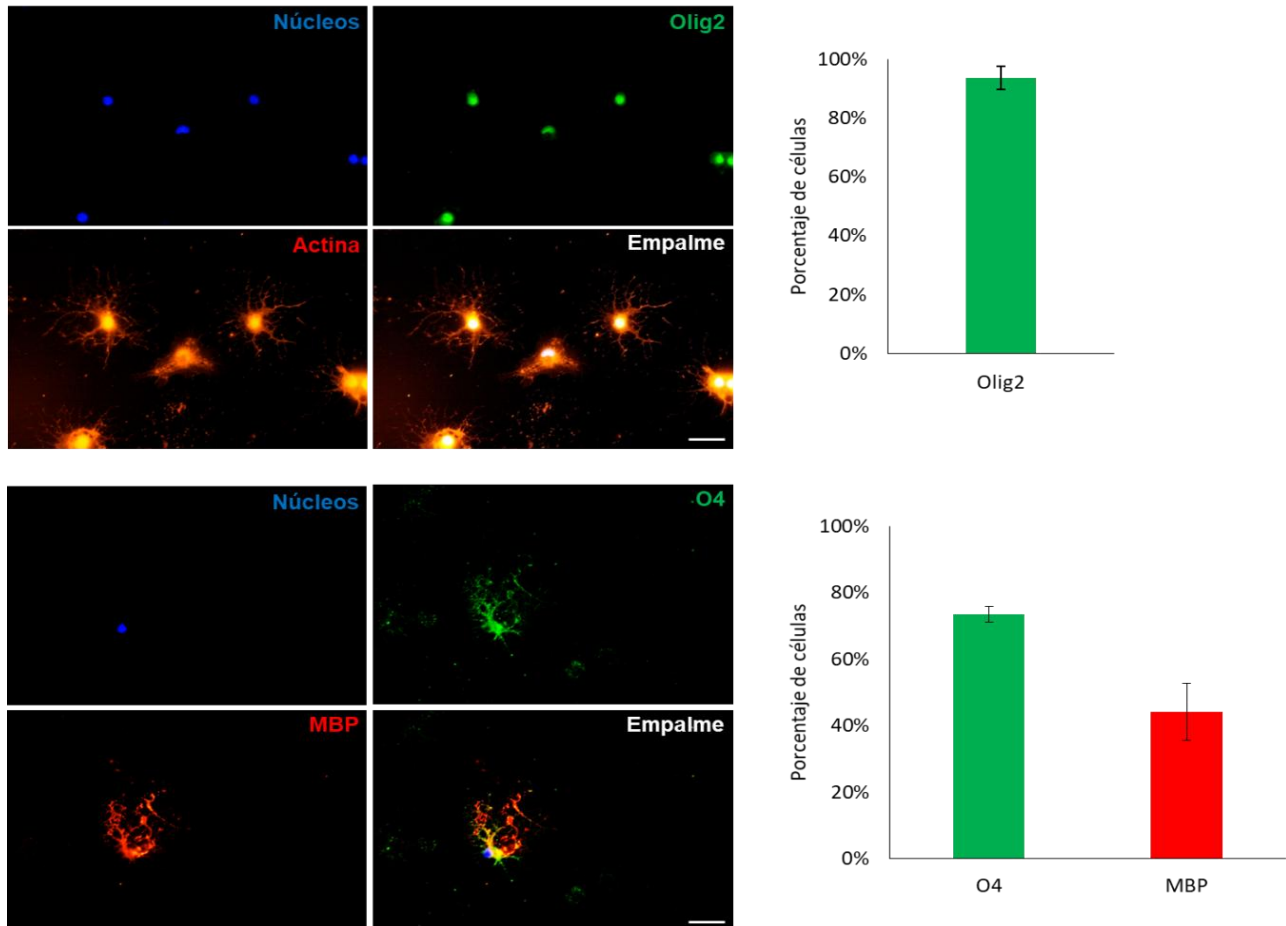


Figura 20. Caracterización de los OLGs del nervio óptico de la rata. Panel superior: imágenes representativas de los OLGs en los que se inmunodetectó el marcador Olig2 (verde), la contratinción de los núcleos (azul) y los microfilamentos de actina (rojo) a las 24h de cultivo. A la derecha se muestra el gráfico del porcentaje de células (media \pm e.e.m.) inmuno-positivas al marcador Olig2. A las 48h de cultivo se inmunodetectó la sulfatida O4 (verde) y la proteína MBP (rojo; panel inferior). En el canal azul se detectó la fluorescencia del compuesto DAPI con el que se evidencian los núcleos. Barra: 10 μ m. A la derecha el gráfico del porcentaje de células que presentan estos marcadores.

En el panel izquierdo de la figura 20 se muestran las imágenes de dos campos representativos de las tinciones que se realizaron para la caracterización de estos oligodendrocitos. En la parte superior se muestra la tinción de los núcleos con DAPI (azul), la inmunodetección de Olig2 (verde), la tinción de los microfilamentos de actina con faloidina rodaminada (rojo) y el empalme; mientras que en la parte inferior se muestra la tinción de núcleos (azul), la inmunodetección de O4 (verde), de MBP (rojo) y el empalme. La barra en la esquina inferior derecha corresponde a 10 μm .

La inmunodetección del marcador de linaje Olig2 mostró que, a las 24h de cultivo, un $94 \pm 4\%$ (media \pm e.e.m.) de la población de OLGs aislados del nervio óptico de la rata expresó este marcador. Así también, a las 48h de cultivo, el porcentaje de células que expresaron reactividad positiva a los anticuerpos dirigidos contra la sulfatida O4 y la proteína MBP fueron $73 \pm 2\%$ y $44 \pm 9\%$, respectivamente (figura 20, panel derecho).

El análisis de los filopodios y los lamelipodios, así como el análisis de Sholl, se realizó en OLGs de nervio óptico después de haber sido incubados durante 24h con MEL 100 nM o el VEH, fijados y teñidos con faloidina rodaminada para detectar los microfilamentos de actina.

La figura 21 muestra los resultados obtenidos del análisis de los filopodios. El panel superior muestra imágenes representativas de las células que se analizaron de cada grupo. En las células incubadas con MEL se encontró un número 40% mayor de filopodios que en las células incubadas con el VEH (panel inferior izquierdo). Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$). La longitud promedio de los filopodios fue de $1.16 \pm 0.03 \mu\text{m}$ y no hubo una diferencia significativa entre los tratamientos (panel inferior derecho).

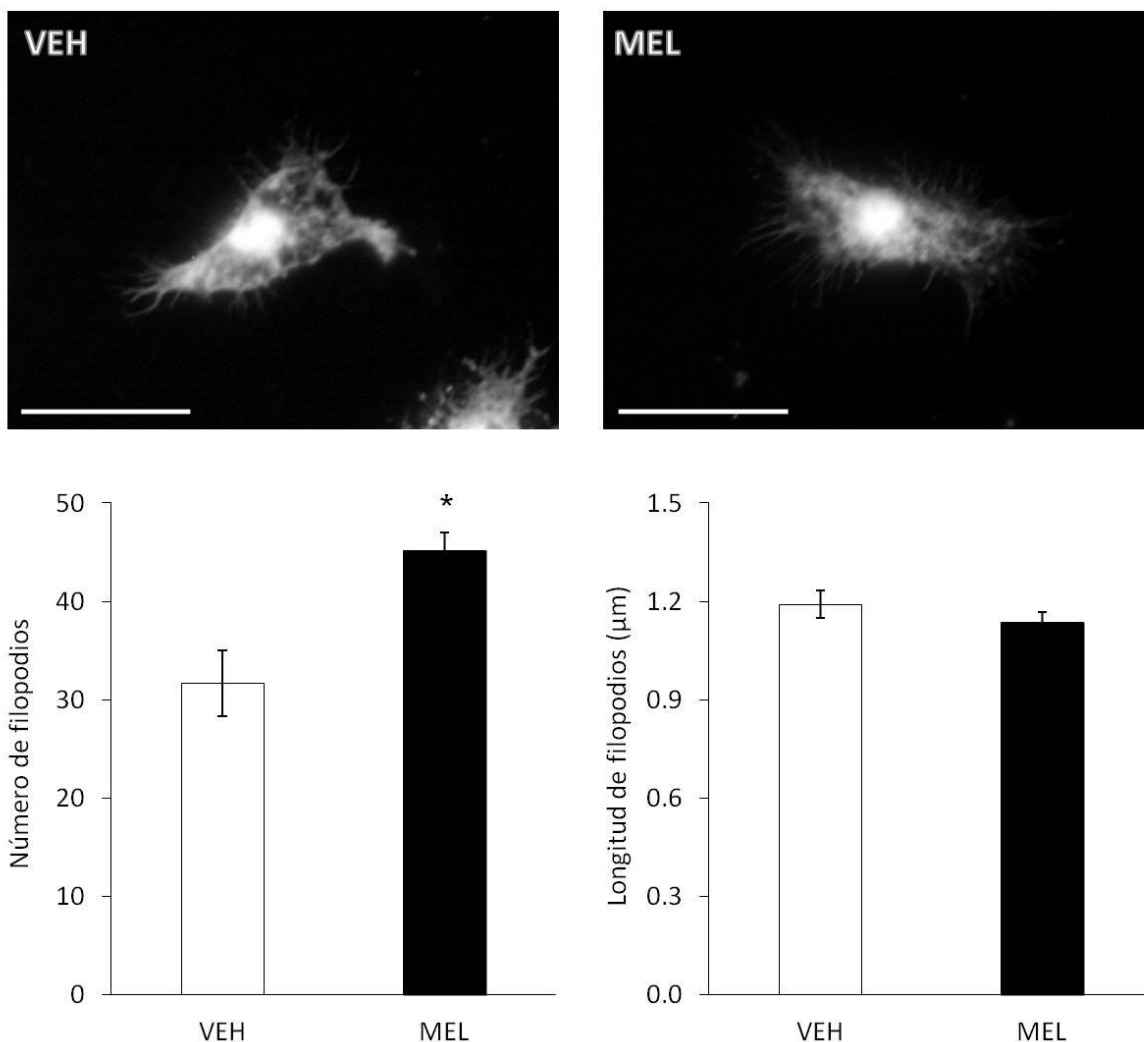


Figura 21. Análisis del número y la longitud de los filopodios en OLGs de nervio óptico. Los OLGs fueron tratados con MEL 100 nM o el VEH durante 24h. Panel superior: Imágenes representativas de los OLGs tras 24h de incubación con los tratamientos. Barra 10 µm. Panel inferior: Presentación de gráficos que relacionan, por separado, el número y la longitud de los filopodios con el tratamiento (media ± e.e.m; * $p < 0.05$; t de Student).

La figura 22 muestra el análisis del número y el área de los lamelipodios. En el panel superior se muestran imágenes representativas de las células que se analizaron de cada grupo. El panel inferior muestra los gráficos correspondientes al número y el área de los lamelipodios. La mayoría de las células analizadas tuvieron 3 lamelipodios; el área de éstos tuvo un promedio de $5.6 \pm 0.8 \mu\text{m}^2$ para el VEH y de $7.9 \pm 1.5 \mu\text{m}^2$ para la MEL. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para estos parámetros.

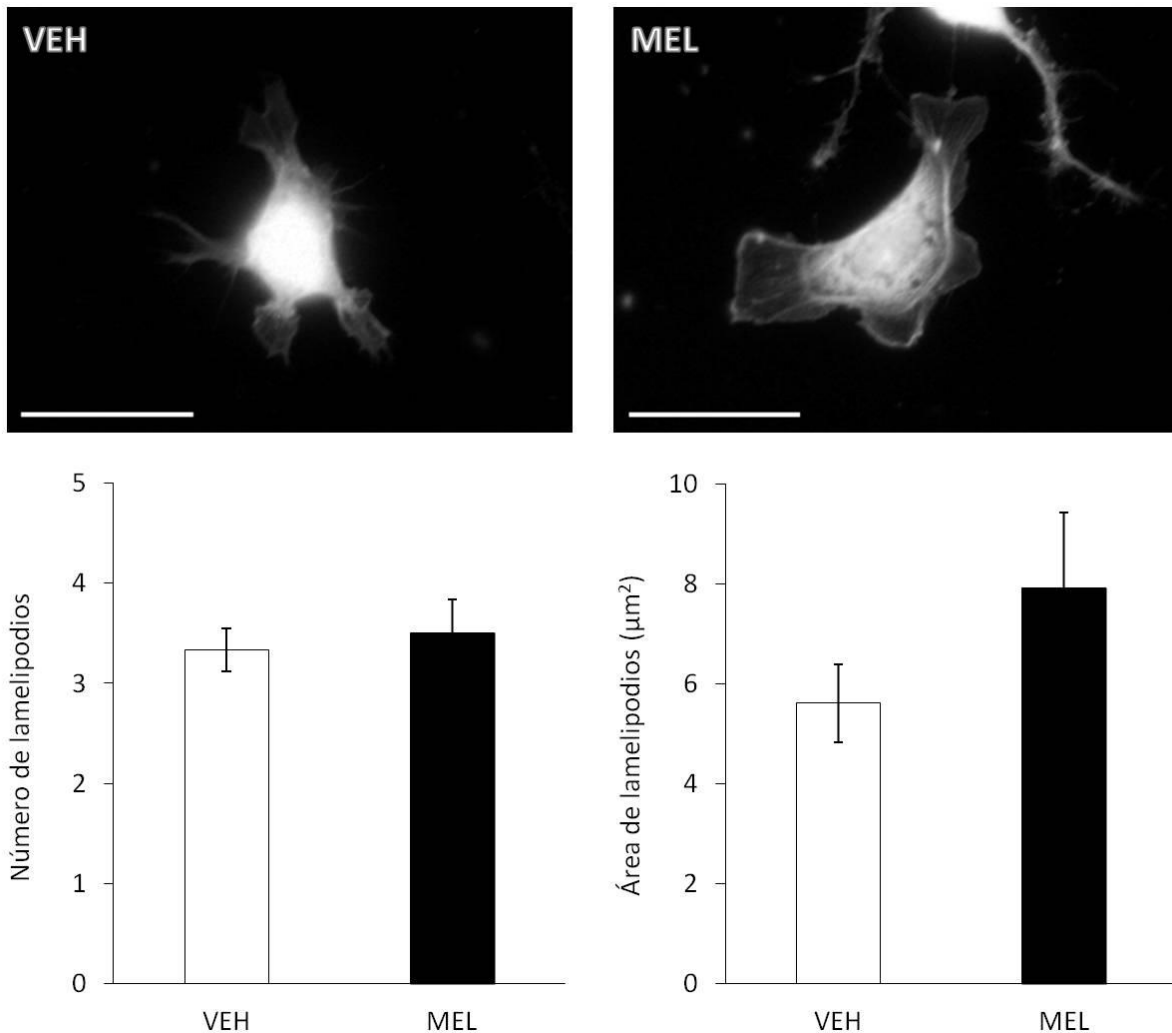


Figura 22. Análisis del número y el área de los lamelipodios en OLGs de nervio óptico. En el panel superior se muestran imágenes representativas de los lamelipodios en los OLGs cultivados con el VEH o con MEL 100 nM durante 24h. Barra 10 µm. Los gráficos relacionan el número y el área de los lamelipodios con el tratamiento (media ± e.e.m).

La figura 23 corresponde al análisis de la complejidad de las ramificaciones oligodendrogliales. En el panel superior se presentan imágenes representativas de las células que se analizaron para cada tratamiento (izquierda: VEH; derecha: MEL 100nM; 24h). En el panel intermedio se muestra un ejemplo del análisis realizado con el método de Sholl, es decir, se muestra la plantilla de círculos concéntricos equidistantes (0.5 µm) que se superpone a la imagen y que parte del soma celular. En panel inferior izquierdo se observan los gráficos que relacionan el número de intersecciones con los primeros

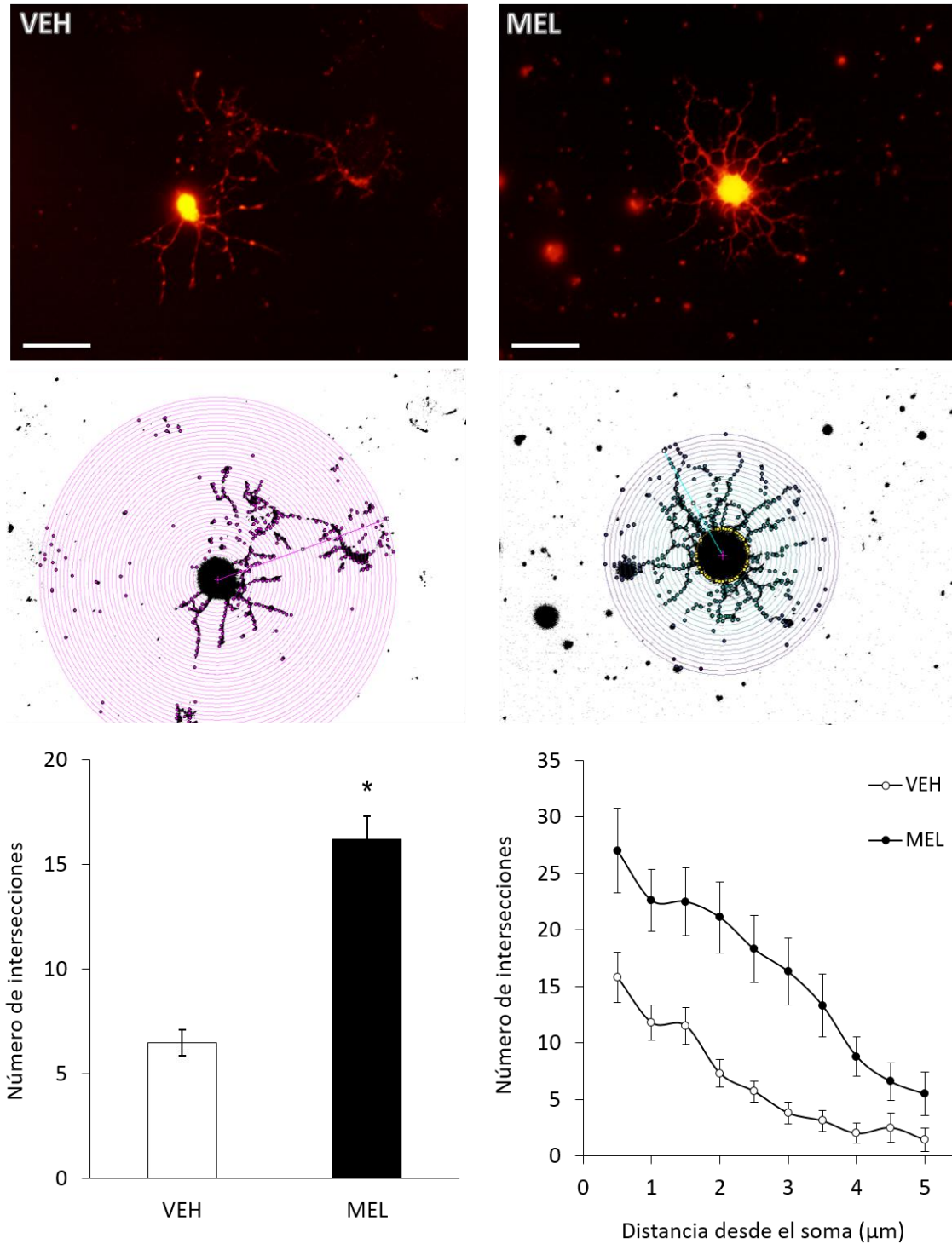


Figura 23. Análisis de las ramificaciones oligodendrogliales por el método de Sholl. Panel superior: imágenes representativas de la morfología de los OLGs de nervio óptico incubados con VEH o MEL durante 24h; barra 10 μm . Panel intermedio: análisis de Sholl que muestra la plantilla de círculos concéntricos que surgen a partir del soma, cuya distancia radial es de 0.5 μm entre cada uno. Panel inferior: a la izquierda el gráfico del número de intersecciones en los primeros diez radios por tratamiento (* $p < 0.0001$, t Welch) y a la derecha su relación con la distancia desde el soma.

10 radios de Sholl (5 μm) por tratamiento, en el que se observa que las células incubadas con MEL tuvieron 2.6 veces más intersecciones respecto al VEH. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.0001$; prueba t de Welch). En el panel inferior derecho se observa la relación entre el número de intersecciones y la distancia desde el soma en un gráfico de dispersión.

La figura 24 muestra la caracterización de la población de células precursoras de oligodendrocitos (OPCs) obtenidas del hipocampo de la rata mediante separación inmunomagnética. El panel izquierdo muestra las imágenes de los diferentes canales de un campo representativo de estos oligodendrocitos. Se muestra la tinción de los núcleos con DAPI (azul), la inmunodetección del marcador A2B5 (verde), de Olig2 (rojo) y el empalme de los canales. El porcentaje de células inmunorreactivas al anti-A2B5 fue de $98 \pm 0.5\%$, mientras que el $96 \pm 1.2\%$ de las células se inmunodetectó con el anti-Olig2 (panel derecho).

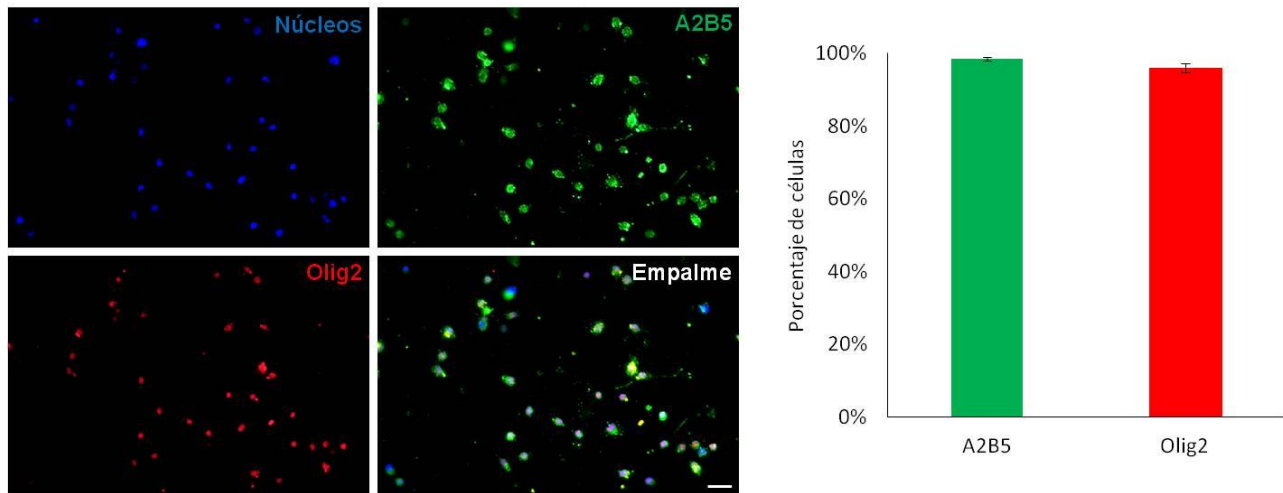


Figura 24. Caracterización de los OPCs de hipocampo obtenidos por separación inmunomagnética. Después de 3 horas de cultivo, se detectaron por inmunofluorescencia los marcadores A2B5 (verde) y Olig2 (rojo) en los OPCs y se realizó una contratinción para los núcleos con DAPI (azul). Barra 10 μm . En el panel derecho se muestra el gráfico del porcentaje de células inmunorreactivas a A2B5 ($98 \pm 0.5\%$) y Olig2 ($96 \pm 1.2\%$).

En los OPCs obtenidos por separación inmunomagnética e incubados con el VEH o con MEL 100 nM durante 24 o 48h, se detectó la tubulina- α acetilada por inmunofluorescencia (figura 25) y se determinó la proporción de células inmunorreactivas con distinto número de ramificaciones primarias (24h) o secundarias y terciarias (48h).

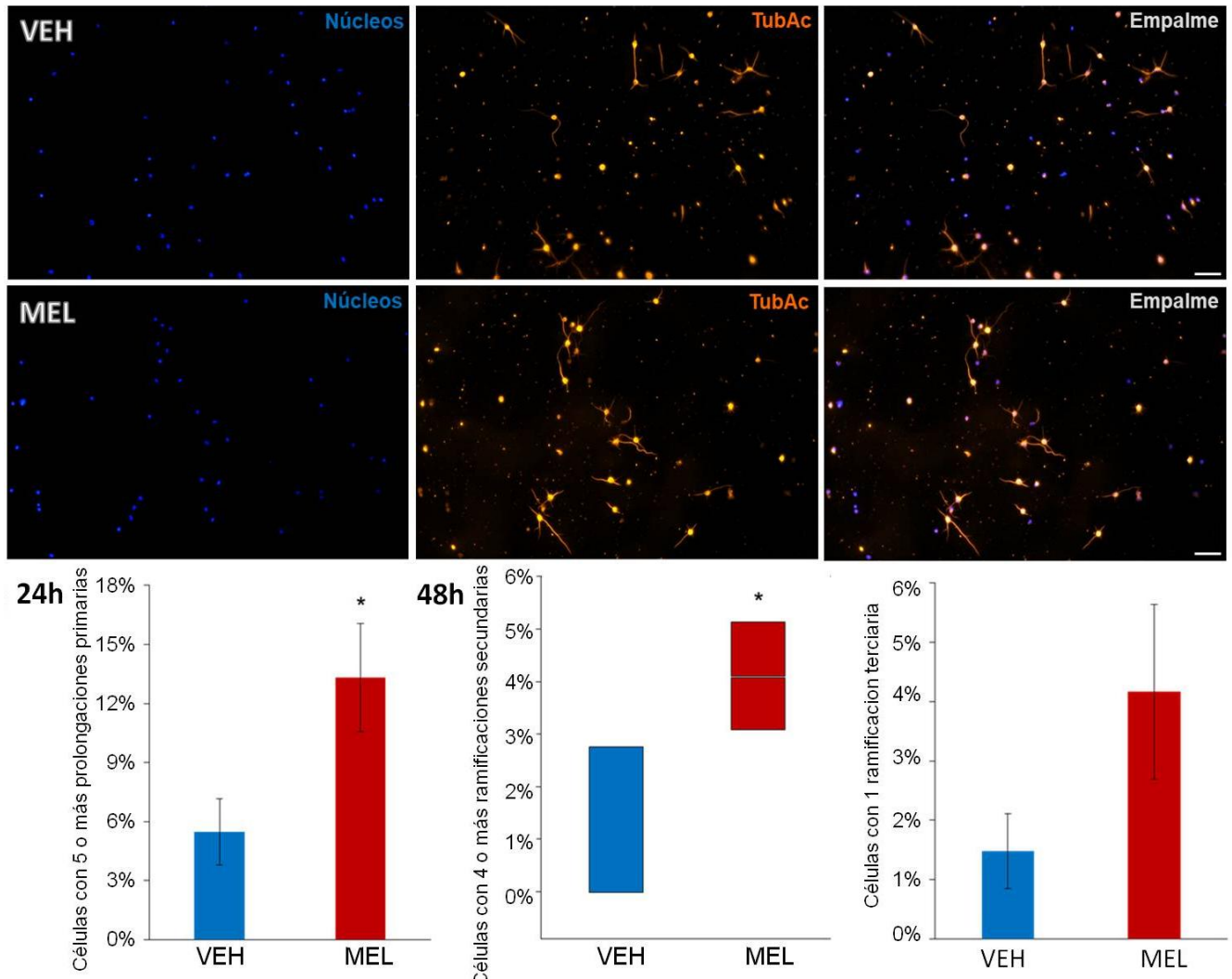


Figura 25. Evaluación morfológica de los OPCs teñidos con tubulina- α acetilada. Detección por inmunofluorescencia de tubulina- α acetilada con el anticuerpo dirigido al residuo de lisina 40 acetilado (naranja) en OPCs con 24h de tratamiento. Los núcleos se tiñeron con DAPI (Azul). Barra 20 μ m. En el panel inferior se muestran gráficos correspondientes a la cantidad de prolongaciones o ramificaciones que presentaron las células por grupo; a las 24h el porcentaje de células con 5 o más prolongaciones primarias (* $p < 0.05$, t de Student) y a las 48h de cultivo el porcentaje de células con 4 o más ramificaciones secundarias (* $p < 0.05$, Mann-Whitney) y con 1 ramificación terciaria.

En el panel superior de la figura 25 se muestran imágenes representativas de la inmunodetección de la tubulina- α acetilada (naranja) y los núcleos teñidos con DAPI (azul) de las células que se analizaron de cada grupo a las 24h de incubación. La barra en la esquina inferior derecha de cada empalme corresponde a 20 μ m. En la parte inferior de la figura se muestran los gráficos del porcentaje de células con 5 o más prolongaciones primarias (24h; izquierda) y con 4 o más ramificaciones secundarias o con 1 ramificación terciaria (48h; derecha). La proporción de células con 5 o más prolongaciones primarias fue 2.4 veces mayor en los OPCs tratados con MEL respecto al VEH. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$, t de Student). A las 48h de incubación con MEL, se encontró una proporción significativamente mayor de células con 4 o más ramificaciones secundarias, respecto a la incubación con VEH (3.7 veces mayor; $p < 0.05$, prueba de Suma de Rangos de Mann-Whitney). La proporción de las células con 1 ramificación terciaria tuvo una tendencia similar, es decir, se encontró una proporción de $1.5 \pm 0.6\%$ células con esta característica en el VEH y de $4.2 \pm 1.5\%$ en las células incubadas con MEL, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

La figura 26 muestra los resultados de la inmunodetección de la tubulina- α y la tubulina- α acetilada por Western Blot en extractos de OPCs que fueron incubados con VEH o con MEL 100 nM durante 48h. En el panel izquierdo de la figura se muestran imágenes representativas de las membranas en las que se detectó la tubulina- α (arriba) y tubulina- α acetilada (abajo). El primer carril corresponde al patrón de bandas generado por los estándares de peso molecular, y en el segundo y tercer carril las bandas detectadas en los extractos de OPCs incubados con VEH y MEL, respectivamente. Tanto para la tubulina- α como para esta proteína acetilada se observa una sola banda de aproximadamente 52 kDa de peso molecular. En el panel derecho de la figura se presentan los gráficos correspondientes a la determinación densitométrica de tubulina- α (arriba) y tubulina- α acetilada (abajo). Los resultados se muestran como la media \pm e.e.m del volumen densitométrico dado por el producto de la densidad óptica (D.O.) por el área de las bandas (mm^2). En el caso de la tubulina- α no se encontró una diferencia significativa en el volumen densitométrico entre tratamientos, mientras que para la tubulina- α acetilada se encontró un volumen densitométrico 1.5 veces mayor ($p < 0.05$, t

de Student) en las bandas correspondientes a los extractos de OPCs incubados con MEL, respecto al vehículo.

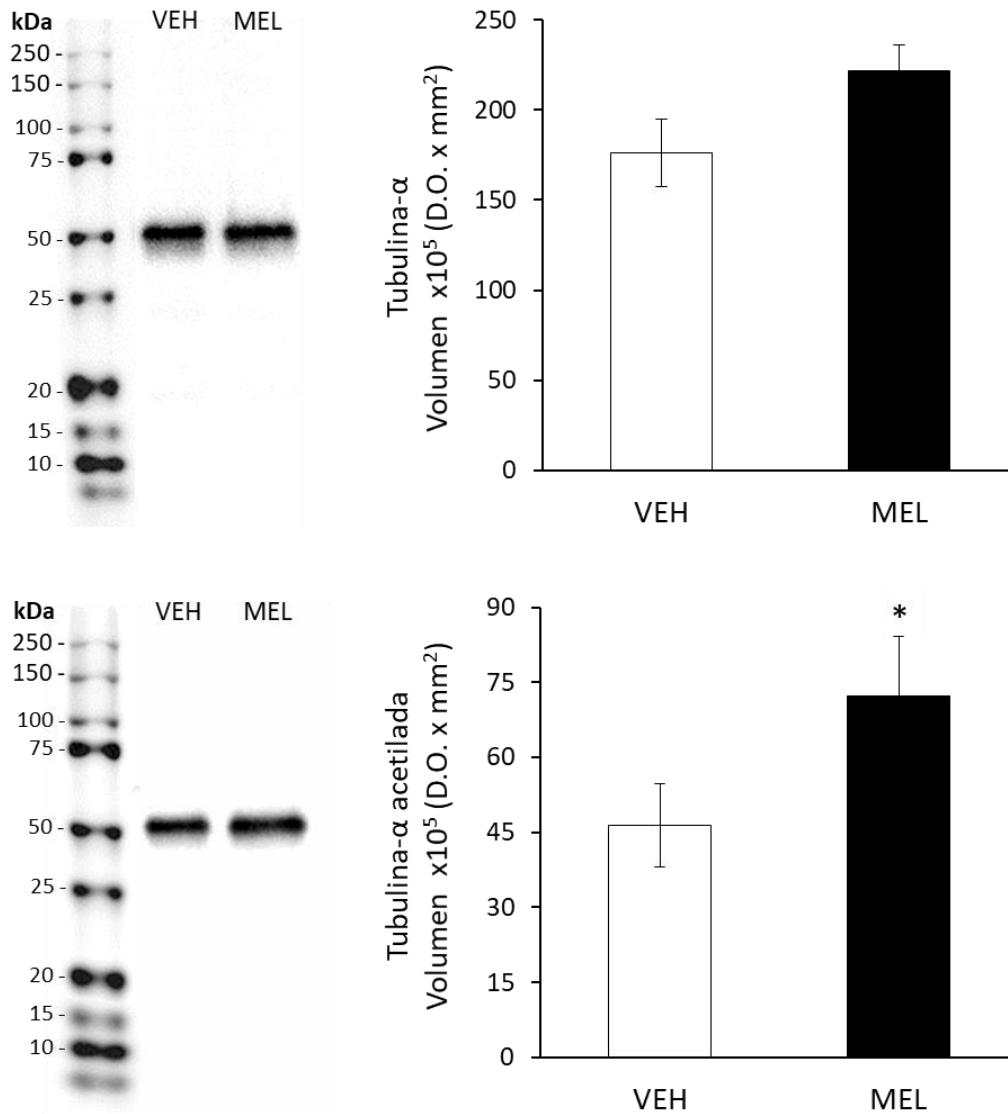


Figura 26. Inmunodetección de tubulina-α y tubulina-α acetilada por Western Blot. Panel izquierdo: imágenes de membranas representativas de la inmunodetección de tubulina-α (arriba) y tubulina-α acetilada (abajo) en extractos de OPCs incubados con VEH o MEL 100 nM por 48h (5 µg de proteína/carril). Carril 1: Estándares de peso molecular. Panel derecho: análisis densitométrico de las bandas inmunorreactivas. Los resultados están expresados como la media ± e.e.m. (*p < 0.05, t de Student).

La figura 27 muestra el análisis de los marcadores de diferenciación oligodendroglial O4 y MBP detectados por inmunofluorescencia en OPCs incubados con el VEH o con MEL

100 nM durante 72h. En el panel superior de izquierda a derecha se muestra la tinción de los núcleos con DAPI (azul), la inmunodetección de los marcadores O4 (verde), MBP (naranja) y los empalmes de células representativas para cada tratamiento. En el panel inferior se muestran los gráficos de la intensidad de fluorescencia de estos marcadores respecto al tratamiento. En ambos marcadores se encontró una intensidad de fluorescencia mayor (97% para O4 y 88% para MBP) en las células incubadas con MEL con respecto al VEH y esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

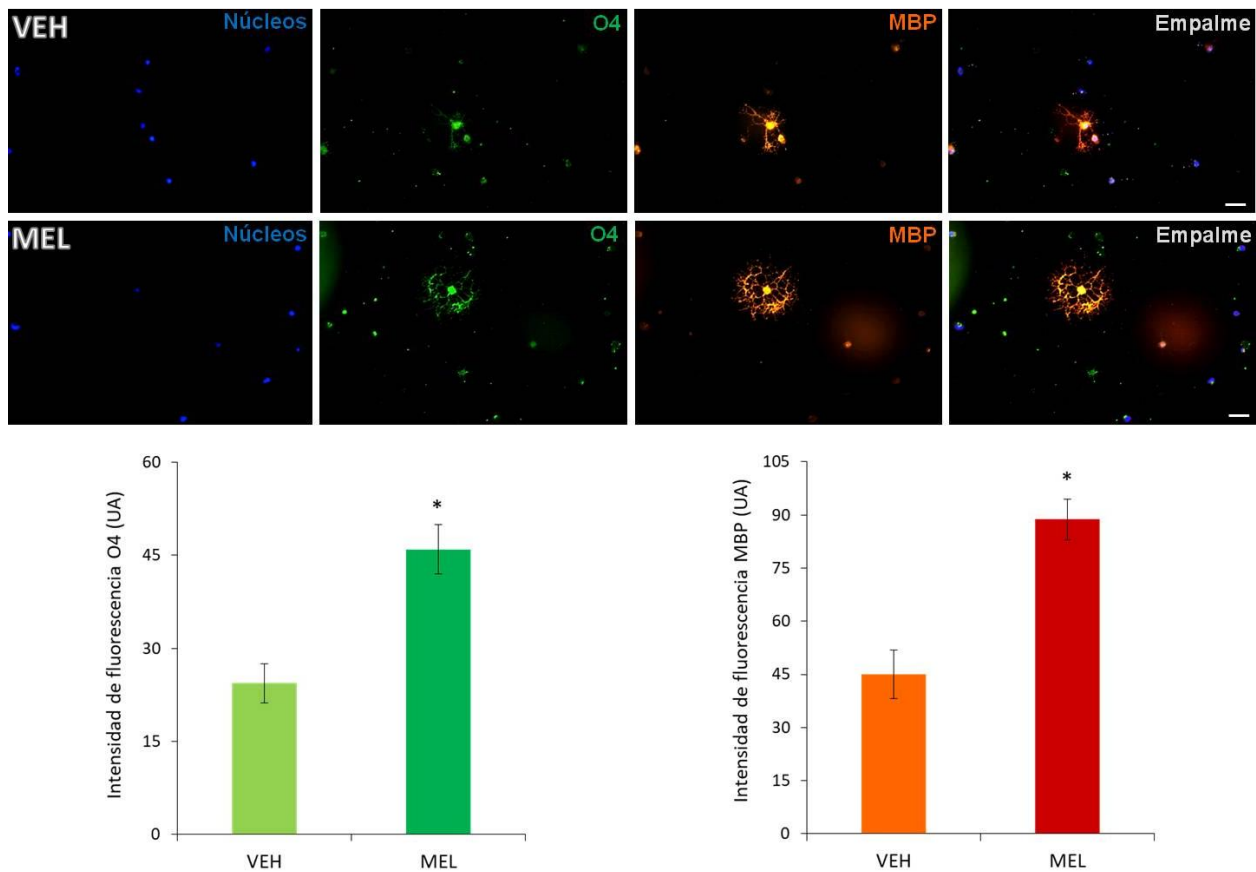


Figura 27. Efecto de la MEL en la expresión de marcadores de diferenciación oligodendroglial. Panel superior: Imágenes representativas de la detección de O4 (verde) y MBP (naranja) por inmunofluorescencia en las células expuestas a los distintos tratamientos durante 72h. Barra 10 μm . Panel inferior: Gráficos de intensidad de fluorescencia en unidades arbitrarias (UA) de los marcadores O4 (izquierda) y MBP (derecha) con respecto al tratamiento (media \pm e.e.m.; * $p < 0.001$, prueba de Suma de Rangos de Mann-Whitney).

9. DISCUSIÓN

Los oligodendrocitos (OLGs) son células altamente ramificadas cuya función principal es la producción de mielina en el SNC mediante el ensanchamiento de los extremos distales de sus prolongaciones en determinados tramos de axón. Para llevar a cabo este proceso, los OLGs deben encontrarse en su estadio más maduro y es imprescindible la generación de prolongaciones complejas para la mielinización. Los OLGs se diferencian a partir de células precursoras proliferativas (células precursoras de oligodendrocitos, OPCs).

Durante la migración, mediante sus prolongaciones, los OPCs pueden escanear y explorar el microambiente celular y, según la retroalimentación recibida, estos pueden continuar su migración, proliferar o diferenciarse e iniciar el proceso de mielinización⁽⁷³⁾. De tal manera que el proceso de diferenciación de los OLGs es regulado por distintas moléculas de microambiente celular. Se ha reportado el papel de la melatonina (MEL) en la modulación del citoesqueleto en diversas estirpes celulares, entre ellas neuronas y sus precursores y la influencia de esta molécula en el restablecimiento de la organización del citoesqueleto en enfermedades neuropsiquiátricas y neurodegenerativas⁽¹⁾.

Para dilucidar un posible papel de la MEL en el proceso de mielinización en el SNC, en este trabajo las células oligodendrogiales se incubaron con una concentración de MEL 100 nM, la cual se ha reportado en el líquido cefalorraquídeo durante la fase de oscuridad del ciclo de iluminación ambiental^(121,152), por lo que consideramos que esta concentración está en un rango fisiológico. Además, esta concentración de MEL ha sido efectiva en estudios previos de nuestro grupo de trabajo para inducir la dendritogénesis y la formación de axones^(143,144,153).

En este trabajo se encontró que en oligodendrocitos incubados durante 24h con MEL, el número de filopodios, así como el número de intersecciones en el análisis de Sholl, fue significativamente mayor respecto del vehículo. Asimismo, a las 24h de incubación con MEL la inmunodetección de tubulina- α acetilada reveló una proporción significativamente mayor de precursores de oligodendrocitos con 5 o más prolongaciones primarias y a las 48h de incubación una proporción mayor de OPCs con 4 o más ramificaciones secundarias que en las células incubadas con el vehículo. También a las 48h de

incubación, se encontró un incremento significativo en el volumen densitométrico de las bandas inmunorreactivas a tubulina- α acetilada en extractos de OPCs, y a las 72h de incubación se observó una mayor intensidad de fluorescencia de los marcadores de diferenciación oligodendroglial O4 y MBP en células incubadas con MEL, respecto al vehículo.

Con el objetivo de caracterizar las células obtenidas de nervio óptico de rata se llevó a cabo la detección por inmunofluorescencia del factor de transcripción Olig2 después de 24h de cultivo. El 94% de las células aisladas expresó el marcador de linaje oligodendroglial Olig2. A las 48h, más del 70% y del 40% de estos oligodendrocitos expresaron los marcadores de diferenciación O4 y MBP, respectivamente. La expresión del factor de transcripción Olig2 es específica de las células del linaje oligodendroglial y se expresa tanto en las células precursoras como en los diferentes estadios de diferenciación y maduración de los OLGs⁽¹⁵⁴⁾. En cuanto a la sulfatida reconocida por el anticuerpo O4, se considera un marcador de pre-OLGs y de OLGs inmaduros, mientras que la proteína básica de mielina (MBP) se expresa en OLGs maduros⁽³⁹⁾. La contracción de los microfilamentos de actina permitió observar variabilidad en la complejidad morfológica de las células, es decir, se presentan células cuyo soma tiene aspecto triangular o poligonal con filopodios, células extendidas con lamelipodios, otras con somas redondos y algunas ramificaciones primarias (que parten directamente del soma), así como células con la morfología característica de los OLGs: con un soma redondo del que parten múltiples ramificaciones primarias, secundarias y terciarias distribuidas con un patrón regular alrededor del soma. En concordancia con lo reportado con Song et al (2001), en este trabajo se observó una distribución homogénea de microfilamentos de actina tanto en el soma como en las prolongaciones oligodendrogiales. La expresión de Olig2 en las células que todavía no presentan una morfología característica de OLGs y en las que se analizaron los filopodios y lamelipodios confirma que se trata de células del linaje oligodendroglial.

Tanto los filopodios como los lamelipodios son estructuras formadas por microfilamentos de actina. Los filopodios son protrusiones pequeñas y estrechas formadas por haces paralelos de microfilamentos y se ha postulado que al ensancharse podrían anteceder a

la formación de los lamelipodios, que son más amplios y contienen redes de microfilamentos dispuestos en forma ortogonal⁽¹¹⁵⁾. Estudios sugieren que la dinámica de formación de filopodios y su posterior ensanchamiento para formar lamelipodios contribuye y precede a la formación de las ramificaciones oligodendrogiales^(41,93). La formación de los lamelipodios requiere la ramificación de los microfilamentos mediado por el complejo N-WASP/Arp2/3⁽⁴¹⁾. En este trabajo se encontró un número significativamente mayor de filopodios en OLGs incubados con MEL durante 24h. Este resultado es consistente con evidencias previas de nuestro grupo de trabajo, ya que en células de neuroblastoma N1E-115 tratadas con MEL se encontró una mayor proporción de células con filopodios y neuritas⁽¹⁵⁵⁾.

De este resultado podemos inferir una posible acción de la MEL sobre los microfilamentos de actina en las células oligodendrogiales. Sin embargo, con los experimentos realizados hasta el momento no es posible esclarecer si la MEL juega un papel en la ramificación de los microfilamentos para la formación de lamelipodios, ya que no se encontraron diferencias significativas en el número o en el área en estas estructuras. Las proteínas que se unen a los microfilamentos de actina y que participan en la formación de haces paralelos como los presentes en los filopodios o en la formación de mallas o redes de actina que forman los lamelipodios son distintas y es posible que alguna de estas proteínas sea blanco de la acción de la melatonina. En particular, la formación de haces paralelos de microfilamentos de actina se favorece mediante la proteína fascina, cuya actividad se regula mediante fosforilación en el residuo de serina 39 (S39)⁽¹⁵⁶⁾. En este sentido existe evidencia de que la MEL puede modular la actividad de la fascina, río-abajo de la cinasa ERK, en células de cáncer de mama MCF7⁽¹⁵⁷⁾. Además, la MEL podría incidir en la formación de filopodios mediante la modulación de la actividad de las cinasas PKC y ROCK, implicadas en la formación de neuritas⁽¹⁵⁵⁾.

En los OLGs incubados con MEL durante 24h también se encontró un número significativamente mayor de intersecciones en el análisis de Sholl, lo que indica un mayor número de prolongaciones primarias como sus ramificaciones secundarias, terciarias, etc., es decir, los OLGs incubados con MEL desarrollaron una mayor complejidad morfológica. En este sentido, evidencia previa de nuestro grupo de trabajo indica que la

MEL induce la formación de dendritas y su ramificación, es decir, favorece el desarrollo de árboles dendríticos complejos en neuronas hilares del hipocampo de la rata⁽¹⁴³⁾. Uno de los principales mecanismos que subyacen al desarrollo de una morfología celular compleja es el proceso dinámico de ensamble y desensamble de los componentes del citoesqueleto y es regulado por factores intracelulares y extracelulares. Como ya se mencionó, podemos inferir que la MEL puede modular la organización de los microfilamentos para la formación de protrusiones tempranas como los filopodios y las neuritas en concordancia con publicaciones anteriores de nuestro grupo de trabajo^(155,158). Sin embargo, la elongación de las protrusiones celulares tempranas para generar prolongaciones de mayor longitud y ramificaciones de las mismas implica también la participación de los microtúbulos y la interacción entre ambos componentes del citoesqueleto.

Las subunidades de tubulina que conforman los microtúbulos pueden ser modificadas covalentemente mediante acetilación o tirosinación una vez polimerizadas. Estas reacciones enzimáticas se revierten cuando la molécula de tubulina se despolimeriza, lo cual proporciona un indicio útil de la estabilidad de los microtúbulos⁽¹⁰⁸⁾. Para evaluar el efecto de la MEL en el citoesqueleto microtubular, en este trabajo se detectó la tubulina- α acetilada mediante dos diferentes estrategias: por inmunofluorescencia en OPCs incubados con MEL durante 24 y 48h, y por Western blot en extractos proteicos de OPCs obtenidos tras 48h de incubación con la indolamina o el vehículo. Los resultados obtenidos indican que la MEL favorece la formación de prolongaciones oligodendrogiales y que éstas tengan un mayor número de ramificaciones, es decir, que sean más complejas, lo cual concuerda con los resultados mencionados anteriormente.

En la detección por Western Blot realizada a partir de extractos de OPCs, se encontró una sola banda inmunorreactiva por carril, con un peso molecular aproximado de 52 kDa, consistente con el peso molecular reportado para la tubulina- α (~50 kDa) y su forma acetilada en el residuo de lisina 40 (AcK40; ~55 kDa). En los extractos de OPCs que fueron incubados durante 48h con MEL, el volumen densitométrico de las bandas inmunorreactivas correspondientes a la tubulina- α acetilada fue significativamente mayor que en los extractos de OPCs incubados con vehículo. Esto indica que, en presencia de

MEL, la cantidad relativa de tubulina- α acetilada aumenta. Dado que en la tubulina- α no se encontró diferencia significativa entre tratamientos, los resultados sugieren que la MEL favorece la acetilación de esta proteína. La acetilación de la tubulina confiere una mayor estabilidad a los microtúbulos y se ha reportado que esta modificación postraducciona l incrementa conforme los oligodendrocitos alcanzan un estadio avanzado de maduración⁽⁴¹⁾. El efecto de la MEL sobre la acetilación podría estar mediado tanto por la enzima encargada de acetilar (tubulina acetiltransferasa, TAT) o de desacetilar a la tubulina (SIRT2). En este sentido, se ha descrito que la MEL podría regular a la baja la actividad de la SIRT2⁽¹¹²⁾, lo que sería congruente con un aumento en la acetilación de la tubulina- α .

La inmunodetección de los marcadores de diferenciación O4 y MBP en los OPCs incubados con MEL durante 72h reveló una mayor intensidad de fluorescencia, respecto del vehículo. Esto sugiere una mayor expresión de estas moléculas en presencia de la indolamina y un efecto inductor de la diferenciación oligodendrog lial. Estos resultados encuentran apoyo en el trabajo de Olivier y colaboradores (2009) en el que reportan que favorecer la maduración de los OLGs es uno de los mecanismos de la MEL para atenuar los defectos en la mielinización en un modelo de hipoxia prenatal en ratas. Por otra parte, existe evidencia de que la MBP puede actuar como una proteína de unión a los diferentes componentes del citoesqueleto oligodendrog lial y por lo tanto tener un papel funcional en la organización del mismo⁽¹¹⁶⁾. En este contexto, la MBP podría ser un blanco del efecto de la MEL para la modulación de la organización del citoesqueleto en los OLGs.

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la MEL favorece la diferenciación y maduración oligodendrog lial y que uno de sus mecanismos de acción es la modulación del citoesqueleto. Sin embargo, quedan por dilucidar los mecanismos moleculares específicos relacionados con la dinámica del citoesqueleto mediante los cuales la MEL favorece una morfología más compleja en los oligodendrocitos.

10. CONCLUSIÓN

La melatonina favorece el proceso de maduración y diferenciación oligodendroglial, mediante la modulación del citoesqueleto, necesaria para el proceso de mielinización.

11. PERSPECTIVAS

Para comenzar a dilucidar el mecanismo molecular mediante el cual actúa la MEL en la organización del citoesqueleto oligodendroglial se determinará la expresión los receptores de melatonina (MT1 y MT2) en las células oligodendrogliales. Asimismo, se evaluará el efecto farmacológico del antagonista competitivo de los receptores de MEL, luzindol.

Por otra parte, para comenzar a abordar el posible mecanismo de regulación de la MEL en el citoesqueleto microtubular de los OLGs se evaluará el efecto de la MEL en la expresión y en la actividad de las enzimas que regulan la acetilación de la tubulina (TAT y SIRT2).

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Benitez-King G. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J Pineal Res.* 2006;40(1):1–9.
2. García-Porrero Perez JA, Hurlé González JM. *Neuroanatomía humana.* Madrid, España: Editorial Médica Panamericana, S. A.; 2015. 404 p.
3. Tortora GJ, Derrickson B. *Principles of anatomy and physiology.* 13th ed. Editorial Médica Panamericana, S. A.; 2015. 1130 p.
4. Dawson MRL, Polito A, Levine JM, Reynolds R. NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Mol Cell Neurosci.* 2003;24(2):476–88.
5. Clarke LE, Barres BA. Emerging roles of astrocytes in neural circuit development. *Nat Rev Neurosci.* 2013;14(5):311–21.
6. Fields RD, Araque A, Johansen-Berg H, Lim S-S, Lynch G, Nave K-A, et al. *Glial Biology in Learning and Cognition.* Vol. 20, *The Neuroscientist.* Sage CA: Los Angeles, CA; 2014. p. 426–31.
7. Sampaio-Baptista C, Johansen-Berg H. White Matter Plasticity in the Adult Brain. *Neuron.* 2017;96(6):1239–51.
8. Scholz J. Training induces changes in white matter architecture. Vol. 12. 2009. p. 1370–1.
9. Giedd JN. Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1021:77–85.
10. Lebel C, Gee M, Camicioli R, Wieler M, Martin W, Beaulieu C. Diffusion tensor imaging of white matter tract evolution over the lifespan. *Neuroimage.* 2012;60(1):340–52.
11. Sexton CE, Walhovd KB, Storsve AB, Tamnes CK, Westlye LT, Johansen-Berg H, et al. Accelerated changes in white matter microstructure during aging: a longitudinal diffusion tensor imaging study. *J Neurosci.* 2014;34(46):15425–36.
12. Fields RD. White matter matters. *Sci Am.* 2008;298(3):42–9.
13. Fernández Calderón V. Navegación mediante retroalimentación visual de un robot móvil basado en técnicas de aprendizaje automático Deep Learning [Internet]. España; 2018 [cited 2019 Jul 22]. Available from: <https://idus.us.es/xmlui/bitstream/handle/11441/85343/TFG-1996-FERNANDEZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
14. Kettenmann H, Verkhratsky A. Glia Cells: Neuroglia. In: Pfaff DW, Volkow ND, editors. *Neuroscience in the 21st century : from basic to clinical.* 2nd ed. Springer; 2016. p. 475–506.

15. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia A-S, White LE, editors. Neurociencia. 5a ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2016. 759 p.
16. Fox SI, Olivares Bari S, Padilla Sierra G. Fisiología humana [Internet]. McGraw-Hill; 2017 [cited 2019 Jul 22]. 834 p. Available from: http://www.ingebook.com/ib/NPcd/IB_BooksVis?cod_primaria=1000187&codigo_libro=8264
17. Kettenmann H, Hanisch U-K, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of Microglia. *Physiol Rev* [Internet]. 2011 [cited 2019 Jul 8];91(2):461–553. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21527731>
18. Nakajima K, Kohsaka S. Microglia: Activation and Their Significance in the Central Nervous System. *J Biochem* [Internet]. 2001 [cited 2019 Jul 8];130(2):169–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11481032>
19. Lunn KF, Baas PW, Duncan ID. Microtubule organization and stability in the oligodendrocyte. *J Neurosci*. 1997;17(13):4921–32.
20. Nave K-A. Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature*. 2010;468(7321):244–52.
21. Saab AS, Tzvetanova ID, Nave K-A. The role of myelin and oligodendrocytes in axonal energy metabolism. *Curr Opin Neurobiol*. 2013;23(6):1065–72.
22. Zeis T, Enz L, Schaeren-Wiemers N. The immunomodulatory oligodendrocyte. *Brain Res*. 2016;1641(Pt A):139–48.
23. Aggarwal S, Yurlova L, Simons M. Central nervous system myelin: structure, synthesis and assembly. *Trends Cell Biol*. 2011;21(10):585–93.
24. Stassart RM, Möbius W, Nave K-A, Edgar JM. The Axon-Myelin Unit in Development and Degenerative Disease. *Front Neurosci* [Internet]. 2018[cited 2019 Jul 29];12:467. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2018.00467/full>
25. Simons M, Misgeld T, Kerschensteiner M. A unified cell biological perspective on axon–myelin injury. *J Cell Biol* [Internet]. 2014[cited 2019 Jul 29];206(3):335–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25092654>
26. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Principios de bioquímica [Internet]. Omega; 2009 [cited 2019 Jul 22]. Available from: <https://books.google.com.mx/books?id=7kuXQwAACAAJ&dq=lehninger+2007&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjOle6R6cjjAhVBL6wKHeR5AYMQ6AEILDAA>
27. Fields RD. White matter in learning, cognition and psychiatric disorders. Vol. 31, *Trends in neurosciences*. 2008. p. 361–70.
28. McKerracher L, David S, Jackson DL, Kottis V, Dunn RJ, Braun PE. Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite

- growth. *Neuron*. 1994;13(4):805–11.
29. Lunn MPT, Crawford TO, Hughes RAC, Griffin JW, Sheikh KA. Anti-myelin-associated glycoprotein antibodies alter neurofilament spacing. *Brain* [Internet]. 2002 [cited 2019 Jul 18];125(4):904–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11912122>
 30. Yin X, Crawford TO, Griffin JW, Tu P h, Lee VM, Li C, et al. Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. *J Neurosci* [Internet]. 1998 [cited 2019 Jul 18];18(6):1953–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9482781>
 31. Hsieh ST, Kidd GJ, Crawford TO, Xu Z, Lin WM, Trapp BD, et al. Regional modulation of neurofilament organization by myelination in normal axons. *J Neurosci* [Internet]. 1994 [cited 2019 Jul 18];14(11 Pt 1):6392–401. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7965044>
 32. Rushton WAH. A theory of the effects of fibre size in medullated nerve. *J Physiol* [Internet]. 1951 [cited 2019 Jul 18];115(1):101–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14889433>
 33. Salzer JL. Clustering sodium channels at the node of Ranvier: close encounters of the axon-glia kind. *Neuron* [Internet]. 1997 [cited 2019 Jul 18];18(6):843–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9208851>
 34. Zalc B, Colman DR. Origins of Vertebrate Success. *Science* (80-) [Internet]. 2000 [cited 2019 Jul 18];288(5464):271c – 271. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10777405>
 35. Hartline DK, Colman DR. Rapid Conduction and the Evolution of Giant Axons and Myelinated Fibers. *Curr Biol* [Internet]. 2007 [cited 2019 Jul 22];17(1):R29–35. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982206025231>
 36. Jean Harry G, Toews AD. Chapter 4 - Myelination, Dysmyelination, and Demyelination. In: Slikker W, Chang LWBT-H of DN, editors. San Diego: Academic Press; 1998. p. 87–115. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780126488609500078>
 37. Bechler ME, Swire M, Ffrench-Constant C. Intrinsic and adaptive myelination-A sequential mechanism for smart wiring in the brain. *Dev Neurobiol* [Internet]. 2018 [cited 2019 Jul 22];78(2):68–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28834358>
 38. Redmond SA, Mei F, Eshed-Eisenbach Y, Osso LA, Leshkowitz D, Shen Y-AA, et al. Somatodendritic Expression of JAM2 Inhibits Oligodendrocyte Myelination. *Neuron* [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 22];91(4):824–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27499083>

39. Barateiro A, Fernandes A. Temporal oligodendrocyte lineage progression: In vitro models of proliferation, differentiation and myelination. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2014 ;1843(9):1917–29.
40. Ludwin SK. The Pathobiology of the Oligodendrocyte. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 1997; 56(2):111–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/00005072-199702000-00001>
41. Bauer NG, Richter-Landsberg C, Ffrench-Constant C. Role of the oligodendroglial cytoskeleton in differentiation and myelination. *Glia.* 2009;57(16):1691–705.
42. Mabbott DJ, Noseworthy M, Bouffet E, Laughlin S, Rockel C. White matter growth as a mechanism of cognitive development in children. *Neuroimage.* 2006;33(3):936–46.
43. Nagy Z, Westerberg H, Klingberg T. Maturation of white matter is associated with the development of cognitive functions during childhood. *J Cogn Neurosci.* 2004;16(7):1227–33.
44. Kraft RH, Mitchell OR, Languis ML, Wheatley GH. Hemispheric asymmetries during six- to eight-year-olds performance of Piagetian conservation and reading tasks. *Neuropsychologia.* 1980;18(6):637–43.
45. Pujol J, Soriano-Mas C, Ortiz H, Sebastian-Galles N, Losilla JM, Deus J. Myelination of language-related areas in the developing brain. *Neurology.* 2006;66(3):339–43.
46. Liston C, Watts R, Tottenham N, Davidson MC, Niogi S, Ulug AM, et al. Frontostriatal microstructure modulates efficient recruitment of cognitive control. *Cereb Cortex.* 2006 ;16(4):553–60.
47. Casey BJ, Giedd JN, Thomas KM. Structural and functional brain development and its relation to cognitive development. *Biol Psychol.* 2000;54(1–3):241–57.
48. Walhovd KB, Fjell AM. White matter volume predicts reaction time instability. *Neuropsychologia.* 2007;45(10):2277–84.
49. Schmithorst VJ, Wilke M, Dardzinski BJ, Holland SK. Cognitive functions correlate with white matter architecture in a normal pediatric population: a diffusion tensor MRI study. *Hum Brain Mapp.* 2005;26(2):139–47.
50. Miller E. Intelligence and brain myelination: A hypothesis. Vol. 17, *Personality and Individual Differences.* 1994. 803–832 p.
51. Gold BT, Powell DK, Xuan L, Jiang Y, Hardy PA. Speed of lexical decision correlates with diffusion anisotropy in left parietal and frontal white matter: evidence from diffusion tensor imaging. *Neuropsychologia* [Internet]. 2007 [cited 2019 May 6];45(11):2439–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17509627>

52. Klingberg T, Hedehus M, Temple E, Salz T, Gabrieli JD, Moseley ME, et al. Microstructure of temporo-parietal white matter as a basis for reading ability: evidence from diffusion tensor magnetic resonance imaging. *Neuron* [Internet]. 2000 [cited 2019 May 6];25(2):493–500. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10719902>
53. Niogi SN, McCandliss BD. Left lateralized white matter microstructure accounts for individual differences in reading ability and disability. *Neuropsychologia* [Internet]. 2006 [cited 2019 May 6];44(11):2178–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16524602>
54. Nestor PG, Kubicki M, Kuroki N, Gurrera RJ, Niznikiewicz M, Shenton ME, et al. Episodic memory and neuroimaging of hippocampus and fornix in chronic schizophrenia. *Psychiatry Res Neuroimaging* [Internet]. 2007 [cited 2019 May 6];155(1):21–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17395435>
55. Bengtsson SL, Nagy Z, Skare S, Forsman L, Forssberg H, Ullén F. Extensive piano practicing has regionally specific effects on white matter development. *Nat Neurosci* [Internet]. 2005 [cited 2019 May 6];8(9):1148–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16116456>
56. Hyde KL, Zatorre RJ, Griffiths TD, Lerch JP, Peretz I. Morphometry of the amusic brain: a two-site study. *Brain* [Internet]. 2006 [cited 2019 May 6];129(10):2562–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16931534>
57. Coffey JC, McDermott KW. The regional distribution of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in the developing rat CNS: an in vivo immunohistochemical study. *J Neurocytol.* 1997;26(3):149–61.
58. Wiggins RC. Myelin development and nutritional insufficiency. *Brain Res.* 1982;257(2):151–75.
59. Paus T, Collins DL, Evans AC, Leonard G, Pike B, Zijdenbos A. Maturation of white matter in the human brain: a review of magnetic resonance studies. *Brain Res Bull.* 2001;54(3):255–66.
60. Hassink RI, Hiltbrunner B, Muller S, Lutschg J. Assessment of brain maturation by T2-weighted MRI. *Neuropediatrics.* 1992;23(2):72–4.
61. Costello DJ, Eichler AF, Eichler FS. Leukodystrophies: classification, diagnosis, and treatment. *Neurologist.* 2009;15(6):319–28.
62. Bermejo Velasco PE, Blasco Quílez MR, Sánchez López AJ, García Merino A. Enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central. Concepto, clasificación y epidemiología. *Med - Programa Form Médica Contin Acreditado* [Internet]. 2011;10(75):5065–8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304541211700567>

63. Fernández O, Fernández VE, Guerrero M. Enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central. *Med - Programa Form Médica Contin Acreditado* [Internet]. 2015;11(77):4601–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304541215000797>
64. Grinspan J. Cells and Signaling in Oligodendrocyte Development. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2002;61(4):297–306. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/jnen/61.4.297>
65. Hakak Y, Walker JR, Li C, Wong WH, Davis KL, Buxbaum JD, et al. Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(8):4746–51.
66. Tkachev D, Mimmack ML, Ryan MM, Wayland M, Freeman T, Jones PB, et al. Oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder. *Lancet* (London, England). 2003;362(9386):798–805.
67. Stewart SE, Platko J, Fagerness J, Birns J, Jenike E, Smoller JW, et al. A genetic family-based association study of OLIG2 in obsessive-compulsive disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 2007;64(2):209–14.
68. Purger D, Gibson EM, Monje M. Myelin plasticity in the central nervous system. *Neuropharmacology*. 2016;110(Pt B):563–73.
69. Foster AY, Bujalka H, Emery B. Axoglial interactions in myelin plasticity: Evaluating the relationship between neuronal activity and oligodendrocyte dynamics. *Glia* [Internet]. 2019 [cited 2019 Jul 22];glia.23629. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31038804>
70. Kaller MS, Lazari A, Blanco-Duque C, Sampaio-Baptista C, Johansen-Berg H. Myelin plasticity and behaviour — connecting the dots. *Curr Opin Neurobiol* [Internet]. 2017 [cited 2019 Jul 22];47:86–92. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0959438817300983>
71. Jakovcevski I, Filipovic R, Mo Z, Rakic S, Zecevic N. Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain. *Front Neuroanat*. 2009;3:5.
72. Kessar N, Pringle N, Richardson WD. Specification of CNS glia from neural stem cells in the embryonic neuroepithelium. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* [Internet]. 2008;363(1489):71–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2605487/>
73. Kirby BB, Takada N, Latimer AJ, Shin J, Carney TJ, Kelsh RN, et al. In vivo time-lapse imaging shows dynamic oligodendrocyte progenitor behavior during zebrafish development. *Nat Neurosci* [Internet]. 2006 ;9:1506. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nn1803>

74. Zhang S-C. Defining glial cells during CNS development. Vol. 2, Nature reviews. Neuroscience. 2001. 840–843 p.
75. Pfeiffer SE, Warrington AE, Bansal R. The oligodendrocyte and its many cellular processes. Trends Cell Biol [Internet]. 1993;3(6):191–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/096289249390213K>
76. Hughes EG, Kang SH, Fukaya M, Bergles DE. Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain. Nat Neurosci. 2013;16(6):668–76.
77. Cui QL, Frago G, Miron VE, Darlington PJ, Mushynski WE, Antel J, et al. Response of Human Oligodendrocyte Progenitors to Growth Factors and Axon Signals. J Neuropathol Exp Neurol [Internet]. 2010 [cited 2019 Jul 23];69(9):930–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20720504>
78. Simpson PB, Armstrong RC. Intracellular signals and cytoskeletal elements involved in oligodendrocyte progenitor migration. Glia. 1999 Mar;26(1):22–35.
79. Sasahara M, Fries JW, Raines EW, Gown AM, Westrum LE, Frosch MP, et al. PDGF B-chain in neurons of the central nervous system, posterior pituitary, and in a transgenic model. Cell [Internet]. 1991 [cited 2019 Jul 23];64(1):217–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1986868>
80. Yeh HJ, Ruit KG, Wang YX, Parks WC, Snider WD, Deuel TF. PDGF A-chain gene is expressed by mammalian neurons during development and in maturity. Cell [Internet]. 1991 [cited 2019 Jul 23];64(1):209–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1986867>
81. Baron W, Shattil SJ, French-Constant C. The oligodendrocyte precursor mitogen PDGF stimulates proliferation by activation of $\alpha(v)\beta_3$ integrins. EMBO J. 2002;21(8):1957–66.
82. Maier O, van der Heide T, van Dam A-M, Baron W, de Vries H, Hoekstra D. Alteration of the extracellular matrix interferes with raft association of neurofascin in oligodendrocytes. Potential significance for multiple sclerosis? Mol Cell Neurosci. 2005;28(2):390–401.
83. Siskova Z, Baron W, de Vries H, Hoekstra D. Fibronectin impedes “myelin” sheet-directed flow in oligodendrocytes: a role for a β_1 integrin-mediated PKC signaling pathway in vesicular trafficking. Mol Cell Neurosci. 2006;33(2):150–9.
84. Barres BA, Lazar MA, Raff MC. A novel role for thyroid hormone, glucocorticoids and retinoic acid in timing oligodendrocyte development. Development [Internet]. 1994 [cited 2019 Jul 23];120(5):1097–108. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8026323>
85. Barres BA, Raff MC. Proliferation of oligodendrocyte precursor cells depends on electrical activity in axons. Nature. 1993;361(6409):258–60.

86. Barres BA, Hart IK, Coles HS, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, et al. Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell*. 1992; 70(1):31–46.
87. Temple S, Raff MC. Differentiation of a bipotential glial progenitor cell in single cell microculture. *Nature* [Internet]. 1985 [cited 2019 Jul 23];313(5999):223–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3969137>
88. Barres BA, Hart IK, Coles HSR, Burne JF, Voyvodic JT, Richardson WD, et al. Cell death in the oligodendrocyte lineage. *J Neurobiol* [Internet]. 1992 [cited 2019 Jul 23];23(9):1221–30. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/neu.480230912>
89. Chittajallu R, Aguirre A, Gallo V. NG2-positive cells in the mouse white and grey matter display distinct physiological properties. *J Physiol*. 2004;561(Pt 1):109–22.
90. Pringle NP, Richardson WD. A singularity of PDGF alpha-receptor expression in the dorsoventral axis of the neural tube may define the origin of the oligodendrocyte lineage. *Development*. 1993;117(2):525–33.
91. Craig A, Ling Luo N, Beardsley DJ, Wingate-Pearse N, Walker DW, Hohimer AR, et al. Quantitative analysis of perinatal rodent oligodendrocyte lineage progression and its correlation with human. *Exp Neurol*. 2003;181(2):231–40.
92. Sakry D, Trotter J. The role of the NG2 proteoglycan in OPC and CNS network function. *Brain Res*. 2016;1638(Pt B):161–6.
93. Song J, Goetz BD, Baas PW, Duncan ID. Cytoskeletal Reorganization during the Formation of Oligodendrocyte Processes and Branches. *Mol Cell Neurosci* [Internet]. 2001;17(4):624–36. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044743101909741>
94. Liu C, Götz J. Profiling Murine Tau with 0N, 1N and 2N Isoform-Specific Antibodies in Brain and Peripheral Organs Reveals Distinct Subcellular Localization, with the 1N Isoform Being Enriched in the Nucleus . Gong C-X, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013;8(12):e84849. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3875548/>
95. Sommer I, Schachner M. Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: An immunocytological study in the central nervous system. *Dev Biol* [Internet]. 1981;83(2):311–27. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0012160681904772>
96. Boda E, Vigano F, Rosa P, Fumagalli M, Labat-Gest V, Tempia F, et al. The GPR17 receptor in NG2 expressing cells: focus on in vivo cell maturation and participation in acute trauma and chronic damage. *Glia*. 2011;59(12):1958–73.
97. Armstrong RC, Dorn HH, Kufta C V, Friedman E, Dubois-Dalcq ME. Pre-Oligodendrocytes from Adult Human CNS. *J Neurosci*. 1992;12(4):1538–47.

98. Back SA, Luo NL, Borenstein NS, Levine JM, Volpe JJ, Kinney HC. Late oligodendrocyte progenitors coincide with the developmental window of vulnerability for human perinatal white matter injury. *J Neurosci*. 2001;21(4):1302–12.
99. Huppi PS, Warfield S, Kikinis R, Barnes PD, Zientara GP, Jolesz FA, et al. Quantitative magnetic resonance imaging of brain development in premature and mature newborns. *Ann Neurol*. 1998;43(2):224–35.
100. Reynolds R, P Wilkin G. Development of macroglial cells in rat cerebellum. II. An in situ immunohistochemical study of oligodendroglial lineage from precursor to mature myelinating cell. Vol. 102, *Development* (Cambridge, England). 1988. 409–425 p.
101. Hardy R, Reynolds R. Proliferation and differentiation potential of rat forebrain oligodendroglial progenitors both in vitro and in vivo. *Development*. 1991;111(4):1061–80.
102. Gravel M, Robert F, Kottis V, Gallouzi I-E, Pelletier J, Braun PE. 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: a novel RNA-binding protein that inhibits protein synthesis. *J Neurosci Res*. 2009;87(5):1069–79.
103. Lee J, Gravel M, Zhang R, Thibault P, Braun PE. Process outgrowth in oligodendrocytes is mediated by CNP, a novel microtubule assembly myelin protein. *J Cell Biol*. 2005;170(4):661–73.
104. Dean JM, Moravec MD, Grafe M, Abend N, Ren J, Gong X, et al. Strain-specific differences in perinatal rodent oligodendrocyte lineage progression and its correlation with human. *Dev Neurosci*. 2011;33(3–4):251–60.
105. Barateiro A, Brites D, Fernandes A. Oligodendrocyte Development and Myelination in Neurodevelopment: Molecular Mechanisms in Health and Disease. *Curr Pharm Des [Internet]*. 2016 [cited 2019 Aug 28];22(6):656–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26635271>
106. Bjelke B, Seiger A. Morphological distribution of MBP-like immunoreactivity in the brain during development. *Int J Dev Neurosci*. 1989;7(2):145–64.
107. Ross JL, Ali MY, Warshaw DM. Cargo transport: molecular motors navigate a complex cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 2008;20(1):41–7.
108. Lodish H. *Biología Celular y molecular*. In: Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, et al., editors. *Molecular cell biology Español*. 7a edición. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2015. p. 1154.
109. Wloga D, Joachimiak E, Fabczak H. Tubulin Post-Translational Modifications and Microtubule Dynamics. *Int J Mol Sci [Internet]*. 2017;18(10):2207. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29065455>

110. Kreitzer G, Liao G, Gundersen GG. Detyrosination of tubulin regulates the interaction of intermediate filaments with microtubules in vivo via a kinesin-dependent mechanism. *Mol Biol Cell*. 1999;10(4):1105–18.
111. Li W, Zhang B, Tang J, Cao Q, Wu Y, Wu C, et al. Sirtuin 2, a mammalian homolog of yeast silent information regulator-2 longevity regulator, is an oligodendroglial protein that decelerates cell differentiation through deacetylating alpha-tubulin. *J Neurosci*. 2007;27(10):2606–16.
112. Southwood CM, Peppi M, Dryden S, Tainsky MA, Gow A. Microtubule deacetylases, SirT2 and HDAC6, in the nervous system. *Neurochem Res*. 2007;32(2):187–95.
113. Terada N, Kidd GJ, Kinter M, Bjartmar C, Moran-Jones K, Trapp BD. Beta IV tubulin is selectively expressed by oligodendrocytes in the central nervous system. *Glia*. 2005;50(3):212–22.
114. Calderón Salinas JV. *Revista de Educación Bioquímica* [Internet]. México; 2016 [cited 2019 Jul 30]. p. 147. Available from: http://bq.unam.mx/wikidep/pmwiki.php/Reb/HomePagehttp://www.facmed.unam.mx/marco/index.php?dir_ver=101
115. Bacon C, Lakics V, Machesky L, Rumsby M. N-WASP regulates extension of filopodia and processes by oligodendrocyte progenitors, oligodendrocytes, and Schwann cells-implications for axon ensheathment at myelination. *Glia*. 2007;55(8):844–58.
116. Boggs JM. Myelin basic protein: a multifunctional protein. *Cell Mol Life Sci*. 2006;63(17):1945–61.
117. Pham-Dinh D, Mattei MG, Nussbaum JL, Roussel G, Pontarotti P, Roeckel N, et al. Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a member of a subset of the immunoglobulin superfamily encoded within the major histocompatibility complex. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 1993 [cited 2019 Jul 19];90(17):7990–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8367453>
118. Fitzner D, Schneider A, Kippert A, Möbius W, Willig KI, Hell SW, et al. Myelin basic protein-dependent plasma membrane reorganization in the formation of myelin. Vol. 25, *The EMBO Journal*. 2006. p. 5037–48.
119. Mishima K, Okawa M, Hishikawa Y, Hozumi S, Hori H, Takahashi K. Morning bright light therapy for sleep and behavior disorders in elderly patients with dementia. *Acta Psychiatr Scand* [Internet]. 1994 [cited 2019 Aug 5];89(1):1–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8140901>
120. Jiang HK, Wang JY. Diurnal melatonin and cortisol secretion profiles in medicated schizophrenic patients. *J Formos Med Assoc* [Internet]. 1998 [cited 2019 Aug 5];97(12):830–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9884485>

121. Reiter RJ. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. *Experientia*. 1993;49(8):654–64.
122. Cardinali DP, Rosner JM. Metabolism of serotonin by the rat retina in vitro. *J Neurochem* [Internet]. 1971 [cited 2019 May 27];18(9):1769–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5571113>
123. Tosini G, Menaker M. The clock in the mouse retina: melatonin synthesis and photoreceptor degeneration. *Brain Res* [Internet]. 1998 [cited 2019 May 27];789(2):221–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899397014467?via%3Dihub#bBIB31>
124. Conti A, Conconi S, Hertens E, Skwarlo-Sonta K, Markowska M, Maestroni JM. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. *J Pineal Res* [Internet]. 2000 [cited 2019 May 27];28(4):193–202. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10831154>
125. Champier J, Claustrat B, Besançon R, Eymin C, Killer C, Jouvet A, et al. Evidence for tryptophan hydroxylase and hydroxy-indol-O-methyl-transferase mRNAs in human blood platelets. *Life Sci* [Internet]. 1997 [cited 2019 May 27];60(24):2191–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9188762>
126. Bubenik GA. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance. *Dig Dis Sci* [Internet]. 2002 [cited 2019 May 27];47(10):2336–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12395907>
127. Slominski A, Fischer TW, Zmijewski MA, Wortsman J, Semak I, Zbytek B, et al. On the Role of Melatonin in Skin Physiology and Pathology. [cited 2019 May 27]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1317110/pdf/nihms4460.pdf>
128. Carrillo-Vico A, Calvo JR, Abreu P, Lardone PJ, García-Maurino S, Reitter RJ, et al. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J* [Internet]. 2004 [cited 2019 May 27];18(3):537–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14715696>
129. de Almeida EA, Di Mascio P, Harumi T, Spence DW, Moscovitch A, Hardeland R, et al. Measurement of melatonin in body fluids: standards, protocols and procedures. *Childs Nerv Syst* [Internet]. 2011 [cited 2019 May 27];27(6):879–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21104186>
130. Liu Y-J, Zhuang J, Zhu H-Y, Shen Y-X, Tan Z-L, Zhou J-N. Cultured rat cortical astrocytes synthesize melatonin: absence of a diurnal rhythm. *J Pineal Res* [Internet]. 2007 [cited 2019 Jul 17];43(3):232–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17803519>

131. Reiter RJ, Tan D-X, Manchester LC, Paredes SD, Mayo JC, Sainz RM. Melatonin and Reproduction Revisited. *Biol Reprod* [Internet]. 2009 [cited 2019 May 30];81(3):445–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19439728>
132. Lewy AJ, Emens J, Jackman A, Yuhas K. Circadian Uses of Melatonin in Humans. *Chronobiol Int* [Internet]. 2006 [cited 2019 May 30];23(1–2):403–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16687313>
133. Arendt J. Melatonin and Human Rhythms. *Chronobiol Int* [Internet]. 2006 [cited 2019 May 30];23(1–2):21–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16687277>
134. Carrillo-Vico A, Reiter RJ, Lardone PJ, Herrera JL, Fernández-Montesinos R, Guerrero JM, et al. The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. *Curr Opin Investig Drugs* [Internet]. 2006 [cited 2019 May 30];7(5):423–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16729718>
135. Bongiorno D, Ceraulo L, Ferrugia M, Filizzola F, Ruggirello A, Turco Liveri V. Localization and interactions of melatonin in dry cholesterol/lecithin mixed reversed micelles used as cell membrane models. Vol. 38, *Journal of pineal research*. 2005. 292–298 p.
136. Jou M-J, Peng T-I, Reiter RJ, Jou S-B, Wu H-Y, Wen S-T. Visualization of the antioxidative effects of melatonin at the mitochondrial level during oxidative stress-induced apoptosis of rat brain astrocytes. *J Pineal Res*. 2004;37(1):55–70.
137. Soto-Vega E, Meza I, Ramirez-Rodriguez G, Benitez-King G. Melatonin stimulates calmodulin phosphorylation by protein kinase C. *J Pineal Res* [Internet]. 2004 [cited 2019 Aug 5];37(2):98–106. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15298668>
138. Karasek M, Carrillo-Vico A, Guerrero JM, Winczyk K, Pawlikowski M. Expression of melatonin MT(1) and MT(2) receptors, and ROR alpha(1) receptor in transplantable murine Colon 38 cancer. *Neuro Endocrinol Lett* [Internet]. 2002 [cited 2019 Aug 5];23 Suppl 1:55–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12019353>
139. Olivier P, Fontaine RH, Loron G, Van Steenwinckel J, Biran V, Massonneau V, et al. Melatonin promotes oligodendroglial maturation of injured white matter in neonatal rats. *PLoS One*. 2009;4(9):e7128.
140. Guerrero JM, Carrillo-Vico A, Lardone PJ. La melatonina | *Investigación y Ciencia* [Internet]. 2007 [cited 2019 Jul 23]. p. 30–8. Available from: <https://www.investigacionyciencia.es/revistas/investigacion-y-ciencia/ventanas-de-la-mente-450/la-melatonina-246>

141. Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Rosales-Corral SA. Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. *Hum Reprod Update* [Internet]. 2014 [cited 2019 Jul 18];20(2):293–307. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24132226>
142. Ramirez-Rodriguez G, Ortíz-López L, Domínguez-Alonso A, Benítez-King GA, Kempermann G. Chronic treatment with melatonin stimulates dendrite maturation and complexity in adult hippocampal neurogenesis of mice. *J Pineal Res* [Internet]. 2011 [cited 2019 Jul 18];50(1):29–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20880317>
143. Domínguez-Alonso A, Ramírez-Rodríguez G, Benítez-King G. Melatonin increases dendritogenesis in the hilus of hippocampal organotypic cultures. *J Pineal Res* [Internet]. 2012 [cited 2019 Jul 18];52(4):427–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22257024>
144. Galvan-Arrieta T, Trueta C, Cercos MG, Valdes-Tovar M, Alarcon S, Oikawa J, et al. The role of melatonin in the neurodevelopmental etiology of schizophrenia: A study in human olfactory neuronal precursors. *J Pineal Res*. 2017 Oct;63(3).
145. Reiter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol*. 1998;56(3):359–84.
146. Jou M-J, Peng T-I, Yu P-Z, Jou S-B, Reiter RJ, Chen J-Y, et al. Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis. *J Pineal Res*. 2007;43(4):389–403.
147. Reiter RJ, Benitez-King G. Melatonin reduces neuronal loss and cytoskeletal deterioration: implications for Psychiatry. *Salud Ment* [Internet]. 2009;32:3–11. Available from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33252009000100002&nrm=iso
148. Miller SL, Yawno T, Alers NO, Castillo-Melendez M, Supramaniam VG, VanZyl N, et al. Antenatal antioxidant treatment with melatonin to decrease newborn neurodevelopmental deficits and brain injury caused by fetal growth restriction. *J Pineal Res*. 2014;56(3):283–94.
149. Villapol S, Fau S, Renolleau S, Biran V, Charriaut-Marlangue C, Baud O. Melatonin promotes myelination by decreasing white matter inflammation after neonatal stroke. *Pediatr Res*. 2011;69(1):51–5.
150. Moriya T, Horie N, Mitome M, Shinohara K. Melatonin influences the proliferative and differentiative activity of neural stem cells. *J Pineal Res*. 2007;42(4):411–8.
151. Sotthibundhu A, Phansuwan-Pujito P, Govitrapong P. Melatonin increases proliferation of cultured neural stem cells obtained from adult mouse subventricular zone. *J Pineal Res*. 2010;49(3):291–300.

152. Tan D-X, Manchester LC, Reiter RJ. CSF generation by pineal gland results in a robust melatonin circadian rhythm in the third ventricle as an unique light/dark signal. *Med Hypotheses* [Internet]. 2016 [cited 2019 Aug 5];86:3–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26804589>
153. Domínguez-Alonso A, Valdés-Tovar M, Solís-Chagoyán H, Benítez-King G. Melatonin Stimulates Dendrite Formation and Complexity in the Hilar Zone of the Rat Hippocampus: Participation of the Ca⁺⁺/Calmodulin Complex. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2015 [cited 2019 Aug 5];16(1):1907–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25603176>
154. Lu QR, Yuk D, Alberta JA, Zhu Z, Pawlitzky I, Chan J, et al. Sonic Hedgehog–Regulated Oligodendrocyte Lineage Genes Encoding bHLH Proteins in the Mammalian Central Nervous System. *Neuron*. 2000;25(2):317–29.
155. Bellon A, Ortíz-López L, Ramírez-Rodríguez G, Antón-Tay F, Benítez-King G. Melatonin induces neuritogenesis at early stages in N1E-115 cells through actin rearrangements via activation of protein kinase C and Rho-associated kinase. *J Pineal Res* [Internet]. 2007 [cited 2019 Jul 31];42(3):214–21. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-079X.2006.00408.x>
156. Vignjevic D, Kojima S, Aratyn Y, Danciu O, Svitkina T, Borisy GG. Role of fascin in filopodial protrusion. *J Cell Biol* [Internet]. 2006 [cited 2019 Jul 31];174(6):863–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16966425>
157. Proietti S, Catizone A, Masiello MG, Dinicola S, Fabrizi G, Minini M, et al. Increase in motility and invasiveness of MCF7 cancer cells induced by nicotine is abolished by melatonin through inhibition of ERK phosphorylation. *J Pineal Res* [Internet]. 2018 [cited 2019 Jul 30];64(4):e12467. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jpi.12467>
158. Muñoz México Benitez F. El papel de la melatonina como modulador de la organización del citoesqueleto. *Salud Ment* [Internet]. 2000 [cited 2019 Jul 31];23(1):18–22. Available from: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=58212303>
159. Ferreira TA, Blackman A V, Oyrer J, Jayabal S, Chung AJ, Watt AJ, et al. Neuronal morphometry directly from bitmap images. *Nat Methods* [Internet]. 2014 [cited 2019 Aug 1];11(10):982–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25264773>
160. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* [Internet]. 1951 [cited 2019 Apr 8];193(1):265–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14907713>
161. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* [Internet]. 1970 [cited 2019 Aug 5];227(5259):680–5. Available from: <http://www.nature.com/articles/227680a0>

13. APÉNDICE

13.1 Aislamiento y cultivo de oligodendrocitos de nervio óptico de rata

Tras el sacrificio de las ratas (n=6), se realiza un corte en la piel para descubrir el cráneo. Se realizan cortes laterales para remover el cráneo y poder retirar el cerebro. Al desprender el cerebro desde su región frontal se debe tener cuidado de no romper los nervios ópticos sino realizar un corte al nivel del quiasma óptico (región donde se unen ambos nervios). Posteriormente se hacen cortes al nivel de la base de los ojos para obtener los nervios ópticos íntegros. Para proceder a la obtención de una suspensión celular a partir de los nervios es necesario retirar las meninges que los recubren. Este procedimiento se realiza con unas pinzas de disección de punta muy fina y bajo un microscopio estereoscópico para observar bien la membrana a retirar. Desde el momento de su disección, los nervios ópticos se mantienen en disolución balanceada de Hank's (HBSS: KCl 5.33 mM, KH₂PO₄ 0.4412 mM, NaHCO₃ 4.1666 mM, NaCl 137.9310 mM, Na₂HPO₄ 0.3380 mM, D-Glucosa 5.5555 mM y Rojo de fenol 0.0266 mM) sin calcio y magnesio, pH 7.4, suplementada con albúmina sérica bovina (BSA) 0.1%, L-glutamina 2 mM y gentamicina 50 µg/mL, a 37°C. La disección se realiza en condiciones asépticas para prevenir la contaminación en el cultivo.

A partir de este punto se trabaja con material y disoluciones estériles y en una campana de flujo laminar. Para obtener una suspensión celular se requiere de disgregación mecánica y enzimática del tejido. Para ello se prepara con anticipación una disolución de colagenasa 1.25 mg/mL en HBSS, a 37°C. Se coloca una gota de esta disolución en la tapa de una caja Petri, se colocan los nervios ópticos y con ayuda de un bisturí se obtienen trozos de aproximadamente 1 mm². Los trozos de tejido se transfieren al tubo que tiene el resto de la colagenasa (1 mL) y se añaden 50 µL de tripsina 2.5% y 20 U/µL de DNasa I, para incubarlos 40 minutos a 37°C y 5% CO₂. Finalizado el tiempo de incubación, para frenar la actividad enzimática se añade medio DMEM (DMEM alta glucosa, bicarbonato de sodio y rojo de fenol, sin HEPES) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) inactivado por calor, L-glutamina 2 mM y piruvato de sodio 1mM a 37°C y se centrifuga 5 minutos a 500 rpm; el sobrenadante se descarta y se añade

DMEM suplementado a 37°C. Para la disgregación mecánica se hace pasar la solución enzimática por calibres cada vez más pequeños de agujas: 23G, 25G y 27G subiendo y bajando la solución en una jeringa de 1 mL, además se emplea un filtro de nylon de 41 µm para eliminar restos de tejido de mayor tamaño.

La suspensión celular obtenida se centrifuga 7 minutos a 500 rpm y se descarta el sobrenadante. El pellet obtenido se resuspende en medio SATO (DMEM alta glucosa, suplementado con piruvato de sodio 1 mM, BSA 1.1 mg/mL, N-acetil-L-cisteína 386 µM, L-glutamina 2 mM, insulina 5 µg/mL, penicilina-estreptomina 1%, NT3 1 ng/mL y CNTF 10 ng/mL, transferrina 0.1 mg/mL, progesterona 60 ng/mL, putrescina 16 µg/mL, selenito de sodio 40 ng/mL, tiroxina 40 ng/mL).

Se realizó la siembra de las células a una densidad de 35,000 células/pozo en placas de 4 pozos en los que se colocó un cubreobjetos de vidrio en el fondo el cual estaba previamente tratado con poli-D-lisina (PDL) 10 µg/mL.

Se añade el tratamiento y las células se incuban a 37°C, 5% CO₂. Una vez transcurrido el tiempo de incubación (24 o 48h), las células se fijan con paraformaldehído (PFA) 4% en PBS (NaCl 138.89 mM, KCl 2.68 mM, Na₂HPO₄ 10.14 mM, KH₂PO₄ 1.76 mM).

13.2 Aislamiento y cultivo de precursores de oligodendrocitos de hipocampo de rata por separación inmunomagnética

Una vez realizado el sacrificio de las ratas (n=4) se procede a realizar la disección en condiciones asépticas. Se retira la piel de la cabeza para descubrir el cráneo y se realiza un corte superficial para separar las dos mitades del cráneo y obtener el cerebro. Se realiza un corte coronal para retirar el lóbulo frontal y se pasa el resto del cerebro a una caja Petri con PBS frío en baño de hielo y se realiza la disección del hipocampo bajo el microscopio estereoscópico. Para ello, de cada hemisferio se desprende la corteza desde la parte posterior más cercana al cerebelo con un movimiento lateral hasta distinguir el hipocampo. Se retiran las meninges y se recolectan en una caja Petri con PBS frío.

En una campana de flujo laminar, con material y disoluciones estériles se realiza la disgregación mecánica y enzimática del tejido para obtener una suspensión celular. Para ello se prepara con anticipación una disolución de papaína y DNAsa I con EBSS (estuche comercial para disociación Worthington cat. LK003150) a 37°C. En una tapa de caja Petri se coloca una gota de la mezcla enzimática, se colocan los hipocampos en la gota y se cortan con una hoja de bisturí estéril en trozos de aproximadamente 1 mm². Los trozos de tejido se transfieren al tubo con la mezcla enzimática y se incuban 40 minutos a 37°C y 5% CO₂, con agitación suave en intervalos de 10 minutos.

Con una pipeta de 1000 µL se realiza la disociación mecánica haciendo subir y bajar el tejido, se centrifuga 5 minutos a 300 xg y se descarta el sobrenadante. El botón celular se resuspende en disolución inhibidora ovomucoide (kit Worthington) y DNAsa I en EBSS. Para separar las células en un tubo se coloca la solución del inhibidor ovomucoide y se agrega la suspensión celular para formar un gradiente discontinuo que posteriormente se centrifuga 6 min a 70 xg. Se descarta el sobrenadante que contiene membranas y restos celulares y el paquete celular (pellet) se resuspende con DMEM y se hace pasar por un filtro de 30 µm (MACS® Smart Strainers Miltenyi #130-098-458).

Se realiza el conteo de las células obtenidas para determinar la cantidad de anticuerpo unido a perlas magnéticas a utilizar. Se centrifuga la suspensión 10 minutos a 300 xg y se aspira el sobrenadante. El pellet se resuspende en 70 µL de buffer de columna (PBS pH 7.2, 0.5% BSA) a 4°C y 20 µL del anti-A2B5 acoplado a las perlas magnéticas (anti-A2B5 MicroBeads, hecho en ratón) por cada 10⁷ células y se incuba 15 minutos a 4 °C. Una vez finalizada la incubación con el anticuerpo se lavan las células con buffer de columna y se centrifugan 10 minutos a 300xg. El sobrenadante se desecha y se resuspende el pellet en buffer de columna.

La suspensión celular se pasa por la columna de separación magnética previamente hidratada con buffer de columna. La fracción de células que fluye por gravedad son negativas al marcaje con anti-A2B5. La columna se enjuaga con 5 mL de buffer. Para obtener la fracción de células con marcaje A2B5 positivo se retira la columna del magneto y se le añade medio para OPCs (DMEM alta glucosa con piruvato, B-27™ 1X, L-glutamina 2 mM, penicilina-estreptomicina 1%, HEPES 10 mM, Trace Elements™ 1X,

hidrocortisona 50 ng/mL, N-Acetil-L-cisteína 5 µg/mL, insulina 5 µg/mL, D-biotina 10 ng/mL, apo-transferrina 0.1 mg/mL, BSA 0.1 mg/mL, putrescina 16 µg/mL, progesterona 62.5 ng/mL, selenito de sodio 4 ng/mL) a 37°C y se hace presión con el émbolo en la columna. Las células de la fracción positiva se sembraron en una densidad de 50,000 células/pozo en placas de cultivo de 4 pozos en los que se colocó un cubreobjetos de vidrio previamente tratado con PDL 10 µg/mL en el fondo. También se sembraron 1'000,000 células/caja en cajas de cultivo T25 con medio para OPCs.

Se agregó el tratamiento farmacológico y se cultivaron a 37°C y 5% CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación (3, 24, 48 y 72 horas), las células sembradas en pozos se fijaron con PFA 4% en PBS. A partir de las células sembradas en cajas T25 se realizó la obtención de extractos proteicos mediante la lisis celular con el uso de 250 µL de buffer RIPA (Tris 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, NP-40 0.1%, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, leupeptina 1 mg/mL, aprotinina 1 mg/mL, pepstatina 1 mg/mL, NaF 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM), para su posterior separación electroforética y análisis por Western blot.

13.3 Tinción fluorescente de los microtúbulos de actina

Para el análisis de las estructuras dependientes del citoesqueleto de actina (filopodios y lamelipodios) así como para la evaluación de la complejidad morfológica de los OLGs de nervio óptico, se realizó la tinción fluorescente de los microfilamentos de actina mediante con faloidina acoplada al fluorocromo TRITC (isotiocianato de tetrametilrodamina). Para ello, los OLGs previamente fijados con PFA al 4%, se incubaron con TRITC-faloidina en una concentración 1 µM, durante 45 min. Asimismo, se realizó la contratinción nuclear con el compuesto DAPI (4´6-diamidino-2-fenilindol) 300 nM, durante 5 min. Se realizó el montaje de los cubreobjetos con glicerol: PBS 9:1, fueron sellados con esmalte de uñas y se conservaron en congelación hasta su observación por microscopía de fluorescencia.

13.4 Detección de marcadores de diferenciación y maduración oligodendroglial y de tubulina-α acetilada por inmunofluorescencia

Todas las células previamente fijadas con PFA al 4% se incubaron con disolución de permeabilización (Tritón X-100 0.2% en PBS) lo que implica la formación de poros en la

membrana plasmática que permite la difusión de los anticuerpos al interior de las células e incluso al núcleo. Posteriormente, se realiza la tinción de las células por inmunodetección fluorescente.

Para la caracterización del cultivo de OLGs de nervio óptico se inmunodetectó el marcador Olig2 a las 24h de cultivo con el anticuerpo primario anti-Olig2 1:150, IgG policlonal, hecho en conejo, Abcam ab81093 y el anticuerpo secundario FITC-anti-IgG de conejo 1:75, hecho en cabra, Jackson ImmunoResearch 115-095-003. Además se realizó la contratinción de los núcleos y los microfilamentos de actina como se mencionó previamente.

Para la caracterización del cultivo de OPCs se emplearon los anticuerpos primarios dirigidos al gangliósido A2B5 (anti-A2B5 1:100, IgM monoclonal, hecho en ratón, R&D Systems MAB1416) y a la proteína Olig2 (1:150) y los correspondientes anticuerpos secundarios (anti-IgM de ratón 1:100, hecho en cabra, Santa Cruz Biotechnology sc-2082 y anti-IgG de conejo 1:75, hecho en cabra, Jackson ImmunoResearch 111-175-003) acoplados a FITC (isotiocianato de fluoresceína) y Cy5 (cianina 5), respectivamente. También se llevó a cabo la tinción fluorescente de contraste para resaltar los núcleos con DAPI como se mencionó anteriormente.

Se utilizó el anticuerpo contra tubulina- α acetilada (anti-tubulina- α acetilada K40 1:140, IgG monoclonal, hecho en ratón, Abcam ab24610) y el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón 1:1000 hecho en cabra, Thermo-Fisher A-11004) acoplado al fluorocromo Alexa Fluor 568 (AF568) en los OPCs con tratamiento con MEL de 24 y 48h para evaluar la modulación de los microtúbulos. También se realizó la tinción fluorescente de los núcleos con DAPI 150 nM, 5 minutos.

Para los OLGs de nervio óptico con 48h de tratamiento y los OPCs que tuvieron tratamiento de 72h se emplearon los anticuerpos primarios dirigidos a O4 y a MBP (anti-O4 1:100, IgM monoclonal, hecho en ratón, Merck MAB345 y anti-MBP 1:200, IgG policlonal, hecho en conejo, Abcam ab40390) y los anticuerpos secundarios FITC-anti-IgM de ratón 1:75 (hecho en cabra, Santa Cruz Biotechnology sc-2082) y anti-IgG de

conejo 1:500 (hecho en cabra, Invitrogen A-11009) conjugado al fluorocromo Alexa Fluor 532.

La adquisición de imágenes se realizó mediante un microscopio de fluorescencia Nikon® Eclipse TE-2000 acoplado a un sistema de adquisición de imágenes DS-Ri2 y al programa NIS-Elements® AR, versión 3.4. Estas imágenes se analizaron con el programa NIS-Elements® AR y/o con el programa ImageJ [NIH; plug-in Sholl analysis: Ferreira et al, 2014⁽¹⁵⁹⁾].

13.5 Inmunodetección de tubulina- α y tubulina- α acetilada por Western Blot

La cantidad de proteína de los extractos obtenidos del cultivo de OPCs con 48h de tratamiento, se determinó mediante el método de Lowry⁽¹⁶⁰⁾.

Se utilizó el sistema de amortiguadores de electroforesis de Laemmli⁽¹⁶¹⁾ y las muestras se procesaron en condiciones desnaturalizantes (SDS y β -mercaptoetanol) de acuerdo a las instrucciones del fabricante de las cámaras de electroforesis (MiniPROTEAN® 3 Cell, Bio-Rad).

Previo a la electroforesis, se revisa que la cámara de electroforesis esté integra y libre de fugas. Se colocan los geles de poliacrilamida 10%-SDS en la cámara y se añade el amortiguador de corrida (25mM Tris base, 190 mM glicina y 0.1% SDS, pH 8.3). En el primer carril se coloca 1 μ L del marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Dual Xtra Standards, BioRad 161-0377). De los extractos experimentales se cargaron 5 μ g de proteína/carril. Se realizó la corrida a 200V durante 30 min.

Una vez realizada la electroforesis las proteínas permanecen unidas a la matriz del gel y no pueden ser alcanzadas por los anticuerpos, por lo que se realiza la transferencia a una membrana de polivinildifluoruro de baja fluorescencia (LF-PVDF) mediante el equipo TransBlot Turbo (BioRad) en las condiciones indicadas por el fabricante para la transferencia de proteínas de peso molecular mixto. Asimismo, se utilizó el amortiguador del estuche comercial de transferencia TransBlot Turbo (BioRad 170-4271).

Para la inmunodetección las membranas se bloquean con el amortiguador comercial Odyssey Blocking Buffer TBS (TBS con 0.1% de azida de sodio) y se incuban con los anticuerpos primarios dirigidos a la proteína tubulina- α acetilada y no acetilada (anti α -tubulina acetilada K40 1:1000, IgG monoclonal, hecha en ratón, Abcam ab24610 y anti α -tubulina 1:1000, hecha en conejo, Abcam ab4070) durante toda la noche a 4°C. Después de tres lavados con TTBS (0.05% Tween20/TBS), se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes (anti-IgG de ratón 1:10000, hecho en cabra, Jackson ImmunoResearch 115-035-003 y anti-IgG de conejo 1:60000, hecho en cabra, Jackson ImmunoResearch 111-035-003) acoplados a peroxidasa de rábano (HRP), durante 90 min a temperatura ambiente. Para revelar las bandas inmunorreactivas, la peroxidasa unida al anticuerpo secundario cataliza la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno. Como resultado el luminol se descompone emitiendo una señal de quimioluminiscencia. Para esta reacción se incubaron las membranas con el sustrato quimioluminiscente de la marca Millipore (HRP-Substrate, Millipore), durante 5 min y se procedió a obtener las imágenes mediante el fotodocumentador Chemidoc MP, BioRad. El análisis densitométrico de las imágenes se realizó mediante el programa ImageLab de BioRad.