

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA- FACULTAD DE CIENCIAS

Cambios en la dieta modifican patrones de locomoción y perfiles de expresión de PMP22 en ratones con trastornos neurodegenerativos (Trembler J).

Tesina de Grado

Mariana Bresque. Tutora: Alejandra Kun

01/01/2012

Departamento de Proteínas y Ácidos Nucleicos- IIBCE.

ÍNDICE

Índice.....	1-4
Abreviaturas.....	5-6
Resumen.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8-37
1.1. Generalidades del Sistema Nervioso.....	8-9
1.1.1. Clasificación anatómica y origen: SNC y SNP	
1.2. Nervio Periférico.....	9-10
1.3. Estructura del axón mielínico.....	10-16
1.3.1. Polarización radial.	
1.3.2. Polarización longitudinal.	
1.3.2.1. Nodo.	
1.3.2.2. Paranodo.	
1.3.2.3. Juxtaparanodo.	
1.3.2.4. Internodo.	
1.3.3. Mecanismo de ensamblaje de los dominios.	
1.4. Formación y función de la vaina de mielina.....	17-21
1.4.1.1. Mielina Compacta.	
1.4.1.2. Mielina Laxa.	
1.5. Neuropatías hereditarias periféricas.....	21-25
1.5.1. CMT: Charcot Marie Tooth.	
1.5.2. CMT1 y 1A.	
1.6. Modelos animales de CMT1A.....	25-29
1.6.1. Modelos naturales: ratones trembler (tr) y tremblerJ(TrJ).	
1.6.2. Evidencias a favor del modelo TrJ.	
1.7. PMP22.....	29-32
1.7.1. Transcritos de pmp22.	

1.7.2. PMP22 Madura	
1.7.3. Expresión de PMP22 fuera del SNP.	
1.8. Rutas de degradación y Formación de agregados.....	32-36
1.8.1. Metabolismo de PMP22.	
1.9. Restricciones en la dieta.....	36-37
2. HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	38
2.1. Objetivos generales.	
2.2.1. Objetivos específicos.	
3. MATERIALES Y METODOS.....	39-48
3.2. Establecimiento de grupos de experimentación.....	39-42
3.2.1. Grupo Control ad libitum.	
3.2.2. Ayuno Intermitente.	
3.2.3. Restricción Calórica.	
3.3. Evaluación de los desempeños locomotores.....	43-45
3.3.1. Test de la barra giratoria.	
3.3.2. Campo Abierto.	
3.4. Estudios morfológicos.....	45-48
3.4.1. Fijación, crioprotección, infiltración e inclusión.	
3.4.2. Inmunohistoquímica.	
3.4.2.1. Permeabilización.	
3.4.2.2. Bloqueo de grupos aldehído y cetonas libres.	
3.4.2.3. Bloqueo de sitios de unión inespecífica.	
3.4.2.4. Incubación con anticuerpos específicos.	
3.4.2.5. Incubación con anti-anticuerpos .	
3.4.2.6. Montaje.	
3.4.2.7. Microscopía confocal.	

4. RESULTADOS.....	49-59
4.2. Caracterización del modelo biológico <i>TrJ</i> e implementación de regímenes de restricción.....	49-55
4.2.1. Consumo y Pesos por semana de individuos AL.	
4.2.2. Variaciones temporales de consumo y peso en individuos bajo AI	
4.2.3. Variaciones temporales de consumo y peso en individuos bajo RC.	
4.3. Evaluación de los desempeños locomotores.....	55-58
4.3.1. Test de la barra giratoria	
4.3.2. Campo Abierto.	
4.4. Cambios histo-moleculares.	59
5. DISCUSIÓN.....	60-70
5.1. Caracterización del modelo biológico <i>TrJ</i> y variaciones temporales de consumo y peso en individuos bajo tratamientos de restricción en la dieta.....	60-66.
Relación consumo/peso.	
AI	
RC.	
5.2 Evaluación de los desempeños locomotores: Barra giratoria y Campo Abierto..	66-68
5.3. Cambios histo-moleculares.....	68-69
5.4. Conclusiones finales.....	70
6. Referencias.....	71-82
Anexos.....	83-99
Anexo I. Cuidado, mantenimiento y optimización del manejo animal.....	83-87
Anexo II- Individuos numerados en los distintos tratamientos.....	88
Anexo III - Consumo semanal AL.....	89
Anexo IV- Peso Corporal AL.....	90
Anexo V - Consumo semanal en AI.....	91

Anexo VI- Peso Corporal control en AI.....	92
Anexo VII - Consumo semanal en RC.....	93
ANEXO VIII- - Peso Corporal en RC.....	94
Anexo IX- Permanencia sobre la barra giratoria.....	95
Anexo X- Parámetros locomotores medidos en Campo Abierto.....	96
Anexo XI- Duración en periferia y Actividad Vertical en Campo Abierto.....	97-99

ABREVIATURAS:

AG: Anquirina G adaptador citoesqueletico.

AI: alimentación intermitente.

AL: alimentación *ad libitum*.

CAM: Moléculas de adhesión celular.

Caspr 2: proteína asociada a Contactina miembro de la familia CASPR.

CHN: neuropatía congénita hipomielinizante.

CMT: neuropatía hereditaria periférica Charcot-Marie-Tooth.

CMT1A: Charcot-Marie-Tooth del subtipo 1A.

CS: célula de Schwann.

Cx 29: conexina 29.

Cx32: conexina 32.

DSS: neuropatía Dejerine-Sottas.

E β IV : Espectrina β IV proteína de unión al citoesqueleto de actina.

ECM: matriz extracelular.

ERMs: Ezrina, Radixina y Moesina proteínas ubicadas en las microvellosidades de la CS, que se vinculan con proteínas integrales de membrana axonales.

GalC: Galactoceramida.

HNPP: neuropatías hereditarias con sensibilidad a la presión

HSP: Heat Shock Proteins o chaperonas, proteínas que colaboran con el plegamiento de las proteínas nacientes.

ISL: Incisuras de Schmidt-Lanterman)

MAG: Glicoproteína Asociada a la mielina.

MBP: proteína de unión a la mielina.

Nav 1.6: Canals de Sodio dependientes de voltaje del tipo 1.6.

Necl: proteínas de adhesión celular Calcio independiente.

NF: neurofilamentos, filamentos intermedios que se ubican en neuronas.

Nf155: Neurofascina 155 molécula glial de adhesión celular.

Nf186: Neurofascina-186 molécula neuronal de adhesión celular presente en el nodo.

NrCAM: moléculas neuronal de adhesión celular presente en el nodo.

P0: glicoproteína integral de membrana de 28 kDa componente de la mielina periférica.

Par-3: miembro de la familia Par de proteínas adaptadoras.

PLP: proteína proteolipídica componente principal de la mielina central.

PMP22: proteína mielínica periférica de 22 kDa.

PMP-22: proteína mielínica periférica de 22kDa.

RC: restricción calórica.

SN: Sistema Nervioso.

SNC: Sistema Nervioso Central.

SNP: Sistema Nervioso Periférico.

SUP: Sistema Ubiquitina-Proteosoma.

Tag-1: glicoproteína glial transitoria-1.

Tr : cepa de ratones que tiembla al caminar denominada *Trembler* descubierta en 1946.

TrJ: cepa de ratones con temblores denominada *Trembler-J* descubierta en 1979.

Ub: ubiquitina.

VCN: velocidad de conducción nerviosa.

Vg: locus del gen vestigial de la cola.

RESUMEN:

Las neuropatías hereditarias conocidas como Charcot-Marie-Tooth (CMT) son procesos neurodegenerativos del Sistema Nervioso Periferico. La más frecuente es el tipo 1A, causada por mutaciones o una duplicación del gen codificante de la proteína mielínica PMP22. Esta participa en la mielinización temprana y normalmente es propensa a agregar. Al saturarse la función proteosómica en la patología, PMP22 forma agregosomas, que serán degradados vía autofágica-lisosomal. Se propone que interrupciones en el tráfico intracelular de PMP22 junto la formación de agregados poseen un rol substancial en el desarrollo del síndrome CMT1A. La restricción en la dieta, en este contexto, provee una aproximación no farmacológica que pretende potenciar las vías autofágica-lisosomal, incrementando la degradación de los agregados y contribuyendo a resistir el trastorno neurodegenerativo mediante la atenuación del déficit morfológico y locomotor. Utilizando un modelo murino validado de CMT1A, hemos sometido a ratones Trembler J a tratamientos de restricción en la dieta durante 5 meses, con el objetivo de evaluar las posibles mejoras locomotoras y estructurales. Los efectos dietarios fueron evaluados analizando cambios en el consumo y peso corporal en el transcurso de los tratamientos y variaciones en las capacidades locomotoras utilizando test comportamentales, los que permitieron observar mejoras en aquellos individuos portadores de la patología. Al mismo tiempo, los patrones de expresión de pmp22 y F-Actina mostraron modificaciones detectables en los ratones tratados. Los resultados podrían indicar un efecto de los regímenes sobre el comportamiento anormal en el cuadro patológico, lo cual nos propone un camino hacia el cual dirigirnos para acercarnos a un posible tratamiento de aplicación humana.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. GENERALIDADES DEL SISTEMA NERVIOSO.

El Sistema Nervioso (SN) constituye uno de los sistemas más complejos y relevantes de nuestro organismo. Su versión más primitiva surge en celenterados y tres tendencias evolutivas (segmentación, centralización y cefalización) darán origen a la complejidad estructural, morfológica y anatómica propia de la organización vertebrada del SN.

Definido como un conjunto de órganos constituido por una red de tejidos nerviosos de origen ectodérmico, su unidad básica es la neurona, las cuales se especializan en la generación, integración y conducción de estados de excitación. Las glías, que acompañan a las anteriores, se encuentran en mayor proporción y cumplen funciones de soporte, tróficas, control del medio, generación de la envoltura de mielina, reparación de daños, neurogénesis y participación en vías metabólicas de producción de neurotransmisores, entre otras. Su principal función es recibir e integrar rápidamente las señales procedentes de los distintos órganos sensoriales, ejerciendo control y coordinación sobre los demás órganos para lograr una oportuna y eficaz interacción con el medio ambiente. Ésta, le permite reaccionar a la información de forma adecuada y mantener la homeostasis del organismo.

1.1.1. CLASIFICACIÓN ANATÓMICA Y ORIGEN: SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO.

El SN de los vertebrados se divide desde el punto de vista anatómico en componentes centrales y periféricos. Así, el SN Central (SNC) comprende: encéfalo (hemisferios cerebrales, diencéfalo, cerebelo y tronco encefálico) y médula espinal; y el SN Periférico (SNP) implica neuronas sensitivas que conectan los receptores sensitivos con circuitos de procesamiento en el SNC y una porción motora. Esta última presenta a su vez dos componentes: axones motores que conectan encéfalo y médula espinal con los músculos esqueléticos constituyendo la división motora somática, y axones que inervan músculo liso, cardíaco y glándulas formando la división motora visceral o autónoma. El origen del SN vertebrado deriva principalmente de las células de tubo neural que darán

lugar al SNC y las células de la cresta neural que dan origen a las células neuronales y gliales del SNP (Jessen y Mirsky, 2005). En el presente trabajo profundizaremos en conceptos estructurales, funcionales y moleculares concernientes al SNP.

1.2. NERVIOS PERIFÉRICOS.

Los nervios, elementos pertenecientes al SNP, se componen de varios fascículos o fibras nerviosas que comunican los centros nerviosos con el resto de los órganos del cuerpo. Todos los axones del SNP están asociados a células de Schwann (CS), la mayoría de los nervios periféricos son mixtos, con axones motores y sensitivos. Las fibras pueden ser mielínicas y estar formadas por el axón y la mielina, o amielínicas permaneciendo en surcos de las CS, pero no mielinizadas (Fig.1.2.1).

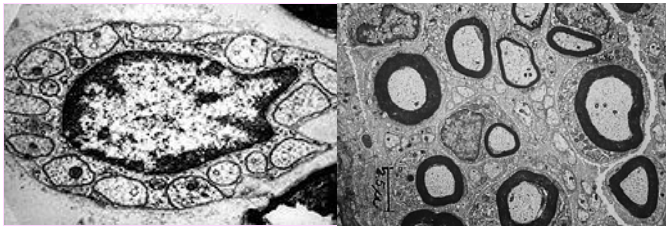


Figura1.2.1. Microscopía electrónica de fibras amielínicas y mielínicas. En la imagen de la izquierda se observa una fibra amielínica donde varios axones están rodeados por una misma CS, que no los mieliniza. La imagen de la derecha muestra fibras nerviosas mielínicas donde cada CS rodea a solo un axón. Se observan distintos grososres mielínicos. Micrografías extraídas de <http://escuela.med.puc.cl>.

En el transcurso del desarrollo de estos nervios, las células de la cresta neural generan precursores de las CS que se desarrollaran en CS inmaduras antes del nacimiento. El destino de estas células depende del diámetro del axón al cual están asociadas, aquellas que contactan grandes axones se diferencian en CS mielinizantes y las que contactan axones de pequeño calibre continúan en un estado no mielinizante. El determinante de esta diferenciación es la cantidad de Neuroregulina 1 tipo III expresada por el axón y no el diámetro axonal *per se*. Esta proteína funciona como una señal de sobrevivencia y proliferación para los precursores de las CS y ajusta el número de CS en función del número de axones que serán mielinizados (Simons y Trotter, 2007). Inicialmente las CS inmaduras encierran grupos de axones, entre los que se seleccionarán aquellos con los que eventualmente se establecerá la típica relación 1:1 propia de las CS mielinizantes en el SNP (Jersen y Mirsky, 2005). Este proceso puede ocurrir únicamente después que la CS haya producido su lámina basal, cuya función es iniciar la asimetría celular y

establecer un eje de polaridad glial, imprescindible en la espiralización de su membrana, al mielinizar el axón. El axón y todas las CS que lo acompañan en su trayectoria constituyen la fibra nerviosa, la cual es rodeada por el endoneuro formado por fibras reticulares. Varias fibras nerviosas conforman un fascículo nervioso. Por fuera de él se encuentra el perineuro constituido por capas concéntricas de tejido conjuntivo. Finalmente la conjunción de fascículos nerviosos rodeados por epineuro constituye un nervio. El epineuro se compone de células de tejido conectivo, fibras colágenas y células adiposas (Fig. 1.2.2).

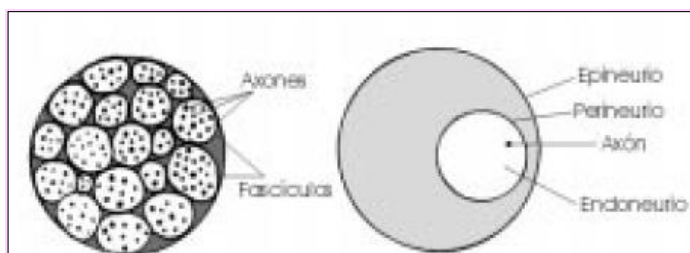


Figura 1.2.2 Visión esquemática de los tres tejidos conjuntivos que rodean la fibra nerviosa. Cada nervio se rodea por epineuro y está constituido por fascículos nerviosos rodeados por perineuro. Estos últimos están constituidos por fibras nerviosas rodeadas por endoneuro. Dibujo esquemático extraído de <http://nerviims.blogspot.com>.

1.3. ESTRUCTURA DEL AXÓN MIELÍNICO.

En el SNP adulto de vertebrados, los contactos intercelulares entre las CS mielinizantes y las neuronas, generan sub-dominios axo-gliales con características funcionales y estructurales específicas. Estos subdominios se sustentan por la formación de complejos multi-proteicos transcelulares y estructuran una polarización longitudinal y radial, frecuentemente en asociación con elementos del citoesqueleto cortical sub-membranoso.

1.3.1. POLARIZACIÓN RADIAL.

La fibra nerviosa mielínica es reconocida típicamente por su polaridad longitudinal. Sin embargo, existe igualmente una polarización radial, determinada por la ubicación precisa de distintos marcadores moleculares en dominios gliales y axonales específicos, correlacionados transversalmente, en torno a la cercanía a la membrana axonal. La envoltura de mielina se compone de varias capas de la membrana de la CS, espiralada en torno al axón. El núcleo glial es generalmente descrito como ubicado en la parte

exterior de la misma. Persiste un escaso citoplasma en el exterior (el compartimiento abaxonal) y rodeando al axón (el compartimiento adaxonal), un espacio periaxonal separa la membrana glial mas interna del axón (Fig.1.5.1 A y B). En la membrana abaxonal se encuentran receptores de matrix extracelular y en la adaxonal, moléculas de adhesión que median las interacciones con el axón, en particular, MAG (del inglés Myelin Associated Glycoprotein) (Salzer *et al.*, 2003). Además, por fuera de la mielina periférica se presenta una lámina basal bien definida asociada al exterior de la CS cuyo papel es fundamental en la formación de la mielina en el SNP (Bunge *et al.*, 1982).

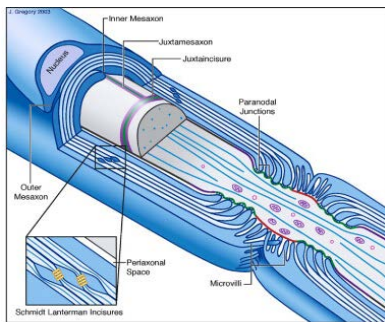
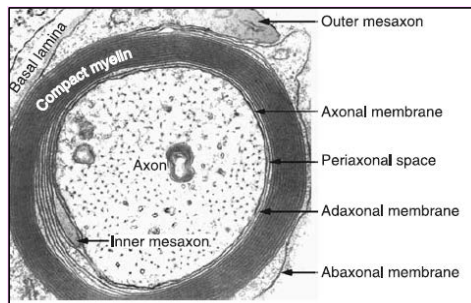


Figura 1.3.1A. Sección longitudinal de un axón mielinizado (gris), rodeado por capas de mielina. Se observa el nodo de Ranvier (rojo), al cual la CS proyecta microvellosidades; los lazos paranodales y las uniones septadas (verde), la región juxtapanodal (púrpura); incisuras Schmidt Lanterman, que forman uniones gap (que se muestra a mayor aumento en el recuadro); mielina compacta (azul claro), y el mesaxón interior y exterior. Imagen tomada de Salzer *et al.*, 2003.

Figura 1.3.1B. Sección transversal de un axón mielinizado. A través de la micrografía electrónica se observan las múltiples láminas de mielina formando la mielina compacta. La membrana abaxonal contacta con la lámina basal. El espacio periaxonal separa la membrana adaxonal de la membrana axonal. Tomada de The Biology of Schwann Cells Development, Differentiation and Immunomodulation, 2007.



1.3.2. POLARIZACIÓN LONGITUDINAL.

La polarización longitudinal se centra alrededor de los nodos de Ranvier, los cuales determinan sub-dominios mantenidos por complejas interacciones moleculares, cada una con una composición proteica característica. Esta segregación en dominios longitudinales es evidente en las fibras completamente mielinizadas y son críticas para la habilidad de conducir impulsos nerviosos de forma saltatoria (Salzer, 2003). A continuación se detallará la composición de cada dominio longitudinal.

1.3.2.1. NODO.

Los nodos son leves constricciones del diámetro axonal de alrededor de 1 μm de longitud ubicados entre cada segmento mielínico, donde el axón contacta con los microvilli de dos CS contiguas. En el axolema se insertan una gran densidad de canales de Na^+ dependientes de voltaje ($> 1200/\mu\text{m}^2$), predominando, en el estado adulto, las subunidades α Nav 1.6 (Caldwell *et al.*, 2000; Tzoumaka *et al.*, 2000). Nav 1.6 presenta una potenciación dependiente de su uso, la cual es particularmente útil para la alta frecuencia de descarga propia del nodo (Zhou y Goldin, 2004). Estos canales interactúan con subunidades adicionales, las subunidades β , las cuales modulan sus propiedades de disparo. Estudios recientes también han revelado la presencia de dos canales de K^+ voltaje dependientes (Poliak y Peles, 2003). También se encuentran en esta región ATPasas Na^+/K^+ e intercambiadores Na^+/Ca^+ así como moléculas neurales de adhesión molecular (NCAM): la NrCAM y Neurofascina-186 (Nf186). Estas moléculas, forman uniones transcelulares glía-axón, contactando Gliomedina, (una proteína de matriz glial), promoviendo así la formación de complejos moleculares que estructuran el nodo en el SNP (Eshed *et al.*, 2005). Dentro del axón contactan con Contactina, el adaptador citoesquelético Anquirina G (AG) y la proteína de unión a la actina Espectrina βIV (E βIV) (Fig.1.3.2.1). A nivel axonal, el citoplasma de esta zona se encuentra enriquecido en mitocondrias, vesículas, y neurofilamentos (NF).

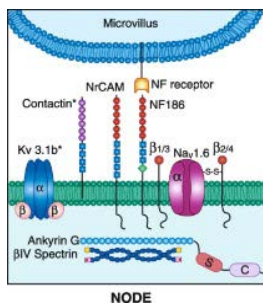


Figura 1.3.2.1. Principales proteínas presentes en dominios axonales, y sus receptores gliales. Los componentes de los nodos maduros incluyen NCAM, Nf-186, y un complejo trimérico de Nav1.6 asociada o con $\beta 1 / \beta 3$ o con $\beta 2 / \beta 4$. Estos se unen a AG, que se une a un heterodímero de E βIV . La Nf-186 se une a un receptor de las microvellosidades de la CS. Kv3.1b y Contactina y están presentes en algunos de los nodos del SNC (el asterisco señala que su expresión es variable). También están presentes en el nodo componentes de ECM; las microvellosidades de CS se enriquecen en ERM y EBP50 y actina (no mostrado). Figura modificada de Peles y Salzer, 2000.

Están flanqueados por los bordes laterales de las células mielinizantes, que inician ambos internodos. A pesar de que los nodos del SNP y SNC muestran características estructurales similares, en el primero los nodos se comunican con las microvellosidades interdigitales que se proyectan desde el extremo de la CS mientras que centralmente existen allí procesos perinodales de glías especializadas, generalmente astrocitos. (Salzer *et al.*, 2003). A nivel glial, en las microvellosidades, se localizan: Ezrina,

Radixina y Moesina (ERMs), así como la proteína de unión a Ezrin EBP50 y Rho-GTPasa A, las cuales se encargan de vincular las microvellosidades ricas en actina con proteínas integrales de membrana axonales. Además varias proteínas de la matriz extracelular (ECM), están presentes bajo la lámina basal en el espacio nodal, incluyendo Versicano (ácido hialurónico de unión de proteoglicanos), Tenascina-C y proteoglicano NG2 (Poliak y Peles, 2003). La matriz extracelular nodal también muestra una composición particular enriquecida en colágeno V e isoformas específicas de laminina (Occhi *et al.*, 2005, Melendez-Vasquez *et al.*, 2005), confiriéndole a los dominios extracelulares nodales una identidad molecular de distribución radial.

1.3.2.2. PARANODO.

La región más próxima al nodo se corresponde con la región paranodal, donde se ubican los bucles paranodales. Esta región es el sitio donde ocurre la mayor aproximación entre la membrana del axón (axolema) y la de la célula glial (3-5 nm frente a ~ 15 nm en el internodo). Los lazos paranodales más externos cercanos al nodo, se aproximan estrechamente e invaginan en el axolema. En la unión axoglial la membrana axonal contiene un complejo de dos moléculas de reconocimiento celular: Contactina y proteína asociada a Contactina (Caspr 2, miembro de la familia CASPR). Estas proteínas se unen a través de sus dominios extracelulares a varias NCAM y por sus dominios intracelulares a 4.1B, la cual presenta un dominio de unión a actina-espectrina, que podría inmovilizar Caspr 2 (y por lo tanto Contactina) fijándola al citoesqueleto y determinando su localización (Fig 1.3.2.2). El candidato más probable para servir como ligando glial del complejo CASPR/Contactina es Neurofascina 155(Nf155), una isoforma glial de CAM Neurofascina, aunque podrían existir otros receptores para el complejo. La unión paranodal tiene el objetivo de fijar la mielina al axón, lo cual permite separar la actividad eléctrica del nodo de Ranvier de la región internodal y funciona como una barrera que limita la difusión lateral de las proteínas del axolema, particularmente las nodales (Poliak y Peles, 2003). Estos complejos transcelulares paranodales son conocidos como uniones de tipo septo, en alusión a las uniones septadas de invertebrados.

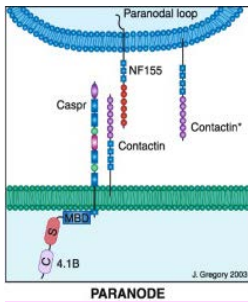


Figura 1.3.2.2. Principales proteínas presentes en dominios axonales, y sus receptores gliales. Los componentes de los paranodos incluyen un complejo de cis CASPR y Contactina en el axón que se une a 4.1B e interactúa con Neurofascina 155 en el circuito paranodal. Figura modificada de Peles y Salzer, 2000.

1.3.2.3. JUXTAPARANODO.

El juxtapanodo, ubicado más allá de la íntima unión paranodal, muestra canales de K^+ voltaje dependientes retardados (Kv1.1 y Kv1.2) distribuidos con un gradiente de concentración que va en sentido decreciente desde el paranodo hacia el internodo. En el axolema juxtapanodal estos canales crean un complejo con Caspr2. Otras proteínas allí presentes son la glicoproteína transitoria-1 (Tag-1), una molécula de adhesión celular anclada a GPI que se ubica del lado glial. Este último se relaciona con Contactina y Caspr2 en el axón. Caspr2 y Tag1 formarían un andamio que permite el posicionamiento de los canales iónicos en sitios específicos (Fig 1.3.2.3). La función de los canales de K^+ en esta región es ser un amortiguador activo de la excitación reentrante contribuyendo así a mantener el potencial de reposo en el internodo, además de mediar la comunicación axoglial (Poliak y Peles, 2003).

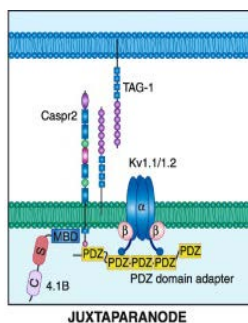


Figura 1.3.2.3. Principales proteínas presentes en dominios axonales, y sus receptores gliales. Los componentes de los juxtapanodos incluyen un complejo cis de TAG-1 y Caspr2, esta última se une a la primera en la membrana glial e interactúa con 4.1B en el citoplasma a través de una proteína con multidominio PDZ, que a su vez está vinculada a Kv1.1 y 1.2 en la membrana del axón. También presentan PSD-95 (no mostrado). Figura modificada de Peles y Salzer, 2000.

1.3.2.4. INTERNODO.

Los segmentos de mielina que se extienden desde un juxtapanodo a otro se conocen como internodos van desde milímetros a metros en las grandes fibras. El internodo es el dominio más extenso de las fibras mielínicas y se corresponde con la porción del axón localizada bajo la mielina compacta. A lo largo de él, la membrana interna de la CS se encuentra uniformemente separada del axón por medio de un espacio denominado espacio periaxonal. La membrana internodal en contacto con las Incisuras de Schmidt-Lanterman (ISL) y el mesaxón interno contiene complejos proteicos característicos de regiones paranodales y juxtapanodales (Peles y Salzer, 2000). La caracterización de las interacciones transcelulares en este dominio es escasa. En él se puede encontrar un variado set de CAM que median las interacciones entre ambas células, incluyendo la familia de las Nectinas (Necl por su sigla en inglés *Nectin like proteins*), involucradas en la adhesión celular Ca^{+} independiente. Necl-1 y Necl-2 se expresan en el internodo axonal y promueven la adhesión y el mantenimiento del espacio periaxonal a lo largo de este por medio de su unión con Necl-4 (y probablemente Necl-2) en la membrana interna de la CS. Estas proteínas se encuentran además en las ISL promoviendo interacciones entre sus componentes y la mielina no compacta. Otra proteína altamente expresada en esta región es MAG (Trapp, 1990), la cual interactúa con componentes axonales y al igual que las Necl, se acumula en las ISL al madurar la mielina. Su principal función sería mediar las interacciones que regulan el diámetro del axón e inhiben el brotamiento axonal (Yin *et al.*, 1998).

1.3.3. MECANISMO DE ENSAMBLAJE DE LOS DOMINIOS.

Varias evidencias señalan que son las interacciones entre CS y axones las que dirigen el ensamblaje de los dominios axonales y determinan su ubicación (Peles y Salzer, 2000). Los eventos que ocurren durante el desarrollo están asociados a cambios en los perfiles de expresión de ambas células. Las CAM, los canales iónicos y proteínas asociadas al citoesqueleto se expresan a lo largo de todo el axón en etapas tempranas del desarrollo hasta el comienzo de la formación de la mielina, momento en que se redistribuyen en los distintos dominios. Estos últimos, se reúnen y maduran, tanto morfológica como molecularmente, en un patrón espacio-temporal característico. En el SNP, el armado avanza desde el nodo hacia el paranodo y juxtapanodo (Meléndez-Vázquez *et al.*, 2001 y Poliak *et al.*, 2002). Interacciones extracelulares e intracelulares dentro de los

dominios estabilizan la expresión de los distintos componentes (Salzer *et al.*, 2003). El contacto inicial de la CS con la membrana axonal es mediado en parte por CAM de la familia de las Nectinas, las cuales se acumulan junto a MAG a lo largo de la interface axón-glia, región que formará el futuro internodo. A su vez, Nf 155, Tag-1 y Gliomedina, importantes para las interacciones entre ambas células alrededor del nodo, se encuentran en el perímetro de la CS (Simons y Trotter, 2007).

El inicio de la formación de los nodos está estrechamente ligado al contacto con los extremos de las CS, que luego se fusionan y condensan (Vabnick y Shrager, 1998). Los canales de Na⁺ son los primeros agrupados en los nodos, seguido por la generación de la unión paranodal y más tarde por la agrupación de canales de K⁺ en la región juxtapanodal (Poliak y Peles, 2003). Los procesos gliales interactúan a través de un ligando, la Gliomedina, la cual forma multímeros al unirse con proteoglicanos heparan sulfato. Así, interacciona con CAM posicionándolas, y ellas son las encargadas de reclutar AG, creando así un sitio para nuclear canales de Na⁺ (Lambert *et al.*, 1997 y Eshed *et al.*, 2007).

Al igual que los nodos, la formación de paranodos depende de interacciones axo-gliales (Einheber *et al.*, 1997). La acumulación de los complejos Caspr/Contactina dependen de las interacciones con las CS mielinizantes (Rios *et al.*, 2000), las cuales estarían mediadas por Nf155 en los bucles gliales promoviendo el ensamblaje del complejo paranodal (Charles *et al.*, 2002). Este es luego estabilizado por interacciones con proteínas del citoesqueleto como 4.1B (Salzer *et al.*, 2003). Caspr2, canales de K⁺ y Tag-1 son detectados inicialmente en paranodos y posteriormente se trasladan a los juxtapanodos al formarse la unión paranodal. La consolidación de las uniones axo-gliales ocurre relativamente tarde y el proceso se da inicialmente en los bucles más cercanos a los nodos, continuando gradualmente a medida que los bucles se añaden al axón. Para que lo anterior ocurra, es necesaria la formación de los septos paranodales, estos son esenciales para secuestrar los canales de K⁺ en los juxtapanodos y funcionan como una valla que restringe la circulación de canales y otras moléculas debajo de la mielina hacia los nodos. Como resultado, la región paranodal se compone de una serie de anillos, donde cada uno representa un giro de la envoltura de mielina (Poliak y Peles, 2003).

1.4. FORMACIÓN Y FUNCIÓN DE LA VAINA DE MIELINA.

La mielinización es un proceso de múltiples pasos en el que una CS adhiere a un axón, y lo rodea y posteriormente se pliega entorno a él. La membrana de la CS forma repliegues concéntricos y espiralados rodeando el axón de 10-100 veces. El diámetro del axón está en relación con el espesor de esta vaina, es decir, con el número de vueltas de láminas de membrana de la CS e induce y promueve el crecimiento radial del axón. Esta relación es aproximadamente constante: el diámetro del axón es 0,6 veces el diámetro de la fibra. Una vez enrollada, ocurre la compactación del citoplasma. El grado de compactación de la fibra mielínica, es necesario pues ello contribuye a aislar al axón para una eficiente transmisión del impulso nervioso. De esta forma, un axón mielínico ocupa un volumen 100 veces menor que un axón amielínico (Cowan *et al.*, 1997).

Este proceso se produce durante un período prolongado en las tres primeras semanas de vida en los roedores, y en los seres humanos durante un período que se inicia en la vida embrionaria y termina con la pubertad (Berthold *et al.*, 2005). Comienza con el establecimiento de la polaridad celular por señales extrínsecas proporcionadas por el axón. El complejo Par-3, un miembro de la familia Par de proteínas adaptadoras, se localiza en la membrana glial interna adyacente al axón y actúa después de la adhesión al axón (Simons y Trotter, 2007). Señales axonales regulan la proliferación, supervivencia y la diferenciación de CS, y participan en la determinación del grosor mielínico. Señales gliales afectan al citoesqueleto y transporte axonal, y son requeridas para la supervivencia (Poliak y Peles, 2003). Como fue propuesto en los primeros estudios con microscopía electrónica (Geren y Schmitt, 1954), la vaina de mielina crecería ajustando su membrana interna a la circunferencia del axón, extendiéndose longitudinal y radialmente a medida que avanza el desarrollo. El espiral de membranas gliales es posteriormente compactado mediante la extrusión de citoplasma (con excepción de los bordes), lo que resulta en la organización multilaminar propia de la envoltura mielínica (Webster, 1993) (Fig. 1.4A).

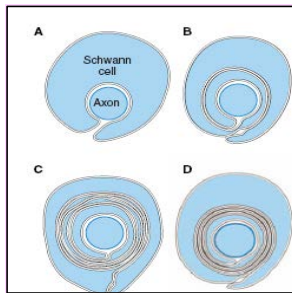


Figura 1.4A. Formación de la vaina de mielina en SNP. El axón es internalizado en una invaginación de la CS (A), sin embargo sus superficies externas no se han fusionado. La CS entra en contacto con el axón fusionándose al mesaxón y comienza a envolverla en forma espiralada (B). En etapas posteriores unas pocas capas de mielina se han formado pero aún no se compactaron (C) y finalmente ocurre la compactación quedando el citoplasma de la CS confinado a un anillo externo y otro interno (D). Esquema extraído de Quarles *et al.*, 2006.

A nivel ultraestructural, la mielina aparece como una estructura laminar que al microscopio electrónico se observa como líneas oscuras (electrondensas) y claras (translúcidas) alternadas que se disponen en espiral alrededor del axón. Esta asimetría estaría dada por la distribución de las proteínas en la membrana de las CS (Fig. 1.4B.).

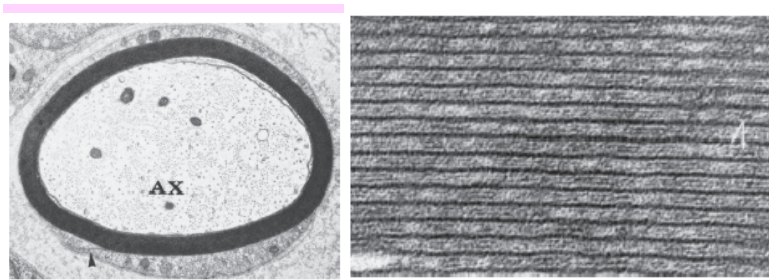


Figura 1.4B. Ultraestructura de la mielina. La imagen de la derecha es una micrografía electrónica de una fibra periférica de conejo. Se observa al axón (Ax) rodeado por una estructura laminar, la mielina. La flecha indica el citoplasma externo de la CS. La imagen de la izquierda muestra la imagen anterior a mayor aumento, se observa la serie de líneas electrón-densas y electrón-lúcidas, así como las interlíneas. Micrografías extraídas de Quarles *et al.*, 2006.

La principal función de la mielina es funcionar como un aislante y facilitar la propagación de la señal a través del axón, conservando la energía y el espacio (Fig. 1.4C). Los potenciales de acción generados en el segmento inicial del axón se regeneran en los nodos, lo cual resulta en un mecanismo más rápido y eficiente desde el punto de vista energético para la propagación del impulso (Salzer *et al.*, 1997). Al mismo tiempo cumple un rol fundamental en el mantenimiento de la integridad axonal, regula el diámetro axonal, el espaciamiento de los NF, su fosforilación y agrupa los canales de Na^+ en el nodo de Ranvier (Poliak y Peles, 2003). La CS y su lámina basal extracelular participan en la regeneración axonal y en la guía de los axones hacia su destino (Nguyen

et al., 2002). Igualmente, a pesar de la íntima relación con los axones, presenta la capacidad de interactuar con células externas al SN, como lo demuestra su capacidad de comunicarse con las células del sistema inmune a través de la expresión de moléculas MHC de clase II (Armati *et al.*, 1990; Armati y Pollard, 1996).

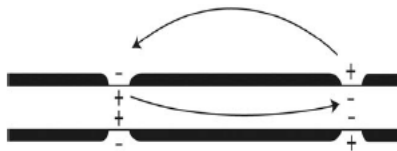


Figura 1.4C. Representación esquemática de conducción saltatoria del impulso nervioso. La figura representa la conducción saltatoria del impulso a lo largo de un axón mielinizado. Este mecanismo de conducción facilita una mayor velocidad de propagación del impulso el cual se desplaza de nodo en nodo. Los signos positivos (+) representan corrientes iónicas de entrada, los negativos (-) de salida.

1.4.1. COMPOSICIÓN Y ORGANIZACIÓN DE LA MIELINA.

Según el grado de compactación la vaina de mielina puede ser dividida en dos regiones estructural y funcionalmente distintas, constituyendo así dos subdominios: mielina compacta y mielina laxa. La primera región, cuya función es el aislamiento, inhibe completamente el intercambio de iones durante la conducción nerviosa. Esta ocupa regiones internodales comprendidas entre dos juxtapanodos de una misma CS y constituye la mayor proporción mielínica. Las ISL y los paranodos son los representantes periféricos de regiones de mielina laxa y se encuentran recorriendo longitudinal y transversalmente la mielina compacta.

1.4.1.1. MIELINA COMPACTA.

La mielina compacta tiene una composición que incluye principalmente colesterol y esfingolípidos así como algunos lípidos especializados tales como galactocerebrosido y sulfátido (Suter y Sherer, 2003). Una proporción menor se compone de proteínas, y su composición proteica es distinta a la presente en la mielina central. La glicoproteína P0 (Protein Zero) es una proteína integral de membrana de 28 kDa que constituye la mitad de las proteínas totales en el SNP (Greenfield *et al.*, 1973). A través de sus dominios extracelulares tipo inmunoglobulina (IgG) promueve adhesiones homofílicas y autotípicas formando tetrámeros. Estos cumplirían la función de unir las láminas mielínicas adyacentes a intervalos espaciales regulares (Fig. 1.4.1). PLP o proteína proteolipídica es el mayor constituyente de la mielina del SNC y se encuentra en bajos niveles en la periférica. Otras dos proteínas la caracterizan: la proteína de unión a la

mielina (del Inglés *Myelin Binding Protein*, MBP), que se ubica en la cara citosólica de la membrana glial y representa entre un 10 y un 30% del total de las proteínas mielínicas y la proteína mielínica periférica 22 (PMP-22), una proteína integral que alcanza el 5% del total de las proteínas mielínicas (Cowan *et al.*, 1997; Oguievetskaia *et al.*, 2005). P2, al igual que MBP está cargada positivamente, y se asocia a la superficie citosólica de la membrana de la CS. Su función en la mielina estaría relacionada con la solubilización y el transporte de ácidos grasos (Fig. 1.4.1).

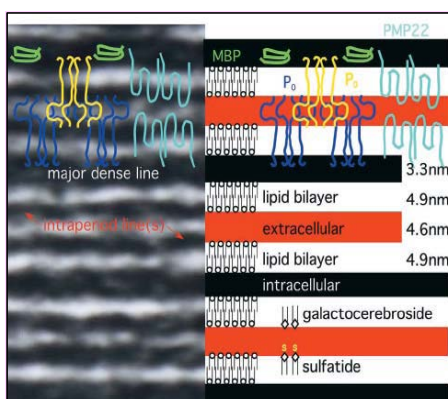


Figura 1.4.1. Localización de las proteínas de la mielina compacta. El panel de la izquierda muestra una micrografía electrónica de la mielina compacta, la cual consiste en capas alternantes conocidas como líneas intraperiodo (IPL) y las líneas densas mayores (MDL). El panel derecho muestra esquemáticamente la disposición de las membranas celulares para generar este tipo de líneas. P0 se dispone en forma de tetrámero, PMP-22 como dímero y MBP como monómero. Se representan además galactocerebrosidos y sulfátidos y los grosores aproximados de las capas lipídicas y de los espacios tanto extracelulares como intracelulares (Vonasek *et al.*, 2001). Imagen tomada de Sherer y Arroyo, 2002.

1.4.1.2. MIELINA LAXA.

Representan la minoría en cuanto a proporción de la mielina total y está caracterizada por la presencia de uniones autotípicas adherentes, uniones estrechas y uniones comunicantes entre las membranas plasmáticas de las CS mielinizantes. Las uniones adherentes, tanto en los contactos entre bucles paranodales con el axón como en las ISL, están constituidas por complejos transmembrana ϵ -Caderina/ β -Catenina en estrecha asociación con el citoesqueleto de actina. La ϵ -Caderina podría estar involucrada en la estabilización de la mielina laxa. Este tipo de unión a nivel de los bucles son la unión intercelular continúa más grande conocida proporcionando una barrera paracelular que enlentece la difusión iónica fuera del nodo (Fannon *et al.*, 1995). Las uniones estrechas están formadas por pequeñas proteínas de la familia de las claudinas, proteínas integrales de membrana, e implican una barrera para la difusión de componentes de membrana, asegurando la separación de los diferentes dominios celulares. Las uniones comunicantes están formadas por la fusión de dos hemicanales o conexones, constituidos cada uno, a su vez, por 6 conexinas (Nicholson, 2003). A través de ellas

ocurre el pasaje de iones y moléculas pequeñas entre los distintos compartimientos citoplasmáticos de la CS.

Las ISL son canales citoplasmáticos en espiral que presentan forma de embudo e interrumpen la apariencia densa de la mielina proporcionando un canal de comunicación entre los compartimientos citoplasmáticos interior y exterior. Su función es desconocida aunque se han postulado varias hipótesis en cuanto a su participación en el crecimiento y mantenimiento de las vainas así como su utilidad como atajo citoplasmático para sustancias que atraviesan las vainas desde las regiones más externas hacia las internas y hacia el axón. Son estructuras importantes para la integridad a largo plazo de la mielina periférica (Scherer y Arroyo, 2002) (Fig. 1.4.1.2). La conexina 32 (Cx32) y la conexina 29 (Cx29) forman parte de las ISL. En esta región también es posible localizar a MAG en las membranas gliales periaxiales así como en las ISL, y en los loops (Scherer *et al.*, 1995). Participa en la adhesión y señalización entre las células formadoras de mielina y el axolema.

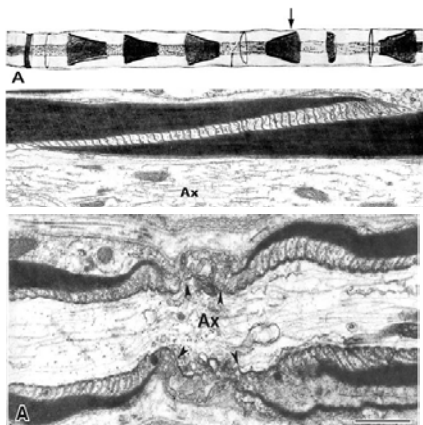


Figura 1.4.1.2. Incisuras Schmidt-Lanterman y loops paranodales. En la figura superior se observa en el panel superior un dibujo de Ramón y Cajal (1928) mostrando el arreglo tipo “embudo” de las incisuras en una fibra miélnica del SNP. En el panel inferior se observa una microscopia electrónica de una sección longitudinal de una incisura. Ax=axón. En la figura de la inferior se muestra una microscopia electrónica de una sección longitudinal de una fibra miélnica. Imágenes tomadas de Lazzarini, Myelin biology and Disorders, 2002.

1.5. NEUROPATÍAS HEREDITARIAS PERIFÉRICAS.

Las neuropatías hereditarias periféricas constituyen un grupo heterogéneo de trastornos del SNP que difieren tanto desde el punto de vista clínico como genético e incluyen una amplia serie de síndromes. Producen degeneración progresiva de los nervios periféricos, llevando a inestabilidad en la mielina puesta de manifiesto en la velocidad de conducción (Suter y Snipes, 1995). A grandes rasgos, los individuos afectados presentan disturbios sensoriales y motores, debilidad muscular y atrofia. Típicamente

afectan CS y axones mielinizados del SNP, aunque también pueden ser parte de otros síndromes hereditarios (Suter y Scherer, 2003). Comprenden un grupo de patologías que incluyen neuropatías hereditarias no sintomáticas o Charcot Marie Tooth (CMT), neuropatías hereditarias con sensibilidad a la presión (HNPP, por su sigla en Inglés *Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies*), neuropatía Dejerine-Sottas (DSS) y la neuropatía congénita hipomielinizante (CHN) (Khajavi *et al.*, 2007; Devaux y Scherer, 2005; Suter y Scherer, 2003) (Fig 1.5).

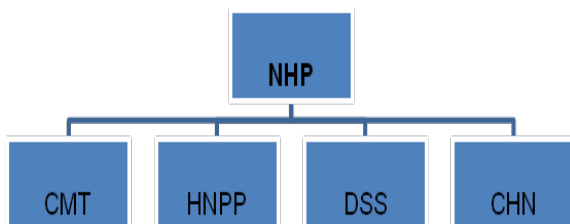


Figura 1.5. Diagrama de Flujo de los distintos tipos de neuropatías que integran las Neuropatías Hereditarias Periféricas.

Detallaremos brevemente algunas de las neuropatías, más adelante hablaremos en profundidad de CMT. HNPP se trata de trastorno autosómico dominante caracterizado por episodios de percepción disminuida después de una leve tracción o compresión sobre los nervios periféricos. Las velocidades de conducción motoras y sensitivas pueden estar disminuidas. Es frecuente encontrar signos de neuropatía focal y desmielinización axonal a intervalos a lo largo del internodo comúnmente denominados estructura en tomáculas (Amici *et al.*, 2007). También se observan zonas de atrapamiento en el túnel carpiano donde hay bloqueo de la conducción nerviosa en (Cruz-Martínez *et al.*, 1997). El término DSS se refiere a neuropatías desmielinizantes agresivas, con muchas similitudes clínicas, neurofisiológicas y patológicas a las de la neuropatía CMT1, pero puede presentar retraso en la adquisición de habilidades motoras y velocidades de conducción nerviosa (VCN) motoras menores de 10 m/s. A nivel histopatológico se observan lesiones de desmielinización y remielinización en determinados segmentos, con formación de bulbos de cebolla y mielina más delgada. Si es reconocida clínicamente tarde en la infancia por lo general se clasifica dentro de las DSS, si se identifica al nacimiento se le llama CHN (Suter y Scherer, 2003). Esta última se caracteriza clínicamente por hipotonía infantil debida a debilidad muscular distal, arreflexia y VCN motora muy reducida (<10 m/s). En los casos graves puede ocurrir

alteración del proceso de desarrollo de la mielinización o desmielinización. Los pacientes exhiben falta de regeneración de la mielina, mielina muy finas o ausencia y no muestran bulbos de cebolla.

1.5.1. CMT.

En 1886, los patólogos franceses Charcot y Marie, describen pacientes con una forma hereditaria de atrofia muscular peroneal, con debilidad progresiva y atrofia de los músculos distales, que comienza en los pies y piernas para progresar eventualmente a las manos (Charcot *et al.*, 1886). En el mismo año, Tooth en Inglaterra publica su tesis remarcando una patología con tipo similar de atrofia muscular progresiva que afecta los nervios periféricos (Tooth, 1886). A esta entidad no sintomática se la ha conocido como trastorno de CMT y constituye la neuropatía hereditaria que reúnen los desórdenes hereditarios más frecuentes del SNP. Con una incidencia estimada de 1:2500, CMT1 es uno de los desórdenes genéticos humanos más comunes del SNP (Skre *et al.*, 1974) y constituyen un conjunto de patologías que afectan a sus principales células: CS, neuronas sensitivas y motoras y la relación entre ambas.

Clásicamente se han delineado dos grandes tipos de neuropatía sensitivo-motora hereditaria con un similar fenotipo clínico; distinguiéndose un tipo desmielinizante (CMT1) y un tipo neuroaxonal (CMT 2). Las CMT1 consideradas genéricamente como schwannopatías, serán detalladas más adelante. CMT2, que agrupa a las axonopatías, presenta una velocidad de conducción casi normal o ligeramente disminuida y disminución de la cantidad de axones mielinizados, con signos importantes de degeneración axonal. Ambos grupos son genéticamente diferentes y el tipo de herencia es habitualmente de forma autosómica dominante aunque también existen formas recesivas y ligadas al cromosoma X (Vallat, 2003; Suter y Sherer, 2003; Vallat *et al.*, 2005).

La edad en la cual comienzan a observarse manifestaciones clínicas es variable dependiendo de las distintas formas, y pacientes, suele ocurrir en las primeras dos décadas de vida. La evolución clínica es crónica y lentamente progresiva. En consonancia con el avance en el conocimiento genético de estas afecciones ha surgido una amplia clasificación (Berciano y Combarros, 2003; Inherited Peripheral Neuropathies Mutation Database). La figura 1.5 muestra algunas de las proteínas que se encuentran alteradas genéticamente y provocan CMT.

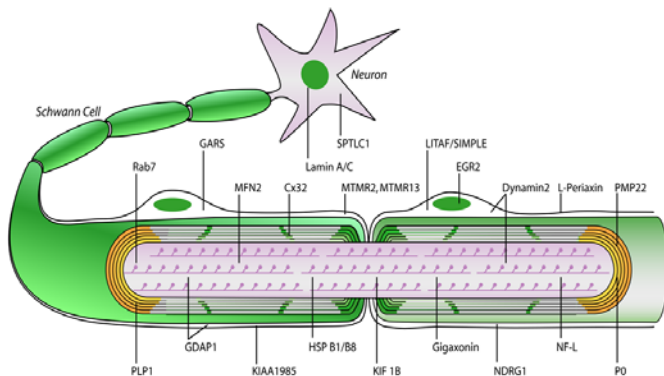


Figura 1.5. Esquema de proteínas que se encuentran mutadas en CMT. Se representa la localización normal de proteínas en CS y / o neuronas que pueden verse alteradas en CMT. Tomado de Niemann *et al.*, 2006.

1.5.2. CMT1 y 1A.

Las neuropatías desmielinizantes (CMT1) presentan mutaciones que alteran la integridad estructural de la mielina (proteínas de la mielina laxa y compacta). Las mutaciones que afectan PMP-22 representan el 70% de las mielinopatías, siguiendo en importancia mutaciones que afectan la Cx32. Finalmente, las mutaciones del gen que codifica para la proteína P0 (MPZ), se asocian no sólo a las CMT de tipo 1 sino también a otras neuropatías periféricas (Suter y Scherer, 2003).

Fenotípicamente, se identifican claramente las CMT1 por pérdida de masa muscular, debilidad muscular, electromiograma con signos espontáneos de denervación muscular y de pérdida axonal. La desmielinización altera la distribución de los canales iónicos axonales, los cuales pueden empeorar la regeneración y la propagación de los potenciales de acción (Poliak y Peles, 2003). La reducción en la VCN, aparece aún antes que los signos clínicos, sirviendo en el diagnóstico precoz de la enfermedad y tempranamente no se correlaciona obligatoriamente con otros síntomas (Fig. 1.5.2A).



Figura 1.5.2A. Imágenes características de pacientes CMT. Las imágenes ilustran la atrofia y debilidad de los miembros distales. A medida que la enfermedad progresa ocurre un arqueado del pie provocando deformidad, el paciente desarrolla lo que se denomina pie cavus (figura derecha).

Histológicamente, los detalles relevantes son la desmielinización segmental, la remielinización paranodal e imágenes de la mielina conocidas como hiperplasia concéntrica o “bulbos de cebolla”. Dependiendo de los defectos moleculares que causan la CMT1, esta puede a su vez ser clasificada en los subtipos CMT1A, B, C, D, E y F (Fig. 1.5.2B), siendo la CMT1A el más común de CMT1 en los países occidentales (Banchs *et al.*, 2009).

Tipo	Gen	Herencia	Locus
CMT1A:	PMP-22	Dominante/ esporádico	17p11
NHLP	PMP-22	Dominante	17p11
CMT1B:	MPZ	Dominante	1q22
CMT1C:	LITAF	Dominante	16p13
CMT1D:	EGR2	Dominante	10q21
CMT1E:	MPZ	Dominante	1q22
CMT1F:	Neurofilament Light chain	Dominante/ esporádico	8p21

Figura 1.5.2B. Clasificación de los distintos tipos de CMT1.

Usualmente CMT1A es causada por una duplicación de un fragmento de 1.5 Mb en el brazo pequeño del cromosoma 17 (17p11) que engloba el gen codificante de PMP22, aunque en un porcentaje menor el gen puede presentar mutaciones puntuales. El mapeo del cromosoma 17 y ensayos de hibridación in situ revelaron que la duplicación es en tándem e incluye el gen pmp22 en su totalidad y sin interrupción (Valentijn *et al.*, 1992). La región duplicada se encuentra flanqueada por dos copias de una secuencia de repetidos de más de 17 kb, las que se denominan CMT1A-REP (Patel y Lupski, 1994). Las CMT1A-REP podrían estar involucradas en el entrecruzamiento desigual entre cromosomas homólogos durante la meiosis (Huxley *et al.*, 1998). Tanto la depleción presente en HNPP, como la duplicación presente en la mayoría de las CMT1A parecen ser producto de la recombinación recíproca, siendo el primer ejemplo de dos enfermedades humanas asociadas con el mismo evento mutacional (Patel y Lupski, 1994) (Fig.1.5.2C).

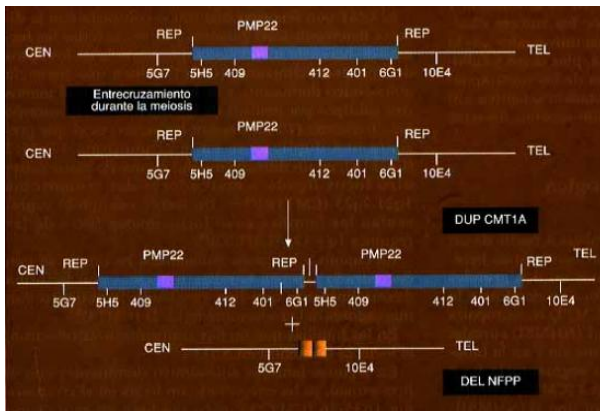


Figura 1.5.2C. Esquema del mecanismo de producción de la duplicación CMT1A y de la deleción en HNPP.

Debido al mal alineamiento de las secuencias repetitivas CMT1A-REP (REP en la figura) que flanquean la región de 1.500 kb se provoca un entrecruzamiento desigual en la meiosis. Se generan dos productos en espejo, una duplicación en tándem y una deleción. El gen PMP22 está indicado por un segmento en azul.

1.6. MODELOS ANIMALES DE CMT1A.

Los modelos animales son muy útiles para estudiar los procesos fisiopatológicos de las neuropatías periféricas. Al mismo tiempo pueden ser de gran utilidad para el ensayo de nuevos fármacos y aproximaciones terapéuticas. En la actualidad existen modelos naturales, transgénicos o “knock-out” en ratón o en rata de varios de los genes involucrados en la patogénesis de las neuropatías desmielinizantes. En particular, en la neuropatía periférica más común, CMT1A, es sabido que duplicaciones, deleciones y mutaciones puntuales en el gen que codifica PMP22 son las principales causantes del desarrollo de la misma (Lupski y Garcia, 2001) y existen modelos específicos para cada una de estas causantes genéticas.

La disponibilidad de un modelo animal confiable y capaz de reproducir el fenotipo clínico de la enfermedad permite el desarrollo de estrategias efectivas de tratamiento (Sereda y Nave, 2006). Los modelos generados hasta la fecha están abriendo la puerta a la posibilidad de terapias génicas y proporcionan un mayor conocimiento sobre el mecanismo biológico a través del cual las CS y las neuronas trabajan juntas para el mantenimiento del SNP.

1.6.1. MODELOS NATURALES: RATONES *TREMBLER (TR)* Y *TREMBLER-J (Trj)*.

En 1946 en el Instituto de Genética Animal de Edinburgo, se descubrió una cepa de ratones que temblaba al caminar a la cual se denominó *Trembler (Tr)*. Falconer en 1951, describe sus características comportamentales y su genética mendeliana. Indica además, que los ratones *Tr* son portadores de una mutación espontánea con carácter dominante y

sufren de temblores y parálisis espásticas, particularmente en las extremidades posteriores. Recién en 1973 los primeros análisis histológicos completos del SNP revelaron que sufrían un déficit periférico severo (Ayers y Anderson, 1973). Luego de 30 años, una segunda cepa de ratones con temblores apareció en el Laboratorio Jackson. A esta nueva cepa se la llamo *Trembler-J (TrJ)* (Sidman *et al.*, 1979). Los ratones heterocigotos *TrJ/+* muestran una parálisis espástica y un temblor generalizado. Mientras que los ratones de genotipo homocigota *TrJ/TrJ* muestran la deficiencia mielínica periférica más severa, provocando la muerte antes del destete (Henry *et al.*, 1983)¹. La primera evidencia genética que indicó que ambos ratones serían consecuencia de mutaciones en el mismo gen surgió del descubrimiento de que la frecuencia de recombinación entre el locus *Tr* y el locus del gen vestigial de la cola (*vg*) y *TrJ* y *vg* en el cromosoma 11 era idéntica (Henry *et al.*, 1983). En 1992 a través de estudios de mapeo cromosómico se descubrió PMP22 en el cromosoma 11 de ratón y fue identificada como el gen patogénico que causaba la neuropatía en ratones *Tr* y *TrJ*. Este cromosoma murino y el cromosoma 17 humano presentan regiones de sintenia conservada (Buchberg *et al.*, 1989), por este motivo PMP22 se convirtió en el principal sospechoso en la búsqueda del gen generador de CMT1. Los ratones *Tr* son portadores de una mutación puntual en el gen *pmp22* que afecta el cuarto dominio transmembrana de la proteína ocasionando una sustitución de una Glicina por un Ácido aspártico (G160D) en el residuo 160 (Suter *et al.*, 1992a). La mutación presente en el ratón *TrJ*, es una mutación puntual de carácter autosómico semi-dominante, que afecta el primer dominio transmembrana, provocando el reemplazo de una Leucina en el residuo 16 por una Prolina (L16P) (Suter *et al.*, 1992 a y b; Notterpek *et al.*, 1997; Quarles *et al.*, 2006). Estas sustituciones impiden el normal plegamiento de la proteína, su inserción en la membrana y una normal mielinización. Los hallazgos patológicos encontrados en sus nervios incluyen disminución marcada de la mielinización del axón con perfiles de degeneración axonal, excesiva proliferación de CS y una lámina basal redundante (Henry *et al.*, 1983). Si bien ambos mutantes presentan fenotipos similares, hay diferencias importantes entre ellos (Suter *et al.*, 1992b). A medida que los ratones *Tr* envejecen se observa una disminución del número de fibras mielinizadas, así como del grosor de la mielina y estructuras en “bulbo de cebolla”. También se observa una

¹ A partir de aquí cuando mencionemos a los ratones *TrJ* estaremos hablando de individuos de genotipo heterocigotos *TrJ/+*.

morfología anormal a nivel axonal. Los ratones *Tr/+* o *Tr/Tr* no presentan diferencias en el fenotipo indicado. Los ratones *TrJ/+* presentan una deficiencia de mielina más leve de la presentada en los *Tr* de edad similar, sus fibras aumentan de diámetro con la edad, están envainadas por mielinas finas y presentan escasas estructuras en “bulbo de cebolla”. Los ratones *TrJ/TrJ* mueren a los pocos días de vida, en contraste con la larga vida de los *TrJ/+*, *Tr/Tr* ó *Tr/+*, lo cual sugiere un posible efecto de dosis génica (Henry *et al.*, 1983).

La diferencia en el desarrollo de la patología en ambas cepas murinas podría deberse al distinto tráfico intracelular de PMP22 mutante expresada en los ratones *Tr* y *TrJ*. Ambas proteínas portan alteraciones en diferentes dominios lo cual no solo genera modificaciones en su inserción en la membrana, sino que podría afectar interacciones extra o intracelulares con si misma o con otras moléculas (Suter *et al.*, 1992b). Los resultados indican que ambas proteínas mutantes tienen un tráfico intracelular diferente donde PMP22-*Tr* no se transloca hacia el exterior del retículo endoplasmático acumulándose en éste, mientras que PMP22-*TrJ* es translocada hacia el citosol, pero se acumula en un compartimiento intermedio. Estas proteínas entonces no sólo pierden la capacidad de plegarse correctamente sino que adquieren un efecto tóxico para la CS al acumularse en el retículo endoplasmático o en el citosol (Tobler *et al.*, 2002). El fenotipo histológico de los ratones *Tr* asociado a una patología más severa coincide con las alteraciones patológicas observadas en pacientes afectados por DSS, incluso se detectó la presencia de una mutación idéntica a la *Tr* en pacientes DSS (Ionasescu *et al.*, 1997). Por este motivo se utiliza como modelo de DSS. El fenotipo *TrJ* se correlaciona con el progreso y severidad de pacientes CMT1A (Martini, 1997), además es sensible a la dosis génica, al igual que en humanos (Roa *et al.*, 1993). El ratón *TrJ* es frecuentemente usado como un modelo CMT1A (Devaux y Scherer, 2005; Sereda y Nave, 2006) y ha sido señalado en la literatura como un modelo válido para el estudio de neuropatías hereditarias periféricas (Fortun *et al.*, 2007, 2005).

1.6.2. EVIDENCIAS A FAVOR DEL MODELO *TRJ*.

- Los ratones que expresan un bajo número de copias adicionales del gen generan neuropatías que imitan las características patológicas de los pacientes CMT1A portadores de la duplicación de 1.5 Mb. Los ratones *TrJ* exhiben una mielina severamente afectada y una disfunción del SNP muy similar a lo que se observa

en humanos nacidos con las mismas mutaciones (CMT1A severa y DSS) (Myers. *et al.*, 2008).

- Estos ratones modelan el comportamiento y el fenotipo histopatológico del trastorno (Notterpek y Tolwani, 1999). Tanto los ratones como los humanos presentan deficiencias en la mielina de nervios periféricos, estructuras “bulbos de cebolla” rodeando los nervios periféricos (causadas por proliferación continua de la CS, no tan evidente en *TrJ*) y una alterada VCN (Magyar *et al.*, 1996; Patel y Lupski, 1994). A su vez se ha detectado la presencia de agregados de PMP22 en el citosol de pacientes CMT1A que carecía de la duplicación de 1.5 Mb (D’Urso *et al.*, 1998).
- La misma sustitución aminoacídica fue encontrada en una familia humana que padecía CMT1A (Valentijn *et al.*, 1992).

1.7. PMP22.

Esta proteína ha sido intensamente estudiada y ha atraído la atención de varios autores durante los últimos años. Su hallazgo en diferentes tejidos así como la posibilidad de sus varias funciones, la señalan como una proteína versátil de la cual aún queda mucho por descubrir.

1.7.1. TRANSCRIPTOS DE PMP22.

El primer ADNc aislado de PMP22 fue conseguido a partir de fibroblastos NIH3T3 como el gen específico de detenimiento del crecimiento 3 (*gas-3*). Esto reveló que el ARNm de la PMP22 es idéntico al ARNm de la proteína específica de detenimiento del crecimiento 3, un transcripto que ha sido asociado con el detenimiento del crecimiento celular durante la fase G0 en fibroblastos en cultivo (Schneider *et al.*, 1988; Manfioletti *et al.*, 1990; Welcher *et al.*, 1991; Spreyer *et al.*, 1991; Parmantier *et al.*, 1995). Comparaciones de las variantes de PMP22 en bovinos, ratas y humanos revelan un alto grado de homología al *gas-3* murino (Schneider *et al.*, 1988; Manfioletti *et al.*, 1990; Welcher *et al.*, 1991; Spreyer *et al.*, 1991).

En rata y ratón se han encontrado dos ADNc de PMP22 que se han denominado SR13 y CD25 (Spreyer *et al.*, 1991; Welcher *et al.*, 1991; Parmantier *et al.*, 1995). Su tamaño aproximado es de unas 1.8 kb (Boose *et al.*, 1994) y sus secuencias nucleotídicas

presentan regiones 3'-UTR idénticas pero difieren marcadamente en la región 5'-UTR (Spreyer *et al.*, 1991; Welcher *et al.*, 1991; Parmantier *et al.*, 1995). Ambos transcriptos están presentes en el SNP, sin embargo los niveles de CD25 son aproximadamente 7 veces más elevados que los de SR13. Se han observado cantidades sustanciales del ARNm SR13 en varios tejidos no-neuronales como el pulmón, el corazón, el músculo esquelético y el colon. En contraste, fuera del SNP apenas se pudo detectar el ARNm CD25 (Bosse *et al.*, 1994; Parmantier *et al.*, 1995). El gen pmp22 humano es regulado por dos promotores alternativos que se localizan inmediatamente corriente arriba de dos exones 5' alternativos no codificantes, el exón 1A y el exón 1B. Los transcriptos conteniendo el exón 1A se asocian con la formación de la mielina y los transcriptos contenidos en el exón 1B se hallan predominantemente en tejidos no neuronales y en fibroblastos primarios de crecimiento detenido (Ohsawa *et al.*, 2006; Suter *et al.*, 1994). El transcripto conteniendo el exón 1B también se correlaciona con la formación de la mielina, aunque en un grado mucho menor (Suter *et al.*, 1994).

1.7.2. PMP22 MADURA.

PMP22 es una pequeña proteína integral de membrana de 22 Kd que incluye 4 dominios transmembrana y dos bucles extracelulares (Welcher *et al.*, 1991; Spreyer *et al.*, 1991). El primer loop extracelular es glicosilado post-traduccionalmente y contiene un epítipo L2/HNK1 que es conocido por su participación en interacciones de adhesión (Snipes *et al.*, 1993; Griffith *et al.*, 1992). Ambos extremos terminales están expuestos al citoplasma (D'Urso *et al.*, 1997). Constituye el 2-5% de las proteínas mielínicas y está involucrada en etapas tempranas de la mielinización. Se postula un rol estructural y quizás estabilizador de la integridad proteica de la membrana (Suter y Scherer, 2003, Noteerpek *et al.*, 1999). Mutaciones que alteran su gen causan variadas neuropatías hereditarias y su participación en el desarrollo de las mismas, dan muestras de sus múltiples roles en la biología del nervio y mielinización del SNP (Snipes y Suter 1995; Noteerpek *et al.*, 1999).

Se expresa temprano en el desarrollo y podría participar en la interacción entre CS y axones periféricos. Su expresión es necesaria tanto para el inicio como para el mantenimiento de la mielina. La PMP22 se transloca a la membrana de la CS en cantidades detectables solo luego que se ha formado la lámina basal y después de que esta haya dado su primera vuelta alrededor del axón. Su translocación no está

estrictamente relacionada con la formación de la mielina compacta (Noteerpek *et al.*, 1999). En ausencia de axón la mayoría de PMP22 se encuentra en el complejo de Golgi (Pareek *et al.*, 1997). En cultivos de CS es detectada en el plasma solo luego de un tratamiento con Ácido Ascórbico el cual estimula la mielinización a través de la síntesis de colágeno y la lámina basal (Podratz *et al.*, 2001). Su expresión ocurre luego de la de GalC y MAG, coincide con P0 y precede a MBP. Los niveles de la proteína aumentan substancialmente durante los estadios tardíos en la formación de la mielina. En ausencia de neuronas su expresión es mucho menor que *in vivo*, lo cual sugiere una influencia axonal (Pareek *et al.*, 1997). Alteraciones en la dosis de su gen provoca profundos efectos en el desarrollo y mantenimiento de los nervios periféricos. Estudios *in vitro* sugieren un rol de la PMP22 en la regulación de la proliferación celular y la apoptosis (Fabbretti *et al.*, 1995; Zoidl *et al.*, 1995). Su expresión *in vitro* en CS reduce el crecimiento celular y retrasa la transición de G0/G1 a la fase S del ciclo celular (Zoidl, G. *et al.*, 1995) y puede en algunas instancias llevar a la apoptosis (Fabbretti *et al.*, 1995; Zoidl *et al.*, 1997), mientras que la sobre-expresión en fibroblastos NIH-3T regula la propagación de las células, un efecto que es dependiente de la vía Rho-GTPasa (Brancolini *et al.*, 1999). Por el contrario niveles reducidos del ARNm de pmp22 se asocian con un aumento en la síntesis de ADN y la entrada en la fases S + G2/M (Zoidl *et al.*, 1995).

1.7.3. EXPRESIÓN DE PMP22 FUERA DEL SNP.

PMP22 es expresada en varios tejidos no neurales y en el SNC, pero no a los mismos niveles que en las CS del SNP (Welcher *et al.*, 1991; Spreyer *et al.*, 1991, Snipes *et al.*, 1992). Se ha visto que ambos transcritos de PMP22 están presentes en el ARN extraído del cerebro total, aunque en niveles mucho menores que en el SNP (Spreyer *et al.*, 1991; Welcher *et al.*, 1991; Bosse *et al.*, 1994; Parmantier *et al.*, 1995). Se hallaron transcritos conteniendo el exón 1A en el bulbo raquídeo, en la médula espinal y en el cuerpo caloso. Se atribuye la expresión del ARNm de la PMP22 en el bulbo raquídeo y en la médula espinal a que los mismos contienen nervios craneanos, o raíces ventrales y dorsales. Estos resultados fueron similares para los obtenidos para los cerebros de rata y ratón. El ARNm SR13 análogo al transcrito humano conteniendo el exón 1B fue detectado en todas las regiones del SNC, mientras que el ARNm CD25 análogo al transcrito humano conteniendo el exón 1A, fue detectado únicamente en la médula

espinal y en el tronco cerebral (Parmantier *et al.*, 1995; Ohsawa *et al.*, 2006). Sin embargo, la razón de la existencia de transcritos del exón 1A en el cuerpo caloso de humanos y otros tejidos es incierta. Mediante RT-PCR se detectó la presencia de ambos transcritos en el lóbulo frontal del cerebro humano (Ohsawa *et al.*, 2006).

Se ha reportado además, expresión PMP22 en la piamadre, en uniones intercelulares en hígado, intestino y células epiteliales en cultivo. Participaría además en el desarrollo y maduración de la barrera hematoencefálica y en las uniones neuroepiteliales de la zona subventricular en el cerebro embrionario de rata (Ohsawa *et al.*, 2006).

1.8. RUTAS DE DEGRADACIÓN Y FORMACIÓN DE AGREGADOS.

El plegamiento proteico se produce de forma co-traduccional, ni bien el polipéptido naciente sale de la subunidad grande del ribosoma o luego de su transporte a compartimientos subcelulares específicos. Ocurre como consecuencia de su secuencia aminoacídica, por la formación de interacciones hidrofílicas, el colapso de las regiones hidrofóbicas y el enmascaramiento de interacciones electrostáticas. Así se llega generalmente a la conformación nativa de la proteína, estado de menor energía libre de Gibbs (Olzmann *et al.*, 2008). El plegamiento incorrecto es un evento frecuente resultado de múltiples factores, dentro de los que se encuentra la presencia de mutaciones puntuales, como ocurre en el gen que codifica la PMP22 presente en ratones *TrJ*. Las células eucariotas han desarrollado mecanismos complejos para la degradación de proteínas y su regulación ha dado origen a procesos celulares fundamentales (Ciechanover *et al.*, 2005, 2006; Hershko, y Ciechanover, 1998). Las rutas celulares de degradación incluyen el Sistema Ubiquitina-Proteosoma (SUP) y la ruta autofágica-lisosomal (Rangaraju *et al.*, 2008).

La formación de agregosomas se reconoce como una respuesta citoprotectora cuya función es secuestrar proteínas no funcionales potencialmente tóxicas y facilitar su limpieza. La acumulación de proteínas en inclusiones proteináceas es una característica común de varias patologías neurodegenerativas (Olzmann *et al.* 2008) y en particular CMT1A lleva este sello celular. Los agregados proteicos, agregosomas, se forman cuando los mecanismos de control de calidad del tráfico y/o degradación de un polipéptido se exceden (Goldberg *et al.*, 2003). Entonces, los mecanismos de control celular que previenen la acumulación proteica se activan para así mantener la

homeostasis celular. La primera defensa contra la acumulación de proteínas mal plegadas la constituyen las chaperonas (HSP por su sigla en Inglés Heat Shock Proteins), las cuales interactúan transitoriamente con las proteínas nacientes, colaborando con su plegamiento, tráfico y degradación. Aumentan la eficiencia de plegamiento mediante la estabilización de regiones particulares y previniendo interacciones no específicas, plegamiento erróneo y agregación de proteínas (Dobson, 2003). Si aun así, el plegamiento o transporte de un polipéptido naciente falla, este será marcado para su degradación por el SUP. El proteosoma es un complejo multi-catalítico involucrado en variedad de procesos celulares, que incluyen la degradación de la mayoría de las proteína solubles intracelulares (Ciechanover *et al.*, 2005, 2006) y proteínas de corta vida media (Goldberg, 2003). También puede degradar proteínas transmembrana en el caso de que se encuentren dispersas en el citosol celular (Nakatsukasa *et al.*, 2008). El mecanismo de ubiquitinación por el cual las proteínas son marcadas para la degradación incluye una cascada de ubiquitinaciones múltiples y la participación de diferentes enzimas. La ubiquitina (Ub), un polipéptido de 76 AA, se une covalentemente a varias moléculas. El sustrato ubiquitinizado es reconocido por el proteosoma. La conjugación a Ub es un proceso de varios pasos que requiere la acción secuencial de tres enzimas. Primero, la Ub es activada por E1 en un proceso que requiere ATP. El segundo paso consiste en transferir la Ub al centro activo del E1, con la liberación de AMP. Luego la Ub activada es transferida a E2 a través de una reacción de transtioesterificación. En el paso final, se requiere la actividad de enzimas ligasas E3 que se unen al sustrato y catalizan la transferencia de la Ub activada de E2 al sustrato a través de la formación de una unión isopeptídica covalente (Fig. 1.8A). El complejo proteosomal 26S contiene un core catalítico de 20S con forma de barril cubierto por un complejo regulatorio de 19S (Goldberg, 2003).

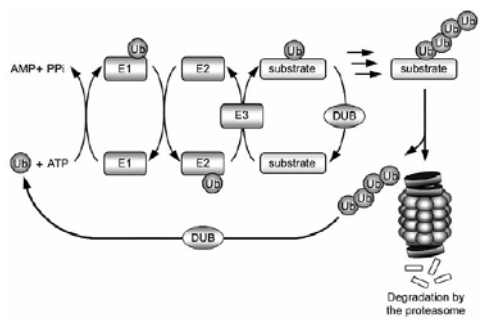


Figura 1.8A. SUP. Los sistemas proteolíticos intracelulares reconocen y destruyen proteínas dañadas, mal ensambladas, regulatorias y/o de vida corta. La unión covalente de la Ub al sustrato ocurre a través de la acción secuencial de E1, E2 y E3. Figura extraída de <http://www.its.caltech.edu>.

Finalmente, si los sistemas anteriores no funcionan aún restan los lisosomas, en ellos se degradan mayormente proteínas de membrana y proteínas endocitadas, pero también pueden digerirse proteínas citosólicas a través de autofagia. La autofagia es el evento responsable de la degradación de cargos citoplasmáticos a través de su secuestro en autofagosomas y posterior fusión con lisosomas (Klionsky y Emr, 2000). Consiste en la maduración progresiva de vesículas que se entregarán a los lisosomas para su degradación (Fig 1.8B).

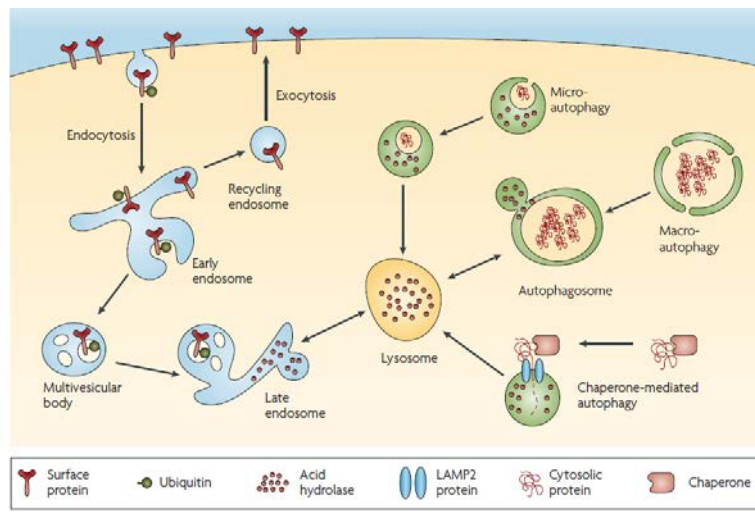


Figura 1.8B. Rutas lisosomales. Los lisosomas son organelos que contienen hidrolasas ácidas que rompen biopolímeros y otras biomoléculas. La primera ruta catabólica de las proteínas de membrana es la endocitosis seguida por su clasificación en endosomas y lisosomas tardíos. Muchos tipos de señales pueden regular la endocitosis y la clasificación, incluyendo la mono-ubiquitinación. Las proteínas de membrana endocitadas llegan primero a los endosomas tempranos y luego son clasificadas en endosomas de reciclaje (para retornar a la superficie por exocitosis) o en cuerpos multi-vesiculares (para su posterior transporte a endosomas tardíos o lisosomas). Figura extraída de Ching Tai y Schuman, 2008.

Las hidrolasas ácidas en el lumen de los lisosomas (pH 4-5) y endosomas tardíos (pH 5-6) interactúan y degradan las proteínas internalizadas por diferentes mecanismos de autofagia. La fusión puede ocurrir por dos mecanismos diferentes, la macroautofagia y microautofagia. En la primera grandes cantidades de materiales citosólicos o incluso orgánulos son rodeados por una estructura de doble membrana (autofagosoma) que se fusiona con los lisosomas. En la segunda, pequeñas cantidades de citoplasma son

internalizadas a través de una invaginación del lisosoma. También existe una autofagia mediada por chaperonas, en la cual proteínas que han sido desplegadas por chaperonas se translocan dentro del lisosoma a través de interacciones con LAMP-2 (proteína asociada a la membrana de los lisosomas).

1.8.1. METABOLISMO DE PMP22.

Las células metabólicamente activas y post-mitóticas, como neuronas y CS son particularmente sensibles a la acumulación de proteínas dañadas (Rangaraju *et al.*, 2008). En particular, PMP22 en estado nativo es propensa a agregarse (Snipes *et al.*, 1992; Tobler *et al.*, 2002), de hecho el 80% de la proteína neo-sintetizada es degradada rápidamente por el proteosoma, presumiblemente debido a su mal plegamiento (Pareek *et al.*, 1997; Noteerpek *et al.*, 1999). En modelos de CMT1A, la fracción de PMP22 destinada a la degradación proteosomal esta aumentada lo cual podría saturar al proteosoma y conducir a la acumulación a lo largo de la vía de secreción (Fortun *et al.*, 2003 y 2005). Si se inhibe la función proteosómica, la PMP22 destinada a degradación forma agregosomas perinucleares/centrosómico-proximales que se cree que son englutidos normalmente por autofagia y luego degradados en lisosomas (Fortun *et al.*, 2003; Fortun *et al.*, 2007). La localización citosólica de PMP22 altera la homeostasis de la proteína en la CS y lleva a la acumulación de Ub, proteínas mielínicas, HSPs y componentes del proteosoma cerca y dentro de los agregados (Ryan *et al.*, 2002; Fortun *et al.*, 2003, 2006). En los nervios normales de ratón, los perfiles de autofagia son raros, pero son numerosas en los nervios de los ratones *TrJ* (Ryan *et al.* 2002; Fortun *et al.*, 2003, 2005). El modelo siguiente ayuda a comprender el mecanismo (Fig.1.8.1)

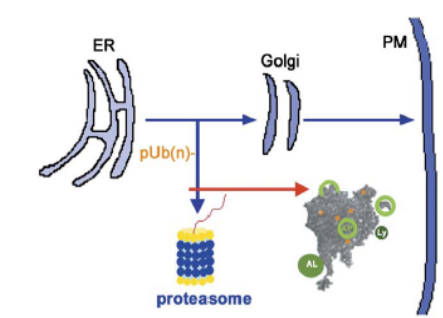


Figura 1.8.1. Modelo de agregación de PMP22. El exceso de PMP22 sobrecarga el proteosoma, lo cual conduce a una reducción en la tasa de recambio de la proteína y su acumulación en agregados. Estos últimos se han observado asociados con los lisosomas y vacuolas de autofagia, lo que sugiere su activación como un mecanismo de compensación para hacer frente a con la presencia de agregados de proteínas y mantener la homeostasis celular. Fortun *et al.*, 2006.

Cuando la función del proteosoma se ve comprometida, la homeostasis celular se mantiene a través del re-direccionamiento de los substratos del proteosoma hacia un camino alternativo, la autofagia mediada por la degradación lisosomal.

1.9. RESTRICCIONES EN LA DIETA.

Las variaciones del régimen dietario básico constituyen una de las formas más efectivas de extender el promedio de vida en mamíferos, obviamente sin alterarlos genéticamente. Las restricciones en el consumo de alimentos a niveles menores de los consumidos voluntariamente resultan en una disminución del índice de envejecimiento y aumento del promedio y máximo del lapso de vida. Reduce además, la formación de cáncer, enfermedades renales, prolonga la función reproductiva y aumenta la resistencia de neuronas a la disfunción y degeneración en modelos experimentales de Alzheimer y Parkinson (Anson *et al.*, 2003). Muchos otros efectos han sido documentados, incluyendo mejoras en la tolerancia a la glucosa y la acción de la insulina, lo que indica un incremento en la sensibilidad a la glucosa; reduce la presión arterial y el ritmo cardiaco, lo cual es consistente con la salud cardiovascular; y reduce el daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN, lo que implica efectos protectivos contra el stress oxidativo (Varaday y Hellerstein, 2007).

La inducción de la autofagia en nervios neuropáticos puede representar una vía para la eliminación de agregados proteicos. De hecho, el aumento de la respuesta de autofagia previene la formación y favorece la eliminación de agregados de PMP22 en CS en cultivo (Fortun *et al.*, 2006). En este marco, la restricción en la dieta provee una aproximación no farmacológica que apunta a mejorar la habilidad de las CS para potenciar el mecanismo protector endógeno que le permitiría resistir al trastorno neurodegenerativo y a las alteraciones asociadas con la edad (Martin *et al.*, 2007; Sharma y Kaur, 2007). La producción de chaperonas y la degradación de proteínas a través del sistema autofágico-lisosomal se ha obtenido en variedad de organismos y tejidos por una restricción en la dieta (Mizushima *et al.*, 2005; Wolhlgemuth *et al.*, 2007; Steinkraus *et al.*, 2008) y el SNP responde a esta intervención (Madorsky *et al.*, 2009).

La restricción calórica y el ayuno alternado representan 2 formas diferentes de restricciones en la dieta (Varady y Hellerstein, 2007). En regímenes dietarios donde el

consumo calórico es reducido se alivian y atenúan el daño neuronal y se mejora la respuesta funcional de modelos animales de desórdenes neurodegenerativos. Los mecanismos subyacentes propuestos incluyen una incrementada resistencia a injurias oxidativas, metabólicas y excitotóxicas, la regulación de factores neurotróficos y la regulación de HSPs (Martin *et al.*, 2007). Los beneficios funcionales de la intervención en la dieta están asociados con un incremento en la expresión de proteínas mielínicas en combinación con una vaina de mielina más delgada, menor redundancia de lámina basal y una disminución en la proliferación aberrante de las CS.

2. HIPÓTESIS DE TRABAJO.

La hipótesis de nuestro trabajo plantea que la aplicación de tratamientos sistémicos de restricción en la dieta promoverá una recuperación neuromotora apreciable en ratones *TrJ*. Esta hipótesis se sostiene sobre la base de que estas dietas potencian las vías de degradación hecho que se manifiesta en mejoras morfológicas y funcionales en los nervios periféricos de estos ratones.

2.1. OBJETIVOS GENERALES:

El trabajo planteado por este proyecto apunta a intervenir el régimen dietario de nuestros ratones *TrJ* con el fin de aproximarnos a una dieta que tienda a aliviar su sintomatología, mejorando los déficit neuromotores, comportamentales y morfológicos.

2.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Para cumplir con los objetivos generales se realizaron los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Caracterización del modelo biológico *TrJ* e implementación de distintos regímenes dietarios.
- 2.-Análisis temporales de desempeños locomotores de ratones controles y tratados.
- 3.-Caracterización de la expresión de PMP22 y F-actina, en los diferentes tratamientos.

3. MATERIALES Y METODOS.

Previo a comenzar con el establecimiento de los grupos de experimentación se debieron optimizar las condiciones de cuidado y mantenimiento animal (Anexo I). Todos los animales se encontraban bajo temperatura controlada y un ciclo de luz-oscuridad de 12 hs alojados en cajas de 30 por 30 cm.

3.1. ESTABLECIMIENTO DE GRUPOS DE EXPERIMENTACIÓN.

A medida que estuvieron disponibles, se fueron asignando los distintos individuos a diferentes grupos de trabajo (Anexo II), el número de animales utilizados para los diseños experimentales y para la aplicación de los test estadísticos fue de N=10 (para cada tratamiento, con N=5 por condición genotípica), con la excepción del tratamiento de restricción calórica en el cual se utilizaron un total de N=8. Se seleccionaron ratones machos y de edad adulta (a partir de la novena semana de vida) para no afectar el periodo de crecimiento de los roedores. Los grupos consistían en un grupo control, el cual presentó un régimen de alimentación *ad libitum* (AL) y permitió determinar consumo y peso semanal, un grupo bajo alimentación intermitente (AI) (un día de alimentación, un día de ayuno) y un grupo bajo restricción calórica (RC), con disminución del contenido calórico.

3.1.1. GRUPO CONTROL AL.

En este grupo, los individuos fueron alimentados AL con una ración cuyo contenido calórico es de 3705 Kcal/Kg y cuyos valores nutricionales (Tabla 3.1.1A) son similares a los utilizados para el mantenimiento de la colonia original en el Laboratorio Jakson, USA.

Tabla 3.1.1A.

Valores Nutricionales (Contenido Calórico total 3705 Kcal/Kg)	
Carbohidratos	52.3%
Proteínas	25.3%
Grasas	15.5%
Fibra Cruda	2.1%
Calcio 0.79% , Potasio 0.71% , Fosforo 0.70% , Sodio 0.24% , Magnesio 0.132%	

Valores nutricionales expresados en porcentajes de la ración alimenticia consumida por la colonia.

En el grupo AL se realizaron medidas individuales de consumo alimenticio desde la semana 9 a la 33 lo cual constituyó 5 meses de tratamiento. El procedimiento consistió en la determinación del peso del alimento previo y posterior al consumo. Se realizaron 4 medidas semanales. Se utilizó un control de variación en el peso del alimento por condiciones externas (Temperatura, Humedad, etc.) que era depositado en el mismo ambiente y no estaba expuesto a consumo. Para la determinación del consumo se asumió un valor de consumo equivalente en los días en que no se hacían medidas consecutivas y se dividía entre la cantidad de días transcurridos entre mediciones. En los casos en que las medidas eran consecutivas, no era necesario realizar esta división. Finalmente, cuando se obtenía el valor diario se le restaba un valor diario control que correspondía al control ambiental (para un mejor entendimiento véase Tabla 3.1.1B).

Tabla 3.1.1B.

		M N° 100			Control			
Días de medición	Días entre medidas	Valores medidos(g)	Diferencia entre medidas(g)	Consumo diario estimado (CDE)(g/día)	CDE sin control(g/día)	Valores medidos(g)	Diferencia entre medidas(g)	Valor diario estimado(g)
05/07/2010		80.36				98,92		
07/07/2010	2	74.72	5.64	2.82	3.025	99,36	-0.41	-0.205
09/07/2010	2	68.73	5.99	2.995	2.735	98,81	0.52	0.26

Obtención del valor de consumo semanal. Se ejemplifica los datos obtenidos de la medición del consumo de un individuo en dos medidas de una semana en particular.

Una ventaja importante que contribuyó a una mejor medición, lo constituyó el material utilizado como cama para los ratones (pasta de celulosa de color blanco, donadas por UPM). Una vez obtenidos los datos correspondientes a un individuo determinado, se promediaban con los datos de todos los individuos de igual condición (igual semana de vida e igual genotipo), para alcanzar un valor medio semanal de consumo. Los análisis estadísticos de los datos que permitieron analizar diferencias entre los consumos para las condiciones salvajes y *TrJ* se realizaron utilizando el Test t de Student para muestras independientes, semana por semana, considerándose como significativas diferencias de $p \leq 0,05$. Los datos fueron expresados como promedio de consumo semanal \pm SEM (error estándar de la media). En la medida en que transcurrían las semanas se realizaron medidas del peso corporal, con los cuales posteriormente se realizaron medias de peso semanales y gráficos de ganancia de peso corporal. Los datos fueron expresados como promedio de peso corporal \pm SEM. También se graficó la relación consumo- peso. La comparación entre medias fue realizada utilizando el test t de Student para muestras independientes, semana por semana, considerándose como significativas diferencias de $p \leq 0,05$.

3.1.2. GRUPO BAJO AI.

Se siguieron los protocolos de Anson *et al.*, 2003, para implementar los distintos regímenes. Los ratones bajo AI fueron alimentados *AL* hasta la novena semana cuando se comenzó el tratamiento de restricción donde tenían acceso al alimento a días alternos. El día de alimentación, los animales tenían acceso al alimento durante todo el día. Se suministraba y retiraba el alimento en la tarde diariamente y se midió el consumo en los días de alimentación. El agua estaba disponible constantemente. Con los datos extraídos se realizaron gráficos de ganancia de peso. Con el consumo se realizaron gráficos de consumo medio por semanas, así como comparaciones con los consumos medios controles. También se graficó la relación consumo-peso. La comparación entre medias fue realizada utilizando el test t de Student para muestras independientes, semana por semana, considerándose como significativas diferencias de $p \leq 0,05$.

3.1.3. GRUPO BAJO RC.

En el caso de aquellos ratones que fueron sometidos a RC en su dieta, se les brindó una cantidad diaria de alimento que era calculada en base al peso corporal de cada individuo y al consumo medio semanal estimado en los individuos controles. El valor en gramos del consumo de estos animales se correspondía con un porcentaje del alimento consumido por los ratones AL (Martin *et al.*, 2007). La dieta se inició al igual que el tratamiento de AI en la novena semana de edad y el contenido calórico se fue disminuyendo paulatinamente. Se realizaban reducciones cada dos semanas del 5 % del consumo diario de los animales y este porcentaje se aumentaba en función del estado corporal del animal y el tiempo de dieta. Las reducciones máximas logradas fueron del 20%. Se procuró que los ratones no disminuyeran su peso drásticamente, pesándolos semanalmente y observando que no presentara conductas anormales. Se utilizó como criterio para el cuidado de los animales y con el fin de evitar la desnutrición de los mismos, un protocolo de supervisión basado en el cálculo del porcentaje de peso perdido de una semana a otra. En base a este cálculo, no se aceptaron reducciones del peso corporal mayores al 5%. Es decir, si el ratón no disminuía más del 5% de su peso corporal, se continuaba con el mismo porcentaje de reducción o incluso se aumentaba. Cuando la reducción del peso corporal era superior al valor antes mencionado, entonces el ratón volvía a una etapa anterior con mayor contenido calórico. Estos ratones fueron pesados semanalmente. Una vez realizado el cálculo de consumo (con la reducción incluida), se pesaba el alimento, el cual era almacenado en bolsitas individuales y aislado del medio ambiente adentro de un recipiente hermético de plástico. El agua estaba disponible constantemente y el alimento era entregado diariamente a la misma hora. Con los datos obtenidos se realizaron gráficos con curvas de crecimiento, consumo diario y relación consumo- peso. La comparación entre medias fue realizada utilizando el test t de Student para muestras independientes, semana por semana, considerándose como significativas diferencias de $p \leq 0,05$.

3.2. EVALUACIÓN DE LOS DESEMPEÑOS LOCOMOTORES.

Con el fin de monitorear las capacidades locomotoras de los ratones durante el transcurso de los experimentos y observar los posibles cambios, se realizaron distintos estudios comportamentales que incluyeron dos pruebas con características distintas y en las cuales se midieron parámetros diferentes.

3.2.1. TEST DE LA BARRA GIRATORIA (ROTAROD® TEST).

Este test permitió la comparación y evaluación de la coordinación motora y balance en los diferentes grupos y dentro de ellos. La latencia entre los tiempos de inicio y caída de la barra giratoria con velocidad variable (Fig.3.2.1), se relaciona con la coordinación motora de roedores, el balance y la habilidad de aprendizaje motor (Crawley, 1999). La versatilidad de esta herramienta ha permitido su utilización para investigar diferencias entre cepas, ratones con genes knock-out y transgénicos, efectos de drogas, recuperación de daños cerebrales y modelos animales de enfermedades humanas (Bohlen *et al.*, 2009). En este caso particular, estudios previos revelan que modelos murinos de CMT1A presentan una discapacidad severa para realizar la performance motora compleja y la tarea de balance exigida por el Rotarod (Sereda *et al.*, 1996; Passage *et al.*, 2004).

Para el desarrollo de la tesis se construyó en el IIBCE una barra giratoria en base al modelo comercial (Rotarod®). Las características de nuestro dispositivo permiten la realización de la prueba en grupos de a dos y no se pueden medir velocidades rotacionales mayores a 26 rpm. El diseño de este último estuvo a cargo del Sr. Luis Inchausti.

Los ratones fueron testeados una vez terminado el tratamiento de acuerdo con los procedimientos establecidos (Crawley, 1999). Previo a la realización del test, se realizaba un entrenamiento 2 días consecutivos con 3 pruebas por día de 60 segundos a una velocidad fija de 5 rpm, con intervalos de 30 minutos entre cada prueba. En el tercer día se realizó el test, en el cual la velocidad rotacional se aumentaba linealmente de 4-26 rpm, en 300s, con una hora entre cada réplica del experimento. Se hacían tres réplicas por individuo. Antes de comenzar los ratones eran situados en la sala de experimentación y se los aclimataba con el sonido del Rotarod® durante 15 minutos. El tiempo que cada ratón se mantenía sobre el dispositivo antes de caer (latencia) fue

anotado, así como la velocidad a la cual el ratón caía. Este procedimiento fue registrado por medio de una filmación. Los ratones bajo AI eran alimentados la noche anterior al experimento (no estaban en su día de ayuno). Una vez obtenidos los resultados se realizaron gráficos de latencia promedio sobre el Rotarod, los que permitieron hacer comparaciones de individuos controles *Wt* y *TrJ*, así como las modificaciones en estos comportamientos controladas generadas por las distintas dietas. Las comparaciones estadísticas se realizaron utilizando ANOVA de dos vías, considerándose como significativas diferencias de $p \leq 0,05$.



Figura 3.2.1. Barra giratoria a velocidades crecientes (Rotarod). El dispositivo consta de dos carriles donde son situados los ratones sobre la barra. La velocidad se aumenta manualmente. Cuando estos caen se para el cronometro indicando el tiempo de permanencia sobre la barra.

3.2.2. CAMPO ABIERTO (OPEN FIELD).

Luego de transcurridos los 5 meses de dieta se evaluaron funciones motoras, a través del análisis de la locomoción exploratoria normal en campo abierto (Fig.3.2.2). Se sitúa al ratón en la caja por 5 minutos y se calcula la distancia total recorrida, el número de movimientos, la actividad horizontal y vertical. Los ratones previa realización del test eran llevados a la sala de experimentación y luego de un periodo de aclimatación de 15 minutos se comenzaba el ensayo. Se registraba la actividad del ratón a través de una cámara que se encontraba sobre el campo. Se realizó también registro de actividad vertical. Este test fue realizado en el laboratorio de Biología Celular sección Neurofarmacología del IIBCE con la ayuda del Lic. JP Prieto.

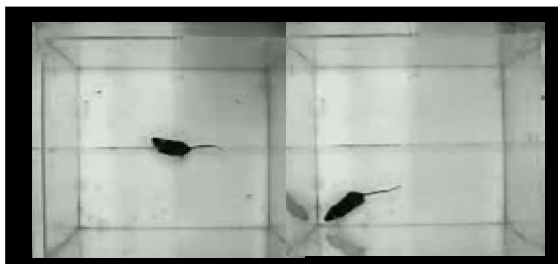


Figura 3.2.2. Descripción del Test de Campo Abierto. El ratón se situaba en el centro del campo y entonces eran registradas las actividades locomotoras del mismo. La cámara que registraba dicha información se ubicaba sobre el campo.

Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante Test t de Student para los parámetros de actividad horizontal y U-Mann-Whitney para los parámetro de actividad vertical con un nivel de significancia estadística de $p \leq 0.05$. Todos los procedimientos han sido aprobados por la Comisión de Bioética del IIBCE.

3.3. ESTUDIOS MORFOLÓGICOS.

Una vez finalizados los diferentes tratamientos, los ratones fueron sacrificados por medio de dislocación cervical y se procedió a la excéresis de ambos nervios ciáticos. Para ello se ubicó al ratón en posición decúbito ventral y se le practicó una sección cutánea en forma de "losange" a nivel de la parte inferior de la región glútea y femoral posterior. Se realizó posteriormente una incisión longitudinal paralela al eje del fémur, en la aponeurosis que separa los músculos abductor mayor y el biceps crural. La incisión se realiza con la punta de la tijera cerrada y se abre lentamente, provocando un corte romo, sin lesión muscular alguna. Se abre una cavidad entre ambas masas musculares, en el fondo de la que se encuentran el nervio ciático y más anteriormente, el nervio femoral y la arteria femoral, corriendo paralelos al fémur. El nervio ciático se observa como una cinta de aproximadamente 1mm de grosor de color blanco brillante. Una vez identificado se secciona primero el extremo más distal y luego el más proximal a la columna vertebral procurando incluir la mayor cantidad del nervio. El procedimiento no debe tomar más de 1 minuto en total, evitando los efectos indeseados de la anoxia post-mortem.

3.3.1. FIJACIÓN, CRIOPROTECCIÓN, INFILTRACIÓN E INCLUSIÓN.

Una vez extraídos los nervios ciáticos son fijados por inmersión en paraformaldehido (PFA) al 3% en buffer PHEM (2mM HEPES, 60mM Pipes, 10mM EGTA, 2mM $MgCl_2$, pH 7,2-7,6, ajustado con KOH), toda la noche a 4 ° C. Es importante conservar el estado en que se encontraban los tejidos *in vivo* minimizando los procesos de degradación post mortem por falta de oxígeno. Luego las muestras fueron lavadas 6 veces durante 5 minutos en PHEM con agitación suave para retirar el exceso de fijador. Una vez lavadas, las muestras de las que se obtuvieron criosecciones fueron sumergidas en soluciones buffereadas de sacarosa 30 % p/v hasta que igualaban la densidad del medio, bajando al fondo del tubo. Todo esto se realizó a 4°C y su objetivo fue desplazar el agua de la muestra haciendo entrar la sacarosa, lo que permitió que en el proceso de

congelamiento, las moléculas de agua fueran mínimas evitando el crecimiento de cristales que hubieran roto la estructura celular y tisular. Posteriormente la sacarosa del medio extracelular fue desplazada mediante infiltración con concentraciones crecientes del medio de inclusión (en nuestro caso Tissue Tek®) y decrecientes de sacarosa al 30% en PHEM, hasta medio de inclusión puro. El proceso se realizó con agitación y duró aproximadamente 2 horas. Finalmente se armaron los bloques e hicieron los cortes en congelación en el Crióstato (SLEE MEDICAL®). Los nervios fueron incluidos en bloques con medio de inclusión nuevo, con una orientación longitudinal de las fibras nerviosas. Se realizaron cortes de 12µm de espesor, los cuales fueron recolectados en vidrios tratados previamente con poli-L-lisina y mantenidos a -20°C hasta el momento de su utilización para inmunohistoquímica.

Los portaobjetos se prepararon el día antes de la realización de los cortes por inmersión en una solución de poli-L-lisina (al 10%, Sigma) durante 5 minutos y se los dejó secando toda la noche, protegidos del polvo. Este tratamiento contribuye a la adhesión del tejido al vidrio.

3.3.2. INMUNOHISTOQUÍMICA.

Las inmunohistoquímicas fueron realizadas en las muestras antes mencionadas. Se empleó una inmunohistoquímica indirecta con un sistema de dos anticuerpos (anticuerpo específico sin marcar y anti-anticuerpo conjugado a fluoróforo). Se trabajó siempre en cámara húmeda para evitar el resecado de las muestras.

3.3.2.1. PERMEABILIZACIÓN.

Inicialmente se permeabilizó el tejido con Triton-X100 (Sigma) al 0,1% en solución tamponada PHEM durante 10 minutos. Seguido se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PHEM.

3.3.2.2. BLOQUEO DE GRUPOS ALDEHÍDO Y CETONAS LIBRES.

Para reducir las señales inespecíficas se bloquearon los grupos aldehídos y cetonas libres pertenecientes a la propia estructura celular o generados durante el proceso de fijación. El bloqueo se hizo por incubación con borohidruro de sodio al 0,1% en agua

durante 20 minutos a temperatura ambiente (TA). Los restos de borohidruro fueron eliminados mediante 3 lavados sucesivos de 5 minutos con buffer PHEM a TA.

3.3.2.3. BLOQUEO DE SITIOS DE UNIÓN INESPECÍFICA.

Las células y tejidos pueden presentar epitopes reconocibles por anticuerpos con uniones de baja afinidad. En la inmunotinción indirecta, las reacciones inespecíficas, de baja afinidad, antígeno-anticuerpo deben ser bloqueadas antes de comenzar el inmunoreconocimiento específico. En nuestro caso fueron bloqueadas con 5% v/v de suero normal de cabra (NGS, por su sigla en inglés), especie en la que se produjo el anti-anticuerpo, disuelta en buffer de incubación (BI, Glicina 150mM, seroalbúmina bovina BSA 1% en PHEM). A este buffer se le llamo Buffer de Bloqueo y el bloqueo se hizo por 30 minutos a 37 ° C. Después de esto, el tejido fue incubado inmediatamente con el anticuerpo específico (sin lavado previo).

3.3.2.4. INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS ESPECÍFICOS.

Se realizó la incubación con anticuerpos contra PMP22 1/50 (Chemicon, Temecula, CA, USA) toda la noche (ON) a 4°C. Las diluciones de todos fueron realizadas en BI.

3.3.2.5. INCUBACIÓN CON ANTI-ANTICUERPOS.

Antes de comenzar la incubación se realizaron 3 lavados de 5 minutos con BI a TA. El anti-anticuerpo utilizado fue suero de cabra anti conejo (GAR, por su sigla en inglés) conjugado a Alexa 488 (A11029, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), a una dilución 1/1000. También se incubó con DAPI 1/1000 y Falloidina 1/150 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), para reconocer las regiones nucleares y ricas en actina, respectivamente. Las diluciones fueron realizadas en BI y la incubación se realizó durante 45 minutos a 37° C. Luego se realizaron 6 lavados de 5 minutos cada uno, los 3 primeros con BI y los 3 últimos con buffer PHEM a TA. Todos estos procedimientos fueron realizados en oscuridad.

3.3.2.6. MONTAJE.

Para finalizar se realizó el montaje con medio de montaje Prolong Antifade (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) que disminuye al auto apagado y prolonga la duración de la fluorescencia.

3.3.2.7. MICROSCOPÍA CONFOCAL.

Las muestras se visualizaron en el microscopio confocal (Olympus DP70, Tokio, Japon) del IIBCE, utilizando las siguientes longitudes de onda de excitación/emisión: 405/430nm, 488/517nm, 546/570nm, a través de la utilización del programa Fluoview (FV300 Confocal Laser Scanning® versión 4.3). Las sesiones se iniciaban con la observación de los controles de la inmunohistoquímica, lo que permitía fijar los valores de HV de los fotomultiplicadores en las condiciones de saturación mínimas. Estos valores nunca fueron sobrepasados al observar las pruebas con anticuerpos específicos.

El procesamiento de las imágenes se realizó en Adobe Photoshop® CS5 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA) sin alterar las condiciones iniciales de captura de la imagen.

4. RESULTADOS.

4.1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO BIOLÓGICO *TrJ* E IMPLEMENTACIÓN DE REGÍMENES DE RESTRICCIÓN.

4.1.1. CONSUMO Y PESOS POR SEMANA DE INDIVIDUOS ALIMENTADOS AL.

Las medias de consumo diario obtenidas de individuos de genotipo salvaje (Wt) y patológico (*TrJ*) se detallan en la figura 4.1.1A.

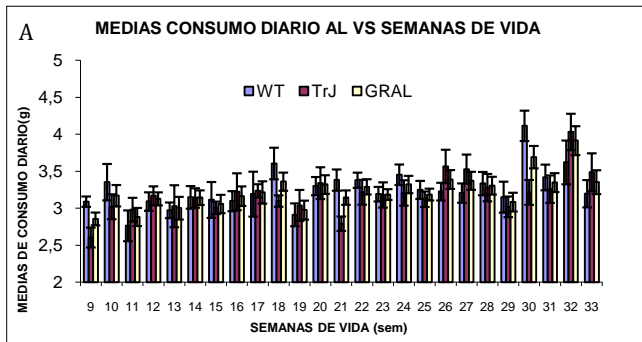


Figura 4.1.1A. Representación gráfica de Medias de Consumo AL vs semanas de vida para ambos genotipos, así como la media de consumo general obtenida de considerar ambos datos como pertenecientes a una población homogénea.

No se observan cambios drásticos en la cantidad de alimento consumido con el transcurso del tiempo entre los individuos de diferentes genotipos. Se podría considerar un consumo diario promedio de la edad adulta global que oscilaría en 3.23 ± 0.12 g/día. En la última etapa se observa un pequeño incremento en el consumo. A través de la utilización del Test t de Student para comparación de muestras, se pudo comprobar que las muestras provenientes de datos de consumo diario de individuos Wt y *TrJ* durante los 5 meses de experimentación son muestras homogéneas (en la mayor parte del tiempo), en las cuales no se han apreciado diferencias significativas en el consumo con excepción de las semanas 9, 18, 21 y 30 (Anexo III). En la mayoría de los casos fue posible hacer una media de consumo que incluyó ambos conjuntos de datos, los cuales fueron utilizados en cálculos posteriores.

Con respecto al peso corporal de los individuos pertenecientes al grupo *AL* durante las semanas que duró el ensayo, se observan dos curvas de crecimiento con características distintas (Figura 4.1.1 B y C).

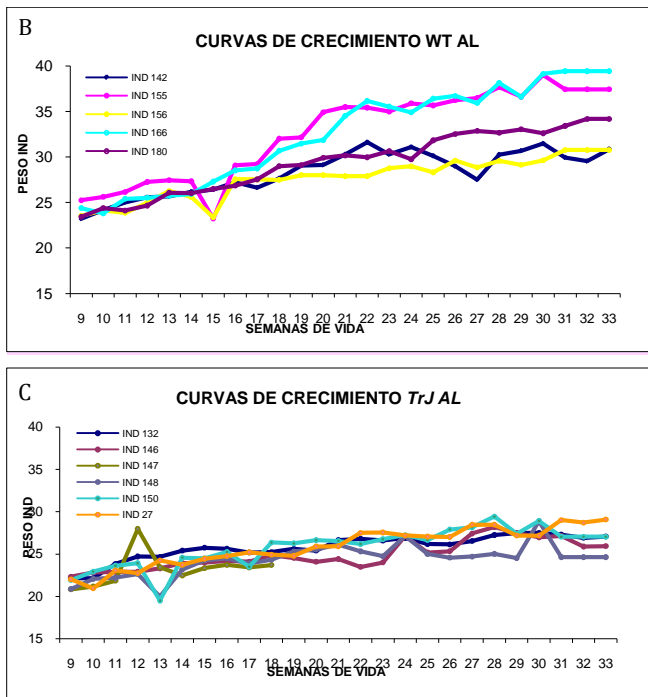


Figura 4.1.1 B y C. Representación gráfica de Curvas de crecimiento de individuos Wt en el gráfico de la derecha (A) y *TrJ* en el gráfico de la izquierda (B). En el eje de las ordenadas se expresa el peso en (g) y en las abscisas semanas de vida (sem). Cada color se corresponde con la curva de crecimiento de un individuo específico.

Las curvas de crecimiento de los ratones alimentados *AL* tienen un incremento más pronunciado en los individuos Wt que el observado en los ratones *TrJ*, los cuales no son capaces de llegar a valores de pesos corporales mayores a 30 g. Este peso es alcanzado por los Wt a partir de la semana 20, y alcanzan valores finales de aproximadamente 35 g, presentando una tendencia al aumento y ganancia de peso más marcado que el observado en los individuos *TrJ*. La figura 4.1.1D permite apreciar mejor las diferencias.

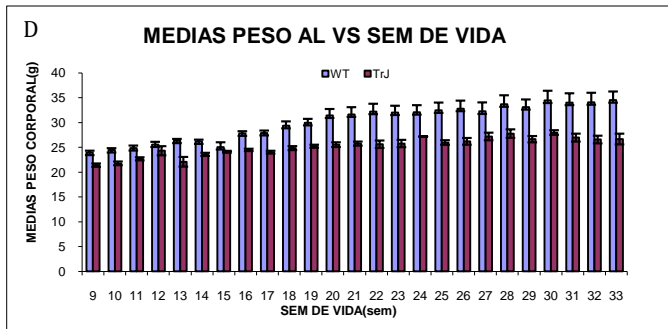


Figura 4.1.1.D.
Representación gráfica de las Medias de Peso corporal vs semanas para individuos de ambos genotipos *Wt* y *TrJ* con

En este caso se han observado diferencias significativas por medio del Test t de Student entre los pesos semanales de ambos subgrupos (Anexo IV). Se observa que los individuos *TrJ*, en todo el lapso de tiempo considerado, siempre han presentado un menor peso corporal, de hecho comienzan el tratamiento con menor peso promedio y en ninguna semana superan el peso de los individuos *Wt*. Las diferencias entre ambos subgrupos parecen aumentar con el transcurso de las semanas, hay menor ganancia de peso en los animales portadores de la mutación con respecto a los animales de genotipo salvaje. La relación entre el consumo y el peso para cada genotipo presenta líneas de tendencia divergentes, presentando una relación temporal decreciente (Fig. 4.1.1.E).

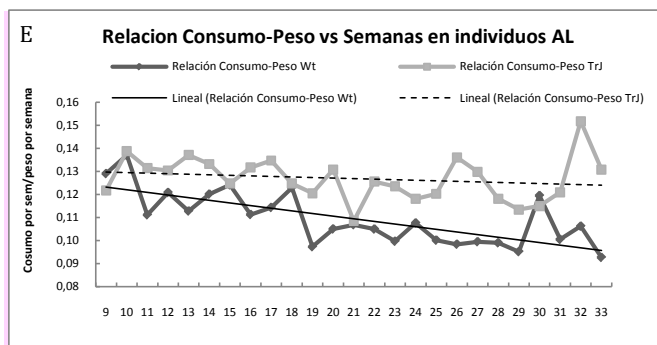


Figura 4.1.1.E.
Representación gráfica de Relación de Consumo-Peso vs semanas de vida para individuos de ambos genotipos *Wt* y *TrJ AL*.

4.1.2. VARIACIONES TEMPORALES DE CONSUMO Y PESO EN INDIVIDUOS BAJO AI.

En el caso de los ratones en AI se registró en los días de alimentación un consumo mayor a las medias diarias de alimentación observadas en los ratones AL (Figura 4.1.2A y B).

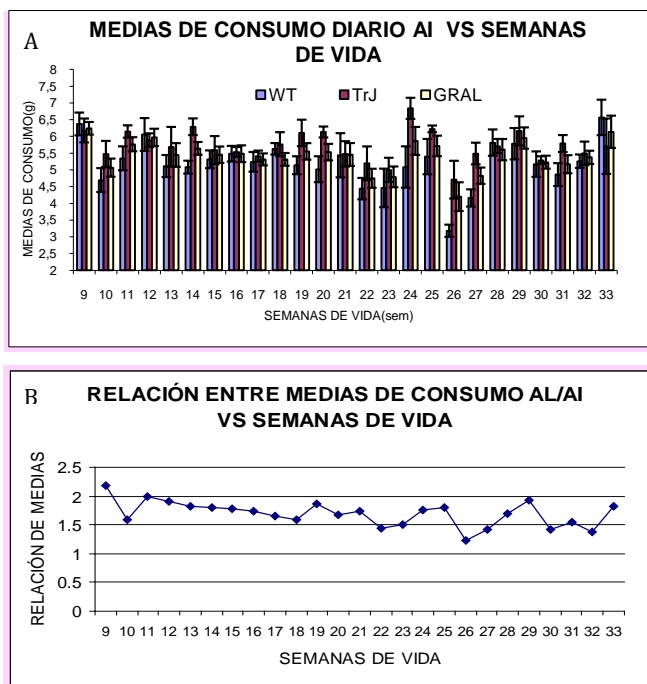


Figura 4.1.2A y B. Representación gráfica de Medias de Consumo diario vs semanas para ambos genotipos sometidos a AI. También se muestra la media de consumo general obtenida de considerar ambos datos como pertenecientes a una población homogénea(A). La relación entre el consumo diario AL y el consumo AI se observa en la representación gráfica (B). Esta relación fue establecida tomando en cuenta las medias generales de consumo para ambos tratamientos.

Las diferencias entre ambos genotipos en relación al consumo no son evidentes y el consumo se ve afectado por el tratamiento. En la mayoría de los casos, con excepción de las semanas 14, 19, 20 y 24, las diferencias en el consumo entre los dos genotipos no son significativas (Anexo V). Se observa un aumento del consumo en los individuos bajo AI en los días de alimentación que queda manifestado en el grafico 4.2.1B donde se ve claramente que los ratones sometidos a AI se alimentan aproximadamente entre 1.5 y 2 veces más los días de alimentación que los individuos AL.

En relación al peso corporal de estos individuos (Fig. 4.2.1C), no se aprecian grandes diferencias entre ambos genotipos.

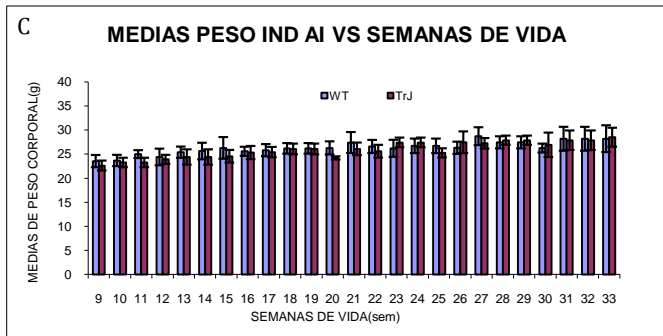


Figura 4.1.2C. Representación gráfica de **Medias de Peso corporal vs semanas** para individuos de ambos genotipos Wt y TrJ sometidos a un régimen de AI.

Se observa un efecto del tratamiento en el peso de los individuos. Al final del tratamiento, los individuos bajo AI no han alcanzado un peso corporal cercano a los pesos máximos alcanzados por los individuos controles. No se observaron diferencias significativas entre genotipos (Anexo VI) durante las semanas de tratamiento.

La relación entre el consumo y el peso para cada genotipo presenta líneas de tendencia convergentes, presentando una relación temporal decreciente (Fig.4.2.1D).

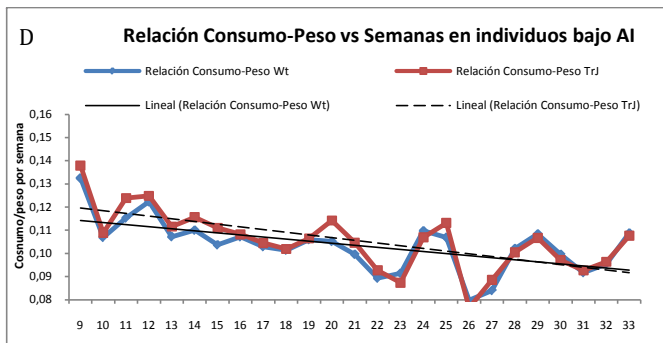


Figura 4.1.2D. Representación gráfica de **Relación de Consumo-Peso vs semanas de vida** para individuos de ambos genotipos con AI. Para la realización del gráfico la media de consumo semanal se dividió entre dos, simulando una media de consumo

Comentario [CU1]: Deben compararse las pendientes de la regresión lineal con sus desvíos

4.1.3. VARIACIONES TEMPORALES DE CONSUMO Y PESO EN INDIVIDUOS BAJO RC.

En el grupo de ratones bajo RC, se hicieron reducciones del 5% cada 2 semanas, sin embargo no siempre fue posible realizarlas debido al estado de los animales y al porcentaje de disminución de peso corporal. Durante la primera semana de tratamiento no se realizó restricción. Las disminuciones iniciales (5 y 10%) no presentaron grandes consecuencias en el peso y se realizaron durante un mes. Reducciones del 15 % provocaban disminuciones del peso corporal importantes y este fue el paso más sentido por los individuos. Se alcanzaron reducciones del 15% en el segundo mes, sin embargo

fueron frecuentes en esta etapa modificaciones en el avance de la reducción (en algunos casos se volvió a etapas anteriores del tratamiento) y la adaptación a éste consumo se consiguió un mes después. El porcentaje de disminución máximo que se pudo alcanzar fue del 20% recién en las últimas etapas del tratamiento, encontrándose una gran variabilidad de resistencia a las reducciones entre los distintos individuos. En la gran mayoría de los casos, la cantidad de alimento brindada a los ratones como resultado de los cálculos en función de su peso y consumo control por semana presentaban diferencias significativas (Anexo VII). En relación al peso corporal se observó una disminución del mismo al compararla con el peso AL (Figura 4.1.3A y B).

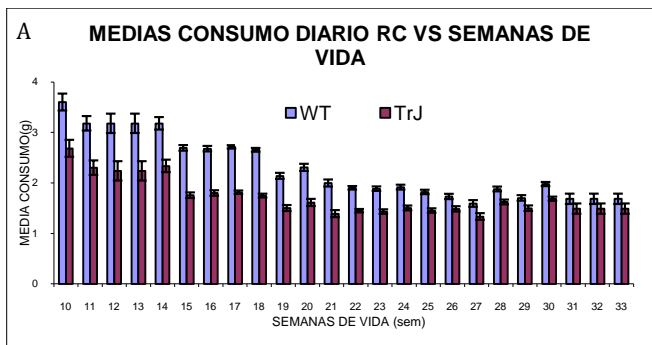
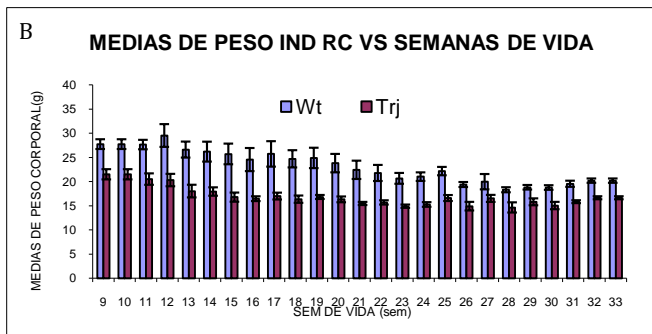


Figura 4.1.3A y B. Representación gráfica de **Medias de Consumo vs semanas de vida (A)** y **Medias de Peso corporal vs semanas de vida (B)** para individuos de ambos genotipos Wt y *TrJ* sometidos a un régimen de RC.



Las variaciones en el peso vuelven a presentar diferencias significativas para los diferentes individuos (con excepción de lo ocurrido en la semana 28, ver Anexo VIII). La disminución de peso en los individuos desde el comienzo al final del tratamiento fue de un 27.2% para los animales Wt y de un 22.6% para los *TrJ*. Estos últimos parecen verse menos afectados por los efectos del tratamiento en su peso, aunque la diferencias es de tan solo un 5%. Cabe destacar que, azarosamente, los ratones Wt comenzaron

con un peso mayor al presentado por los *AL*, hecho que no ocurrió con los *TrJ*. Con respecto a los pesos en las etapas finales las diferencias entre los *AL* y los individuos bajo RC son mayores y hay disminuciones del 58% y 62% en los pesos *Wt* y *TrJ* respectivamente.

La relación entre el consumo y el peso para cada genotipo presenta líneas de tendencia divergentes. Ambas presentan una relación temporal decreciente y alcanzan, en las últimas etapas del tratamiento, relaciones con valores menores de los alcanzados en los tratamientos previos (Fig.4.1.3C).

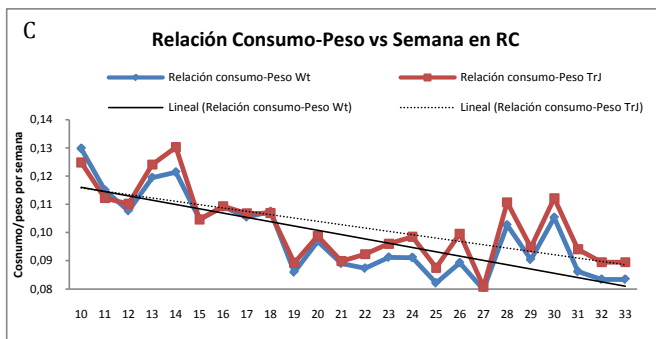


Figura 4.1.3C. Representación gráfica de **Relación de Consumo-Peso RC vs semanas** para individuos de ambos genotipos. Esta relación estuvo determinada por el porcentaje de disminución asignado en cada semana.

4.2. EVALUACIÓN DE LOS DESEMPEÑOS LOCOMOTORES.

4.2.1. TEST DE LA BARRA GIRATORIA (ROTAROD®).

La ubicación de los ratones sobre la barra giratoria muestra un posicionamiento diferencial en ambos grupos genotípicos, el que varió en los individuos sometidos a tratamientos de restricción (Fig. 4.2.1A). En el transcurso de la prueba, se observan desempeños muy distintos en los ratones *AL* con diferencias genéticas. Los de genotipo *Wt* se posicionan sin dificultades sobre la barra y utilizan su cola para balancearse y equilibrarse. Esta actividad no se manifiesta en los ratones *TrJ*, los cuales desde el comienzo no logran posicionarse correctamente y en varias ocasiones se apoyan en las paredes laterales del Rotarod®, para evitar la caída. Presentan un mayor grado de dificultad para dar los pasos que les permiten seguir sobre la barra, a diferencia de los *Wt* cuyo centro de masa se ubica sobre el grado 0° de la circunferencia de la barra, los *TrJ* presentan un posicionamiento posterior que los obliga a dar pasos más grandes y

con mayor velocidad. En los *TrJ* bajo AI se observó una mejoría del posicionamiento que fue aún mayor en los individuos de igual condición sometidos a RC. Si bien estos datos nos dan una idea del estado locomotor del animal, el estudio de los tiempos de permanencia sobre la barra nos ha permitido analizar en profundidad las consecuencias de la implementación de las dietas (Fig. 4.2.1B).

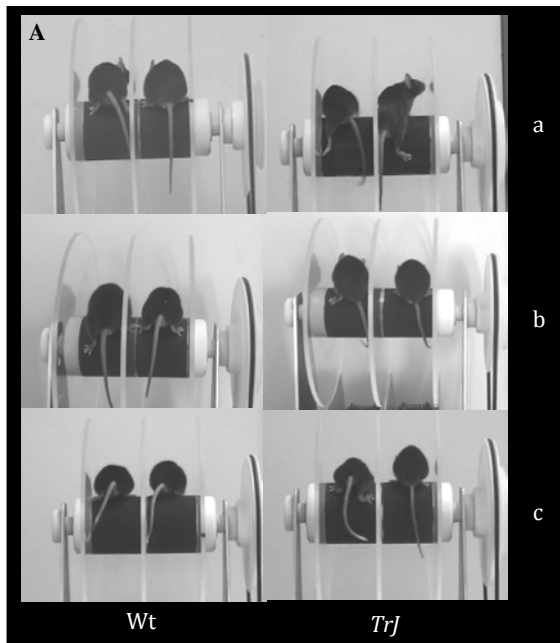


Figura 4.2.1A. Barra Giratoria con velocidad variable (Rotarod®). Los ratones fueron sometidos a esta prueba luego de 5 meses de tratamientos registrándose el tiempo de permanencia sobre la barra (latencia) y la velocidad a la cual el ratón caía de la misma. La figura muestra ratones de los 3 tratamientos: control AL (a), AI (b) y RC (c). A la derecha se muestran los individuos Wt y a la izquierda los *TrJ*.

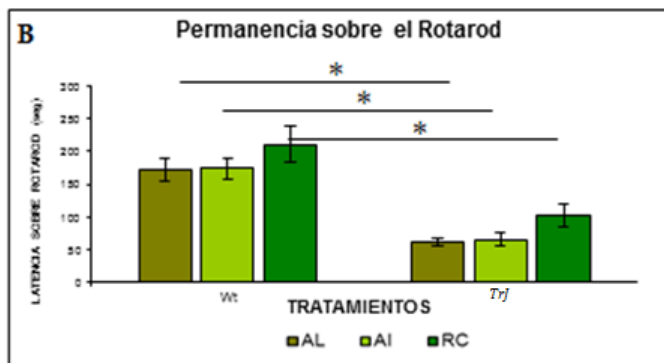


Figura 4.2.1B. Permanencia sobre la barra giratoria (Rotarod®). Representación gráfica de medias de permanencia sobre la barra. Los diferentes colores indican los diferentes tratamientos y las barras a la derecha corresponden a ratones *TrJ* e izquierda a Wt.

Se observó en todos los tratamientos una mayor permanencia de los individuos salvajes con respecto a los *TrJ* (Anexo VIII). Las diferencias en las permanencias sobre la barra

son notorias, los individuos *Wt* permanecen sobre la vara 2.7 veces más tiempo que los portadores de la mutación, en los animales *AL* y bajo *AI* y 2 veces más en los sometidos a *RC*. El tratamiento de *AI* no parece tener un efecto sobre la destreza de los ratones sobre el Rotarod. Sin embargo, sí se observa un incremento en la latencia sobre la barra de ratones *TrJ* bajo *RC* en ambos genotipos. En el caso de los roedores *TrJ* bajo *RC* no se observan diferencias significativas entre este grupo y el grupo de los individuos *Wt AL* (Anexo IX).

Cada vez que se alimentaban a los ratones tratados, en ambas dietas de restricción, una observación común era la mayor actividad que presentaban los individuos en comparación con los *AL*. Se encontraban frecuentemente ratones de ambos genotipos sosteniéndose de la reja sobre sus miembros anteriores e incluso posteriores y desplazándose por ella. Esta actividad fue escasamente observada en los individuos *TrJ* alimentados *AL*. Si bien esta actividad nos llamó la atención no fue cuantificada en el presente trabajo.

4.2.2. CAMPO ABIERTO (OPEN FIELD).

Los ratones fueron sometidos al Test de Campo Abierto donde se evaluaron varios parámetros locomotores de exploración. En particular nos focalizamos en analizar la velocidad, distancia total recorrida (Figura 4.2.2 A y B).

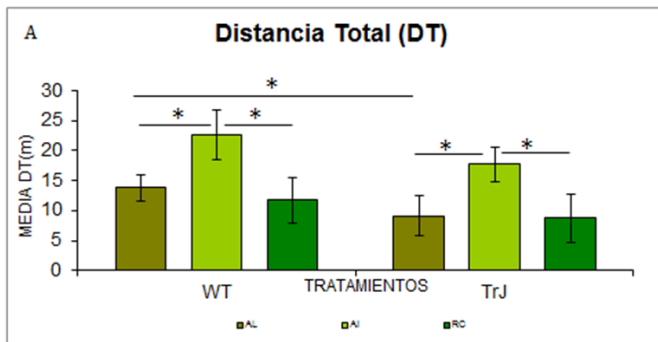
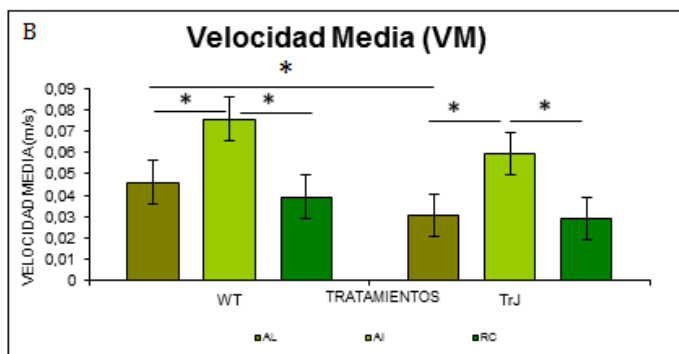


Figura 4.2.2A. Distancia Total en Campo abierto. Representación grafica de medias de DT. Los diferentes colores indican cada tratamiento. Las barras a la derecha corresponden a los ratones *Wt* y los de la izquierda a los *TrJ*.



Gráficos 4.2.2B. Velocidad Media en Campo Abierto. Representación gráfica de medias de las Velocidades Medias.. Los diferentes colores indican cada tratamiento. Las barras a la derecha corresponden a los ratones Wt y los de la izquierda a los *TrJ*.

Los individuos de diferente genotipo que se alimentaron libremente presentaron diferencias significativas en DT y VM ($p=0.01$, Anexo X). En los ratones bajo tratamientos los contrastes entre ambos genotipos se atenúan con los efectos del tratamiento, siendo las diferencias entre genotipos dentro de cada tratamiento, no significativas. En los individuos bajo AI se observaron medias mayores a las de los individuos alimentados AL, no así en los individuos bajo RC. Se observa un efecto similar al registrado en las variaciones de DT en las velocidad medias.

Las trayectorias seguidas por los ratones tratados ayudan a comprender los resultados y permiten su interpretación (Fig.4.2.2C).

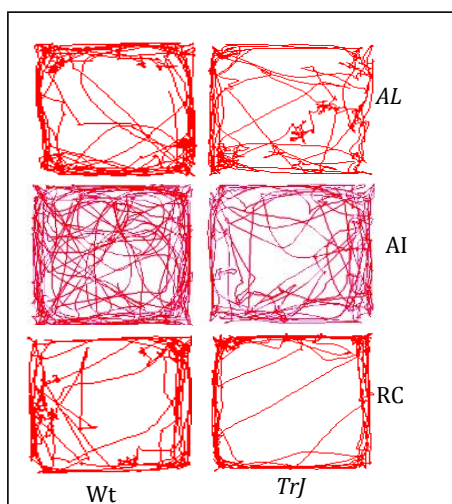


Figura 4.2.2C. Trayectorias sobre el Campo. Ilustra las trayectorias seguidas por los ratones en el campo en función de los genotipos y de los diferentes tratamientos. Se han seleccionado trayectorias representativas en cada grupo.

Obsérvese el mayor desplazamiento mostrado por los animales sometidos a AI. Otros resultados obtenidos en campo abierto se muestran en el Anexo XII.

4.3. CAMBIOS HISTO-MOLECULARES.

Los efectos de la dieta fueron evaluados a través del estudio de los perfiles de expresión de PMP22 y F-Actina, proteínas con cuya distribución e intensidad de expresión es diferente entre los individuos portadores de la mutación y sanos (Fig.4.3).

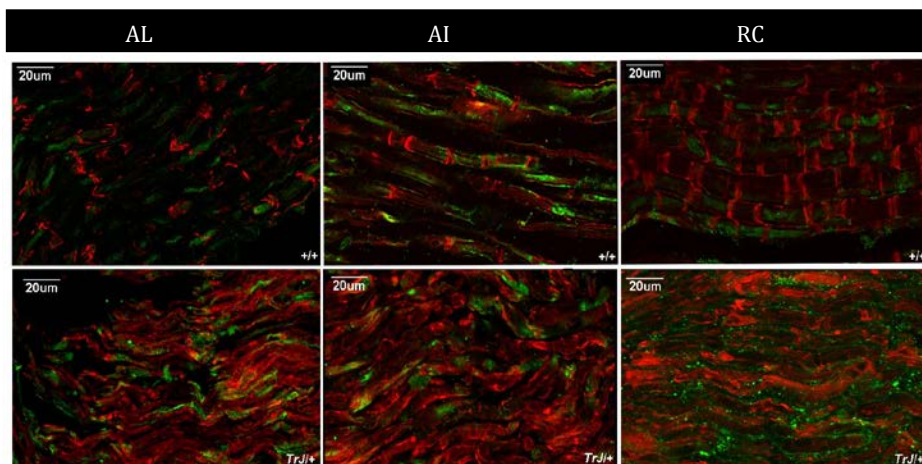


Figura 4.3. Inmunohistoquímica (IHQ). Se empleó una IHQ indirecta sobre cortes en congelación de nervio ciático. Se observa PMP22 en verde y F-Actina en rojo en nervios de individuos sometidos a los distintos tratamientos, a la derecha se observan los nervios AL, al centro AI y a la izquierda RC. El panel superior corresponde al genotipo salvaje y el inferior *TrJ*.

Los patrones de distribución de las proteínas marcadoras denotan diferencias entre ambos genotipos. El arreglo del citoesqueleto de F-Actina en los ratones Wt marca el citoplasma axonal, el compartimento adaxonal y abaxonal, las ISL y los nodos de Ranvier. En los *TrJ* hay una distribución menos ordenada y aparentemente más intensa de microfilamentos de actina. En relación a PMP22, la distribución en ratones Wt está acotada a las porciones citoplasmáticas de la CS, se observa sobre el axón y en el citoplasma externo, sin embargo en los ratones *TrJ* se presenta en grandes acúmulos, no acotados a las regiones citoplasmáticas, y pareciera tener mayor intensidad. El fenotipo molecular de los individuos portadores de la mutación bajo RC presenta una expresión más discreta y puntiforme de PMP22, con disminución de los grandes acúmulos citoplasmáticos, diferenciándose claramente de los individuos del mismo genotipo, alimentados AL.

5. DISCUSIÓN.

5.1. CARACTERIZACIÓN DEL MODELO BIOLÓGICO TJ Y VARIACIONES TEMPORALES DE CONSUMO Y PESO EN INDIVIDUOS BAJO TRATAMIENTOS DE RESTRICCIÓN.

Los modelos animales que presentan alteraciones genéticas tales como deleciones o sobre-expresión de genes, pueden presentar alteraciones en sus patrones de alimentación y el balance energético en general, así como respuestas alteradas frente a señales específicas que participan normalmente en el control de la alimentación (Marsh *et al.*, 1999; Moran, 2003). En el caso de nuestro modelo animal (ratones *TrJ*) en las condiciones experimentales de nuestro laboratorio, previo a la realización de esta tesis, no se había analizado ni caracterizado este modelo a través de la definición de parámetros fisiológicos como el consumo diario y el peso corporal en el tiempo. Para cumplir con los objetivos planteados inicialmente, la determinación de los mismos por animal y por genotipo, constituyó una herramienta importante en la posterior implementación de los tratamientos de restricción. Si bien la generalización, es decir la obtención de medias de consumo y peso, podría ser inapropiada debido a que no considera las variaciones y requerimientos individuales, su implementación resultó eficaz en la sistematización del método experimental a aplicar. Otros métodos alternativos de determinación de consumo podrían haberse implementado. Los más simples miden el consumo de un grupo y así se obtiene un promedio consumo/ratón como una medida bruta de la ingesta. Con mayor complejidad se pueden emplear sistemas informáticos que permiten el seguimiento de la ingesta empleando una célula fotoeléctrica que se interrumpe cuando el ratón está en contacto con la fuente de alimento. Estos proporcionan información sobre el patrón de alimentación, pero no sobre la cantidad consumida en cada episodio de alimentación. Otros sistemas proporcionan información cualitativa y cuantitativa de las cantidades consumidas, un ejemplo de ellos son las cajas metabólicas. Los dispensadores de pellets se activan en respuesta a la conducta del animal, el cual presiona una palanca que provoca la obtención del pellet (Bachmanov *et al.*, 2007). Estos pueden ser útiles para medir la

motivación y brindan información sobre la distribución de horas de alimentación. Esta información no se ha determinado en nuestro trabajo. Un método frecuentemente utilizado es la medida de consumo en pares o pareada, donde se mide el consumo durante 24 horas de los animales control y con esta información se establece qué cantidad de alimento se le dará al grupo experimental al día siguiente. Si la ingesta es estable en el tiempo, la medición de una vez por semana es suficiente. Este diseño se utiliza para caracterizar síndromes de obesidad en una variedad de modelos (Bachmanov *et al.*, 2007). El método elegido en este trabajo, determinaba el consumo de ratones posicionados en cajas individuales, de esta forma evitábamos sobre o sub estimaciones y por otro lado estábamos descartando posibles modificaciones o efectos producidos por contactos sociales. Así mismo, el diseño experimental planteado para la realización de los tratamientos de restricción nos exigía, posicionar a los ratones en jaulas individuales y de ahí también la importancia de determinar el consumo bajo las mismas condiciones. En principio la implementación del método de medidas pareadas parece ser más exacto que el método empleado en esta tesis. Éste permite determinar el consumo en las mismas condiciones en las que se desarrollan las dietas ya que la medición del consumo se realiza un día o semana antes. Sin embargo, nuestras condiciones de trabajo no nos permitían trabajar con este sistema ya que la falta de espacio era un factor limitante que imposibilitaba la realización de los tratamientos en simultáneo.

Una vez elegido el método, fue importante tomar en cuenta algunos factores que pueden inducir a error en la determinación del consumo. Uno de ellos lo constituyó la contabilización de las “migajas” en el peso final ya que estas pueden representar una porción significativa de la diferencia de peso entre el peso pre y post medición. En nuestro caso el uso de una cama lisa blanca de pasta de celulosa, permitió contabilizar con mayor precisión las migajas y disminuir así el error en la medición. Al mismo tiempo, la utilización de un control que tomara en cuenta las variaciones de peso del pellet debidas a variaciones en las condiciones ambientales permitió obtener medias que no incluyeran estas fluctuaciones.

Otro aspecto relevante en el seguimiento del peso y el consumo semana tras semana es que se ha profundizado el conocimiento de la colonia a nivel del comportamiento habitual de sus individuos. Es decir, el contacto continuo del investigador con los

individuos de la colonia, hacen que este adquiera cierto conocimiento o sensibilidad especial, derivado de la experiencia en el manejo, sobre cuál es el estado habitual y “control” de los ratones y esta información es útil como referencia para la detección temprana de alteraciones individuales en los animales bajo tratamiento, lo cual es importante debido a las posibles consecuencias dramáticas en el estado de los individuos sometidas a restricción dietaria. La detección temprana de cambios drásticos en el peso por ejemplo, permitió aliviar sus consecuencias, manteniendo el bienestar animal.

Relación consumo/peso.

La alimentación, la bebida y el peso corporal están relacionados entre sí (Bachmanov *et al.*, 2002; Selman *et al.*, 2001) e influenciados por factores genéticos y ambientales (Smith *et al.*, 2000). La literatura previa sugiere que la relación entre el tamaño corporal y el consumo es compleja y generalmente la ingesta se correlaciona positivamente con el tamaño corporal (Bachmanov *et al.*, 2007). En nuestro caso y en relación al consumo o ingesta de alimento, no hemos hallado diferencias en los individuos en función de sus genotipos (salvo algunas semanas excepcionales). El consumo de los individuos adultos de nuestra cepa ha sido homogéneo durante los 5 meses con un pequeño incremento hacia la etapa final, lo cual hace acuerdo con la observación de individuos obesos en etapas posteriores a las registradas. Con relación al peso, los individuos de genotipo Wt tienen una tendencia a aumentar su peso corporal con el transcurso del tiempo. Este patrón de ganancia de peso es diferente en los individuos *TrJ*, los cuales parecieran presentar un desbalance metabólico, que podría determinar que el tamaño corporal no se correlaciona con el incremento en la ingesta. El ajuste de la ingesta al peso corporal puede tener distintos tipos de interpretación y permite encontrar fuentes de variación en el consumo independientes del peso corporal (Bachmanov *et al.*, 2007). Si la relación entre peso y consumo se correlacionan positivamente y el peso fuera el único parámetro que determinara la ingesta (y viceversa), entonces a medida que transcurren las semanas y los individuos ganan peso, deberían aumentar proporcionalmente su ingesta. Los gráficos con este índice (relación consumo-peso en la etapa adulta) deberían entonces presentar cierta predisposición a permanecer constantes en el tiempo si ambos incrementos fueran proporcionales. En los individuos de genotipo Wt el índice no se comporta de esta forma, presentando una

pendiente negativa, la cual es consecuencia de su tendencia natural a la ganancia de peso, que no es acompañada de una mayor ingesta. Los individuos *TrJ* sin embargo, sí muestran una relación consumo-peso constante, con una mínima ganancia de peso. Estos resultados estarían indicando que los ratones *TrJ* presentan algún tipo de alteración metabólica asociada a su condición genotípica, la cual impediría que ocurra la tendencia natural a la ganancia de peso corporal con el tiempo. El hallazgo de la existencia de un metabolismo energético diferente para ambos genotipos y en particular de un metabolismo energético asociado al genotipo *TrJ*, no constituía un concepto previamente establecido y nos enfoca a futuro en experimentos que intenten explicar la razón fisiológica y sistémica que podría estar asociada a los niveles de consumo y ganancia de peso. Para lograr la comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a la regulación del peso corporal, se requiere el conocimiento de la ingesta de alimentos, producción y gasto de energía así como la selección de la fuente de energía en cada situación (Guo y Hall, 2009). Desde una perspectiva fisiológica, una comprensión adecuada de los fenotipos metabólicos pertenecientes a diferentes modelos murinos requiere la integración cuantitativa de estas variables y de sus fluctuaciones temporales (Guo y Hall, 2011). Mientras que la ingesta de alimentos así como los cambios de peso corporal son medidos frecuentemente y son datos con los cuales contamos, las medidas subyacentes de la dinámica de la producción de energía y oxidación de las grasas no son parámetros que se consigan con facilidad. Para su obtención se utilizan entre otros, sistemas de calorimetría indirecta, con los cuales se mide el gasto energético así como el intercambio respiratorio durante períodos de unos pocos días. La mayoría de estos sistemas, además de sus exorbitantes costos, requieren la eliminación de los ratones de su ambiente normal lo que puede alterar su comportamiento y no brindar con exactitud la información requerida. Existen también modelos matemáticos basados en la ley de conservación de energía, que con muy pocos supuestos previos, permiten proporcionar estimaciones de la producción de energía y la selección del combustible durante determinados períodos en distintos modelos animales (Guo y Hall, 2009). Todas estas herramientas, aplicadas a nuestro modelo experimental, nos acercarán a descubrir cuáles son las causas de su alteración metabólica, aun no descrita en la literatura. Creemos que una de sus posibles causantes podría ser el continuo temblequeo presente en estos ratones lo cual conduciría a un mayor gasto energético, que finalmente se traduce en un menor peso corporal, ya que no se

acompaña de un mayor consumo. Al mismo tiempo, el déficit periférico afecta la habilidad de los animales para alimentarse y por tanto esa tarea como las demás le resultan más onerosas energéticamente que a los ratones Wt.

Ayuno Intermitente.

Los resultados indican que los ratones de ambos genotipos, sometidos a AI en los días de alimentación presentan un consumo mayor a las medias diarias de alimentación observadas en los ratones controles, consumiendo entre 1,5 y 2 veces la cantidad diaria consumida por los individuos alimentados AL. Este resultado es consistente con resultados anteriores (Anson *et al.*, 2003) donde se sugiere que los animales consumen esencialmente la misma cantidad de calorías totales bajo AI que con alimentación a demanda, medido en el transcurso de 48 horas. Considerando los resultados obtenidos en las fluctuaciones del peso corporal provocadas por el tratamiento, no se aprecian consecuencias sobre el crecimiento de los individuos de ambos genotipos, los cuales si bien no alcanzaron los pesos controles aumentaron mínimamente su peso en el tiempo. De la comparación del gráfico de peso corporal en función del tiempo de ratones bajo AI con los AL, se puede apreciar como ambos genotipos alcanzan en todas las semanas valores promedio de peso similares, lo cual no concuerda con lo observado en los controles AL, donde habían claras diferencias en la ganancia de peso. La ausencia de diferencias en consumo y peso, entre animales de ambos genotipos sometidos a AI, muestran una relación entre ambos parámetros que es decreciente en el tiempo y se asemeja al índice consumo-peso presentado por los ratones Wt alimentados a demanda, pero con menor pendiente. Esto podría entenderse como un posible efecto del tratamiento, en el cual los individuos *TrJ* consiguen una mayor ganancia de peso y los Wt una menor, acortándose las distancias fenotípicas (expresadas a través del peso corporal) entre los genotipos, a este nivel. Podría decirse que el metabolismo energético se vuelve fisiológicamente equivalente en ambos genotipos. Una posible explicación a estos resultados surge del análisis del comportamiento de estos ratones en campo abierto, los cuales se detallaran más adelante y tiene relación con la hiperactividad observada en los ratones bajo este régimen. Este dato es sumamente relevante porque nos podría estar dando un pista sobre cuál es la causa de la alteración metabólica presente en los ratones *TrJ*. Alternativamente a esta dieta con periodos de AI de 24 horas existen otras variantes que planean periodos de ayuno menos prolongados, por

ejemplo 12 horas, junto con horas específicas de alimentación, que aparentemente serían mejor tolerados por los individuos y con mayor aplicabilidad humana.

Restricción Calórica.

Los ratones sometidos a RC, consumieron un porcentaje menor al consumido por los AL, el cual se fue disminuyendo semana tras semana. Existen diversas formas de realizar los cálculos de RC, en algunos casos se realiza directamente la restricción sobre las medias de consumo obtenidas en los individuos alimentados AL y en otros se realiza un ajuste sobre el peso individual de cada ratón bajo RC. En este trabajo se utilizó el segundo método, por lo cual las diferencias entre el consumo AL y el de restricción fueron mayores. En este sentido la utilización del criterio de avance del tratamiento, el cual siempre ponderó el cuidado del animal, fue crucial en la protección y cuidado de los individuos frente a posibles estados de desnutrición provocados por la severa dieta de restricción y permitió que la diferencia de peso entre el inicio y el final del tratamiento no sobrepasara el 30%. Si bien es sabido que la dieta baja en calorías tiene efectos beneficiosos sobre los individuos que la llevan adelante, también se conocen sus efectos en la atrofia del crecimiento del cuerpo (Goodrich *et al.*, 1983). La disminución en la ingesta calórica fue claramente reflejada en la disminución del peso corporal de los individuos bajo este tratamiento especialmente en las últimas etapas del mismo. Este resultado es consistente con investigaciones previas (Anson *et al.*, 2003). La ausencia de incremento de peso en función del tiempo fue también un parámetro observado en las atrofas de crecimiento antes señaladas. Esta característica pone de manifiesto la importancia de la realización de estos tratamientos en etapas adultas. Si bien ambos genotipos presentan curvas de crecimiento con formas similares, los individuos de genotipo *TrJ* parecen adaptarse más tempranamente al cambio en la dieta, estabilizando su peso y manteniéndolo constante luego de una primera fase de disminución. El mismo patrón se observa en los individuos *Wt*, aunque el período inicial de descenso de peso fue más extenso (4 meses de tratamiento). A partir de este momento los individuos estabilizan su peso. Este patrón diferencial muestra distintos efectos del tratamiento en función de los genotipos. En este caso la relación consumo-peso fue determinada por nosotros mismos al realizar los cálculos de RC. La información del peso en el tiempo denota al igual que los controles diferencias genotípicas. Del ajuste del consumo al peso, consecuencia de los cálculos de RC, el genotipo *TrJ* vuelve a comportarse de una

forma distinta al control *AL* y ambos genotipos acercan sus diferencias, observándose un efecto del tratamiento *RC* en el metabolismo energético de ambos genotipos, pero que cambia el patrón constante del *TrJ* alimentado *AL*.

5.2. EVALUACIÓN DE LOS DESEMPEÑOS LOCOMOTORES: TEST DE LA BARRA GIRATORIA Y CAMPO ABIERTO.

Barra Giratoria

El test de la barra giratoria a velocidades crecientes es un test muy exigente y complejo desde el punto de vista físico, siendo el resultante un comportamiento locomotor integral, que deja ver no sólo el desarrollo neuromotor sino también el balance o equilibrio corporal y el alcance de la coordinación motora. Estos parámetros se relacionan con la latencia entre los tiempos de inicio y caída del Rotarod (Crawley, 1999; Rustay *et al.*, 2003). Los individuos de ambos genotipos que se alimentan *AL* difieren notablemente en sus tiempos de permanencia sobre la barra. Estos resultados concuerdan con estudios previos que muestran que roedores transgénicos modelos de *CMT1A* presentan una discapacidad severa para realizar la performance motora compleja y la tarea de balance exigida por el Rotarod (Sereda *et al.*, 1996, Passage *et al.*, 2004). El tratamiento de *RC* en los animales portadores de la mutación evaluado a través de este test mostró una mayor recuperación de la estabilidad, agarre y permanencia en la barra que los animales sometidos a *AI*, para los mismos tiempos de tratamiento. Dentro del grupo *RC*, aun cuando se observó una mayor variabilidad entre individuos en respuesta al tratamiento, el efecto beneficioso del mismo es reflejado en los resultados finales. Se consiguió aumentar el tiempo de permanencia sobre la barra, hecho que nos comunica cambios anatómicos y funcionales ocurridos dentro de los ratones *RC*. Creemos que un mayor número de individuos *TrJ* bajo *RC* nos permitiría obtener diferencias significativas con los individuos *TrJ* bajo *AL*. Sin embargo, el tratamiento es perfectible y en este sentido, debemos trabajar. Ajustes más sutiles en la implementación de la dieta podrían permitir visualizar mejores resultados en la estabilidad corporal así como tiempos de permanencia sobre la barra móvil aún mayores.

Campo Abierto

El test de campo abierto permite observar locomoción exploratoria general. Del análisis de algunas de sus características horizontales (distancia, velocidad y trayectoria) se desprenden resultados que permite complementar, lo observado en el Rotarod. La distancia y la velocidad mostraron variaciones similares que fueron significativas solamente para los animales *AL*, es decir, los ratones de genotipo *TrJ* se desplazan menos por el campo y a menores velocidades, por lo que presentan un peor desempeño locomotor en campo abierto. En general hay un efecto “tratamiento” similar para ambos genotipos. Los animales *TrJ* sometidos a RC se movieron menos y a menor velocidad que el resto de los individuos, en tanto que la alimentación intermitente provocó un incremento en el desempeño locomotor *TrJ* respecto de los controles. El análisis de las trayectorias descritas complementado con los gráficos del tiempo en periferia (Anexo XII) en los individuos controles parece brindar resultados contrapuestos. Basaré mi análisis avalada por los gráficos ya que representan promedios y no actividades individuales. En la mayoría de los estudios de campo abierto, los animales que se ubican mayormente sobre la periferia del campo se dice que presentan mayor ansiedad que aquellos que exploran libremente el centro del campo. La tigmotaxis, es una conducta frecuente en el campo abierto que se caracteriza por la tendencia natural de los roedores a preferir la periferia al centro. La tigmotaxis es considerada un índice de la ansiedad, ya que muchos fármacos ansiolíticos reducen esta conducta promoviendo el tiempo de permanencia en la parte central del campo (Prut y Belzung, 2003). En este sentido, la ansiedad puede ser considerada como la resultante de múltiples parámetros integrados en diferentes niveles de complejidad biológica. Los resultados hallados muestran mayores índices de ansiedad (medida como el tiempo de permanencia en la periferia) en los individuos *TrJ* alimentados *AL* que los *Wt* de igual condición. Un componente significativo de la ansiedad podría ser consecuencia de la imposibilidad de responder a una situación nueva (el campo abierto) debido a su inhabilidad física. Para confirmar los mayores índices de ansiedad en los ratones *TrJ* indicados en estos resultados preliminares se podrían implementar otros test comportamentales (como el Plus Maze), así como la utilización de fármacos de acción ansiolítica.

Se nota en el grupo bajo AI un perfil comportamental alterado y especialmente se observó una hiperactividad en la locomoción exploratoria en el campo abierto. Sin embargo, percibimos que el cambio más relevante en el comportamiento, podría ser, al menos parcialmente, atribuible a un componente de estrés provocado por el prolongado ayuno que separa los períodos de alimentación. Los ratones de ambos genotipos sometidos a dieta de RC no muestran hiperactividad y los tiempos de permanencia en la periferia son muy parecidos. El tratamiento de RC muestra mayores tiempos de permanencia en la periferia (y en este sentido constituye el tratamiento que generaría mayor ansiedad), menores distancias recorridas y reducidas velocidades de desplazamiento, en ambos genotipos. En conjunto, estos hallazgos muestran que la utilización de varios parámetros de comportamiento, medidos en conjunto, permite una resolución más clara de los efectos de los diferentes regímenes.

En resumen y observando ambos test, consideramos que el tratamiento de RC ofrece ventajas para los individuos portadores de la neuropatía periférica. Frente a una tarea exigente (Rotatod), los individuos *TrJ* fueron capaces de desplegar una respuesta física mejor adaptada y más rápida a la que mostraron los animales *TrJ* alimentados *AL*. El tratamiento de AI permite a los individuos una mayor movilidad (campo abierto), pero frente a una tarea exigente como el Rotarod, no se observan mejoras en su desempeño locomotor.

5.3. CAMBIOS HISTO-MOLECULARES.

En las neuropatías hereditarias periféricas, es común encontrar nervios con un patrón de expresión molecular alterado. En las neuropatías desmielinizantes, como CMT1A, donde se asume que el defecto se inicia en las CS causando disfunción y/o desmielinización, también se observa pérdida axonal. El fenotipo neuropatológico resultante al igual que el fenotipo normal, surge de la integración de la CS y los axones (Aguayo *et al.*, 1977; Salzer *et al.*, 2008; Suter y Scherer, 2003). Las modificaciones de la estructura mielínica normal tiene efectos pronunciados en el calibre axonal, la fosforilación, el empaquetamiento de NF, el transporte axonal y la organización de los canales iónicos en el axolema. En particular, la localización errónea de PMP22 altera la homeostasis proteica de la CS y lleva a la acumulación de Ub, proteínas mielínicas, chaperonas y componentes del proteosoma a regiones cercanas o dentro de los

agregados (Ryan *et al.*, 2002; Fortun *et al.*, 2003, 2006). Se ha descrito que la formación de agregosomas se acompaña de redistribución de los componentes del citoesqueleto. Los filamentos intermedios se condensan alrededor de los agregados pericentriolares ubiquitinizados y allí juegan un papel clave en su encapsulación. A su vez, la homeostasis de los componentes del citoesqueleto están alteradas en los nervios que presentan condiciones de regeneración/degeneración. En estas patologías crónicas, el equilibrio "normal" no se alcanza nunca y los mecanismos de reparación celular están activados permanentemente trabajando en pos de superar insuficiencias que permitan revertir el avance la enfermedad (Kun *et al.*, 2011a).

El estudio de los perfiles de expresión de PMP22 y F-Actina, en nervios normales y sometidos a tratamientos de AI y RC muestra una distribución e intensidad de expresión distinta en función de los genotipos. Las señales de PMP22 en los nervios ciáticos de individuos *TrJ* adultos son granulares y parecieran formara cúmulos. La señal de la F-actina pareciera presentarse más estructurada e intensa. De hecho, la F-Actina se encuentra incrementada 5 veces en las SLI y 1,7 en los nodos de Ranvier en los nervios de los ratones *TrJ* con respecto a los nervios ciáticos Wt (Kun *et al.*, 2011b). La presencia de las ISL en dominios gliales asegura el tráfico de proteínas y vesículas, las cuales contribuyen al mantenimiento de la homeostasis mielínica (Cajal, 1928, Ghabriel, *et al.*, 1980, 1981, 1987; Hiscoe, 1947; MacKenzie *et al.*, 1984).

El fenotipo molecular de los individuos portadores de la mutación bajo RC presenta una expresión más discreta y puntiforme de PMP22, con disminución de los grandes acúmulos citoplasmáticos, diferenciándose claramente de los individuos del mismo genotipo, alimentados *AL* y bajo *AI*. Los tiempos de recuperación del fenotipo Wt deben ser explorados con mayor profundidad en individuos *TrJ* sometidos a tratamientos de RC. Nuestros datos preliminares señalan igualmente que esto se ve reflejado no solamente en la expresión de PMP22 sino también en la redistribución y reorganización del citoesqueleto de Actina (datos no mostrados).

5.4. CONCLUSIONES FINALES:

- La estrategia de situar a las hembras de nuestra cepa próximas al parto en grupos pares, una alimentación más proteica y un mayor aislamiento de las hembras gestantes, permitió el crecimiento en número de la colonia a corto plazo, aumentando el porcentaje de sobrevivencia de las crías y disminuyendo el infanticidio.
- Los individuos alimentados *AL* muestran patrones de ganancia de peso y relaciones consumo-peso diferentes para ambos genotipos. Los ratones *TrJ* parecen presentar una alteración en su metabolismo. Los efectos de los tratamientos de restricción (AI y RC) se expresan en la ganancia de peso y relación consumo-peso.
- Los test comportamentales permitieron distinguir desempeños locomotores diferentes para cada genotipo. Las variaciones en estos, permiten apreciar los efectos de los tratamientos.
- Los patrones de expresión de PMP22 y F-Actina están alterado en los individuos *TrJ*. Estas alteraciones se modifican por la implementación de diferentes dietas.

Las opciones de tratamientos para los individuos afectados son limitadas. Obtener y ofrecer a la población nuevas herramientas terapéuticas permitirán mejorar y prevenir el desarrollo de la neuropatología. Creemos que la implementación de tratamientos nutricionales es una alternativa posible en la cual queda mucho para profundizar y optimizar.

D 6. REFERENCIAS

Aguayo AJ, Atiwell M, Trecarten J, Perkins S, Bray M. 1977. Abnormal myelination in transplanted Trembler mouse Schwann cells. *Nature* 265: 73-75.

Amici S, Dunn W, Notterpek L. 2007. Development abnormalities in the nerves of peripheral myelin protein 22- deficient mice. *Journal of Neuroscience Research* 85, 238-249.

Anson RM, Guo Z, Cabo R, Iyun T, Rios M, Hagepanos A, Ingram D, Lane MA, Mattson MP. 2003. Intermittent fasting dissociates beneficial effects of dietary restriction on glucose metabolism and neuronal resistance to injury from calorie intake *PNAS* 100 (10)6216-6220.

Armati P J, Pollard J D, Gatenby P. 1990. Rat and human Schwanncells in vitro can synthesize and express MHC molecules. *Muscle Nerve* 13,106_16.

Armati PJ, Pollard J D. 1996.Immunology of the Schwann cell. *Baillieres. Clin Neurol* 5, 47_64.

Ayers MM, Anderson RM. 1973. Onion bulb neuropathy in the Trembler mouse: a model of hypertrophic interstitial neuropathy(Dejerine-Sottas) in man. *Acta Neuropathologica* 25, 54±70.

Babicky A, Novakova V. 1986. Protein malnutrition of the lactating female rat: effect on maternal behaviour and spontaneous weaning of young rats. *Physiol Bohemoslov.* 35(5):456-63.

Bachmanov AA, Reed DR, Beauchamp GK, Tordoff MG. 2002. Food Intake, Water Intake, and Drinking Spout Side Preference of 28 Mouse Strains. *Behav Genet.* 32(6): 435-443.

Bachmanov AA, Boughter J D. 2007. Behavioral genetics and taste.*BMC Neuroscience.* 8(Suppl 3):S3.

Banchs I, Casasnovas C, Albertí A, De Jorge L, Povedano M, Montero J, Martínez-Matos JA, Volpini V. 2009. Diagnosis of Charcot-Marie-Tooth Disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.*Article ID 985415, 10 pagesdoi:10.1155/2009/985415

Berciano J, Combarros O. 2003.Hereditary Neuropathies. *Current Opinion in Neurology,* 16: 613-622.

Berthold CH, Fraher JP, King RH, Rydmark M. 2005. Microscopic anatomy of the peripheral nervous system.*Peripheral Neuropathy,* 4th Edn, Elsevier Saunders, Philadelphia, PA,pp. 3592.

Bohlen M, Cameron A, Metten P, Crabbe JC, Wahlsten D. 2009. Calibration of rotational acceleration for the rotarod test of rodent motor coordination. *J NeurosciMethods*. 30;178(1):10-4.

Bosse F, Zoidl G, Gillen CP, Wilms S, Mtiller HW. 1994. *J Neurosci. Res.* 37, 529-537.

Brancolini C, Marzinotto S, Edomi P, Agostoni E, Fiorentini C, Muller HW, Schneider C. 1999. Rho-dependent regulation of cell spreading by the tetraspan membrane protein Gas3/PMP22. *Mol. Biol. Cell* 10, 2441–2459.

Buchberg AM, Brownell E, Nagata S, Jenkins NA, Copeland NG. 1989. A comprehensive genetic map of murine chromosome 11 reveals extensive linkage

Bunge MB, Williams AK, Wood PM. 1982. Neuron-Schwann cell interaction in basal lamina formation. *Dev. Biol.* 92: 449-460.

Cajal, SRY. 1928. Degeneration and regeneration of the nervous system, volumes I y II Oxford University Press London.

Cal K. 2009. Charcot-Marie-Tooth: Genotipado de una colonia de ratones modelo de esta neuropatía periférica humana. Tesina de Grado. Universidad de la Republica.

Caldwell JH, Schaller KL, Lasher RS, Peles E, Levinson SR. 2000. Sodium channel Na(v)1.6 is localized at nodes of Ranvier, dendrites, and synapses. *Proc Natl Acad Sci.* 97(10):5616-20.

Carlson AJ, Hoelzel F. 1948. Prolongation of the life span of rats by bulk-formers in the diet. *J Nutr.* 10;36(1):27-40.

Champagne FA, Curley JP, Keverne EB, Bateson PG. 2007. Natural variations in postpartum maternal care in inbred and outbred mice. *Physiology & Behavior* 91: 325–334.

Charcot JM, Marie P. 1886. Sur une forme particulière d'atrophie musculaire progressive, souvent familiale, débutant par les pieds et les jambes atteignant plus tard les mains. *Revue de Médecine.* 6:97-138

Charles P, Tait S, Faivre-Sarrailh C, Barbin G, Gunn-Moore F, Denisenko-Nehrbass N, Guennoc AM, Girault JA, Brophy PJ, Lubetzki C. 2002. Neurofascin is a glial receptor for the paranodin/Caspr contactin axonal complex at the axoglial junction. *Curr Biol.* 5;12(3):217-20.

Ciechanover A. 2005. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 6, 79–86.

Ciechanover A. 2006. Intracellular protein degradation: from a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Exp. Biol. Med.* 231, 1197–1211.

Cowan, WM, Jessell, TM, Zipursky, SL. Editores 1997. Molecular and cellular approaches to neural development. Oxford University Press. Chapter 3: "Neuron-glia interactions": pgs 64-107

Crawley JN. 1999. Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Res.* 17;835(1):18-26.

Cruz-Martinez A, Bort S, Arpa J, Duarte J, Palau F. 1997. Clinical, genetic and electrophysiologic correlation in hereditary neuropathy with liability to pressure palsies with involvement of PMP22 gene at chromosome 17p11.2. *Eur J Neurol.* 4:274-86.

De Luca R, Alexandre S, Marques T, Lopes de Souza N, Merusse JL, Peris Neves S. 1996. Manual para técnicos en bioterio, 2da edición, pag. 81, 82; Ed. Colegiobrasileiro de experimentación animal (COBEA).

Devaux JJ, Scherer SS. 2005. Altered Ion Channels in an Animal Model of Charcot-Marie-Tooth Disease Type IA, *The Journal of Neuroscience.* 25(6):1470-1480.

Dobson CM. 2003. Protein folding and misfolding. *Nature* 426: 884-890.

D'Urso D, Schmalenbach C, Zoidl G, Prior R, Muller HW. 1997. Studies on the effects of altered PMP22 expression during myelination in vitro. *Journal of Neuroscience Research.* 48(1):31-42.

D'Urso D, Prior R, Greiner-Petter R, Gabreels-Festen AA, Muller HW. 1998. Overloaded endoplasmic reticulum-Golgi compartments, a possible pathomechanism of peripheral neuropathies caused by mutations of the peripheral myelin protein PMP22. *Journal of Neuroscience.* 18(2):731-40.

Einheber S, Zanazzi G, Ching W, Scherer S, Milner TA, Peles E, Salzer JL. 1997. The axonal membrane protein Caspr, a homologue of neurexin IV, is a component of the septate-like paranodal junctions that assemble during myelination. *J Cell Biol* 139:1495-1506.

Eshed Y, Feinberg K, Poliak S, Sabanay H, Sarig-Nadir O, Spiegel I, Bermingham JR Jr, Peles E. 2005. Gliomedin mediates Schwann cell-axon interaction and the molecular assembly of the nodes of Ranvier. *Neuron* 47:215-229.

Eshed Y, Feinberg K, Carey DJ, Peles E. 2007. Secreted gliomedin is a paranodal matrix component of peripheral nerves. *J Cell Biol.* 177:551-562.

Fabbretti E, Edomi P, Brancolini C, Schneider C. 1995. Apoptotic phenotype induced by overexpression of wildtype gas3/PMP22: its relation to the demyelinating peripheral neuropathy CMT1A. *Genes Dev.* 9, 1846-1856.

Fannon AM, Sherman DL, Ilyina-Gragerova G, Brophy PJ, Friedrich VL Jr, Colman DR. 1995. Novel E-cadherin-mediated adhesion in peripheral nerve: Schwann cell architecture is stabilized by autotypic adherens. *J. Cell Biol.* 129(6), 189-202.

Fortun J, Dunn W, Joy S, Li J, Notterpek L. 2003. Emerging Role for Autophagy in the Removal of Aggregates in Schwann Cells. *The Journal of Neuroscience*. 23: 10672–10680.

Fortun J, Li J, Go J, Fenstermaker A, Fletcher BS, Notterpek L. 2005. Impaired proteasome activity and accumulation of ubiquitinated substrates in a hereditary neuropathy model. *J Neurochem*. 92:1531–1541.

Fortun J, Go JC, Li J, Amici SA, Dunn WA Jr, Notterpek L. 2006. Alterations in degradative pathways and protein aggregation in a neuropathy model based on PMP22 overexpression. *Neurobiol Dis* 22: 153–64.

Fortun J, Verrier J, Go J, Madorsky I, Dunn W, Notterpek L. 2007. The formation of peripheral myelin protein 22 aggregates is hindered by the enhancement of autophagy and expression of cytoplasmic chaperones. *Neurobiol Dis*. 25: 252–265.

Geren BB, Schmitt FO. 1954. The structure of the Schwann cell and its relation to the axon in certain invertebrate nerve fibers. *Proc Natl Acad Sci*. 40(9):863-70.

Ghabriel MN y Allt G. 1987. Incisures of Schmidt-Lanterman. *Prog Neurobiol*. 17,25-58.

Ghabriel MN, Allt G. 1980. Schmidt-Lanterman incisures. II. A light and electron microscope study of remyelinating peripheral nerve fibres. *Acta Neuropathol*. 52(2):97-104.

Ghabriel MN, Allt G. 1981. Incisures of Schmidt-Lanterman. *Prog Neurobiol* 17(1-2):25-58.

Goldberg AL. 2003. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*.;426(6968):895-9.

Goodrich CL, Ingram DK, Reynolds MA, Freeman JR, Cider NL. 1983. Effects of intermittent feeding upon growth, activity, and Lifespan in rats allowed voluntary Exercise. *Experimental aging research*. 9(3).

Greenfield S, Brostoff S, Eylar EH, Morell P. 1973. Protein composition of myelin of the peripheral nervous system. *J Neurochem* 20, 120716.

Griffith LS, Schmitz B, Schachner M. 1992. LZMNK-1 carbohydrate and protein-protein interactions mediate the homophilic binding of the neural adhesion molecule PO. *Journal of Neuroscience Research*. 33(4):639-48.

Guo J, Hall KD. 2009. Estimating the Continuous-Time Dynamics of Energy and Fat Metabolism in Mice. *PLoS Comput Biol* 5(9): e1000511.

Guo J, Hall KD. 2011. Predicting Changes of Body Weight, Body Fat, Energy Expenditure and Metabolic Fuel Selection in C57BL/6 Mice. *PLoS ONE* 6(1):e15961.

Hayes LD. 2000.To nest communally or not to nest communally: a review of rodent communal nesting and nursing. *Anim Behav.* 59(4):677-688.

Henry EW, Sidman RL. 1983.The murine mutation trembler-J: proof of semidominant expression by use of the linked vestigial tail marker.*J Neurogenet.*1(1):39-52.

Hershko A, Ciechanover A. 1998. The ubiquitin system.*Annu. Rev. Biochem.* 67, 425-479

Hiscoe HB. 1947. Distribution of nodes and incisures in normal and regenerated nerve fibers. *Anat. Rec* 99, 447-475.

<http://escuela.med.puc.cl>.

<http://nerviums.blogspot.com>.

<http://www.its.caltech.edu>.

Huxley C, Passage C, Robertson A, Youl B, Houston S, Manson A, Saberan-Djoniedi D, Figarella-Branger D, Pellissier J, Thomas P, Fontes M. 1998. Correlation between varying levels of PMP22 expression and the degree of demyelination and reduction in nerve conduction velocity in transgenic mice. *Human molecular genetics*, 7-3, 449-458.

Ionasescu VV, Searby CC, Ionasescu R, Reisin R, Ruggieri V, Arberas C. 1997. Severe Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1A with 1-base pair deletion and frame shift mutation in the peripheral myelin protein 22 gene. *Muscle Nerve.* 20: 1308-10.

Jessen KR, Mirsky R. 2005. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci*6:671-682.

Khajavi M, Shiga K, Wiszniewski W, He F, Shaw CA, Yan J, Wensel TG, Snipes GJ, Lupski JR. 2007. Oral curcumin mitigates the clinical and neuropathologic phenotype of the Trembler-J mouse: a potential therapy for inherited neuropathy. *Am J Hum Genet.* 81(3):438-53.

Klionsky DJ, Emr SD. 2000. Autophagy as a Regulated Pathway of Cellular Degradation. *Science.* 290 (5497), 1717-1721.

Kun A, Rosso G, Canclini L, Romeo C, Bresque M, Cal K, Hanuz A, Calliari A, Sotelo-Silveira JR y Sotelo JR. 2011.The Schwann cell-axon link in normal condition or neuro-degenerative diseases: an immunocytochemical approach. *Immunocytochemistry.* 978-953-308-18-9.

Kun A, Canclini L, Rosso G, Bresque M, Romeo C, Hanuz A, Cal K, Calliari A, Sotelo-Silveira JR y Sotelo JR. 2011. F-actin distribution at Nodes of Ranvier and Schmidt-Lanterman Incisures in mammalian sciatic nerves. *En prensa.*

Lambert S, Davis JQ, Bennett V. 1997. Morphogenesis of the node of Ranvier: Co-clusters of ankyrin and ankyrin-binding integral proteins define early developmental intermediates. *J Neurosci* 17:7025–7036.

Lane-Petter W. 1968. Cannibalism in rats and mice. *Proc R Soc Med.* 12;61(12):1295-6.

Lazzarini RA, Griffin J, Lassman H, Nave KA, Miller R, Trapp B. 2002. Myelin Biology and Disorders.

Lupski J R, Garcia CA. 2001. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. McGraw–Hill, 8th Ed., pp. 5759–5788.

MacKenzie ML, Ghabriel MN, Allt G. 1984. Nodes of Ranvier and Schmidt-Lanterman incisures: an in vivo lanthanum tracer study. *J Neurocytol.* 13(6):1043-55.

Madorsky I, Opalach K, Waber A, Verrier JD, Solmo C, Foster T, Dunn WA Jr, Notterpek L. 2009. Intermittent fasting alleviates the neuropathic phenotype in a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurobiol Dis.* 34 (1):146-54.

Magyar JP, Martini R, Ruelicke T, Aguzzi A, Adlkofer K, Dembic Z, Zielasek J, Toyka KV, Suter U. 1996. Impaired differentiation of Schwann cells in transgenic mice with increased PMP22 gene dosage. *J. Neurosci.* 16(17), 5351–5360.

Manfioletti G, Ruaro ME, Del Sal G, Philipson L, Schneider C. 1990. A growth arrest-specific (gas) gene codes for a membrane protein. *Molecular and Cellular Biology* 10, 2924-2930.

Manning C J, Dewsbury D A, Wakeland E K, Potts W K. 1995. Communal nesting and communal nursing in house mice, *Mus musculus domesticus*. *Animal Behaviour* 50(3): 741-751.

Marsh DJ, Hollopeter G, Huszar D, Lafer R, Yagaloff KA, Fisher SL, Burn P, Palmiter RD. 1999. Response of melanocortin-4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nat Genet*, 21, 1, 119-122

Martin B, Golden E, Egan J, Mattson M y Maudsley S. 2007. Reduced energy intake: the secret to a long and healthy life? *IBS J Sci.* 2(2):35-39.

Martini, R. 1997. Animal models for inherited peripheral neuropathies. *Journal of Anat.* 191, pp. 321±336

Mathey E, Armati P, Mirsky R, Jessen KR, Arroyo EJ, Scherer S, Feltri ML, Wrabetz L, Ko C-P, Sugiura Y, Feng Z, Lisak RP, Benjamins JA, Kieseier BC, Hu W, Hartung H-P., Shy ME, Kamholz J, Li J, Hughes R, Pollard JD. 2007. The Biology of Schwann Cells Development, Differentiation and Immunomodulation.

Melendez-Vasquez CV, Rios JC, Zanazzi G, Lambert S, Bretscher A, Salzer JL. 2001. Nodes of Ranvier form in association with ezrin-radixin-moesin (ERM)-positive Schwann cell processes. *Proc Natl Acad.*98:1235–1240.

Melendez-Vasquez C, Carey DJ, Zanazzi G, Reizes O, Maurel P, Salzer JL. 2005.Differential expression of proteoglycans at central and peripheral nodes of Ranvier. *Glia* 52:301–308.

Mizushima N. 2005. AB generation in autophagic vacuoles. *J Cell Biol.*10;171(1):1 5-7.

Moran T. 2003. Methods for the Study of the Controls of Food Intake in Mice. *Mouse Behavioral Phenotyping.*

Myers JK, Mobley CK, Sanders CR. 2008. The Peripheral Neuropathy-Linked Trembler and Trembler-J Mutant Forms of Peripheral Myelin Protein 22 Are Folding-Destabilized. *Biochemistry.*47 (40), 10620-10629.

Nakatsukasa K, Huyer G, Michaelis S, Brodsky JL. 2008.Dissecting the ER-associated degradation of amifolded polytopic membrane protein. *Cell* 132,101–112.

Nguyen QT, Sanes JR, Lichtman J W. 2002.Pre-existing pathways promote precise projection patterns. *Nat Neurosci* 5, 861_7.

Nicholson BJ. 2003. Gap junctions: from cell to molecule. *J Cell Sc* 116: 4479-81.

Niemann A, Berger P, Suter U.2006. Pathomechanisms of mutant proteins in Charcot-Marie-Tooth disease.*Neuromolecular Med.* 8(1-2):217-42.

Notterpek L, Shooter E M, Snipes G J. 1997. Upregulation of the Endosomal-Lysosomal Pathway in the Trembler-J Neuropathy. *The Journal of Neuroscience.* 17:4190–4200.

Notterpek L, Ryan MC, Tobler AR, Shooter EM.1999. PMP22 accumulation in aggresomes: implications for CMT1A pathology. *Neurobiol Dis.* 6(5):450-60.

Notterpek L, Snipes GJ, Shooter EM. 1999. Temporal expression pattern of peripheral myelin protein 22 during in vivo and in vitro myelination. *Glia*, 25: 358–369.

Notterpek L, Tolwani RJ.1999. Experimental models of peripheral neuropathies. *Lab Anim Sci.*49(6):588-99.

Occhi S, Zambroni D, Del Carro U, Amadio S, Sirkowski EE, Scherer SS, Campbell KP, Moore SA, Chen ZL, Strickland S, Di Muzio A, Uncini A, Wrabetz L, Feltri ML. 2005. Both laminin and Schwann cell dystroglycan are necessary for proper clustering of sodium channels at nodes of Ranvier. *J Neurosci* 25:9418–9427.

Oguievetskaia K, Cifuentes-Diaz C, Girault J, y Goutebroze L. 2005.Contacts cellulaires des fibres myelinisees du systeme nerveux peripherique. *Medicine/Science.* 21,162-169.

Ohsawa Y, Murakami T, Miyazaki Y, Shirabe T, Sunada Y. 2006. Peripheral myelin protein 22 is expressed in human central nervous system. *J Neurol Sci.* 247(1):11-5.

Olzmann JA, Li L, Chin LS. 2008. Aggresome Formation and Neurodegenerative Diseases: Therapeutic Implications. *Current Medicinal Chemistry*, 2008, 15, 47-60 47

Pareek S, Notterpek L, Snipes GJ, Naef R, Sossin W, Laliberté J, Iacampo S, Suter U, Shooer EM, Murphy RA. 1997. Neurons promote the translocation of perihel myelin protein 22 into myelin. *J Neurosci.* 17(20):7754-62.

Pareek S, Notterpek L, Snipes GJ, Naef R, Sossin W, Laliberte J. 1997.Neurons promote the translocation of peripheral myelin protein 22 into myelin. *J Neurosci.* 17: 7754-62.

Parmantier E, Cabon F, Braun C, D'Urso D, Mullerl H.W, Zalc B. 1995.Peripheral Myelin Protein-22 is Expressed in Rat and Mouse Brain and Spinal Cord Motoneurons. *European Journal of Neuroscience.* 7: 1080-1088.

Passage E, Norreel JC, Noack-Fraissignes P, Sanguedolce V, Pizant J, Thirion X, Robaglia-Schlupp A, Pellissier JF, Fontes M. 2004. Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. *NatMed.*10:396-401.

Patel PL, Lupski JR. 1994. Charcot-Marie-Tooth disease: a new paradigm for the mechanism of inherited disease. 10: 128-133.

Peles E, Salzer JL. 2000. Molecular domains of myelinated axons. *CurrOpin Neurobiol* 10:558-565.

Podratz J L, Rodriguez E, Windebank A J. 2001.Role of the extracellularmatrix in myelination of peripheral nerve. *Glia* 35, 3540.

Poliak S, Matlis S, Ullmer C, Scherer SS, Peles E. 2002. Distinct claudinsand associated PDZ proteins form different autotypic tight junctionsin myelinating Schwann cells. *J Cell Biol* 159:361-372.

Poliak S, Peles E. 2003.The Local Differentiation of Myelinated Axons at Nodes of Ranvier. *Nature*; 4: 968-980.

Prut L y Belzung C. 2003.The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol.* 463:3-3.

Quarles R, Mcklin W, Morel P. 2006. Myelin formation, structure and biochemistry. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects* Published by Elsevier, capítulo 4.

Rangaraju S, Hankins D, Madorsky I, Madorsky E, Lee WH, Carter CS, Leeuwenburgh C, Notterpek L. 2008. Molecular architecture of myelinated peripheral nerves is supported by calorie restriction with aging. *Aging Cell.* 8(2):178-91.

Rios JC, Melendez-Vasquez CV, Einheber S, Lustig M, Grumet M, Hemperly J, Peles E, Salzer JL. 2000. Contactin associated protein (Caspr) and contactin form a complex that is targeted to the paranodal junctions during myelination. *J Neurosci.* 15;20(22):8354-64.

Roa BB, Garcia CA, Suter U. 1993. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. Association with a spontaneous point mutation in the PMP22 gene. *N Engl J Med* 329, 96101.

Rosso G. 2008. Estudio molecular y morfométrico en Sistema Nervioso Periférico proveniente de pacientes portadores de la neuropatía de origen genético Charcot-Marie-Tooth. Tesis de Grado.

Rosso G, Cal K, Canclini L, Damián JP, Ruiz P, Rodríguez H, Sotelo JR, Vazquez C, Kun A. 2010. Early phenotypical diagnoses in Trembler-J mice model. *J Neurosci Methods.* 190(1):14-9.

Rustay NR, Wahlsten D, Crabbe JC. 2003. Influence of task parameters on rotarod performance and sensitivity to ethanol in mice. *Behav Brain Res.* 15;141(2):237-49.

Ryan MC, Shooter EM, Notterpek L. 2002. Aggresome formation in neuropathy models based on peripheral myelin protein 22 mutations. *Neurobiol Dis.* 10(2):109-18.

Salzer JL. 1997. Clustering sodium channels at the node of Ranvier: Close encounters of the axon-glia kind. *Neuron* 18:843-846.

Salzer JL. 2003. Polarized Domains of Myelinated Axons, *Neuron*, 40: 297-318.

Salzer JL, Brophy PJ, Peles E. 2008. Molecular Domains of Myelinated Axons in the Peripheral Nervous System. *Glia* 56:1532-1540.

Scherer SS, Arroyo EJ. 2002. Recent progress on the molecular organization of myelinated axons. *J. Periph. Nerv. Sys.* 7:1-12.

Schneider C, King RM, Philipson L. 1988. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell.* 54:787-793.

Schultz LA, Lore RK. 1993. Communal reproductive success in rats (*Rattus norvegicus*): effects of group composition and prior social experience. *J Comp Psychol.* 107(2):216-22.

Selman C, Korhonen TK, Bünger L, Hill WG, Speakman JR. 2001. Thermoregulatory responses of two mouse *Mus musculus* strains selectively bred for high and low food intake. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology.* 171(8):661-668.

Sereda M, Griffiths I, Puhlhofer A, Stewart H, Rossner MJ, Zimmerman F, Magyar JP, Schneider A, Hund E, Meinck HM, Suter U, Nave KA. 1996. A transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron*. 16:1049–1060.

Sereda MW, Nave KA. 2006. Animal Models of Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A. *NeuroMolecular Medicine*; 8: 205-215.

Sharma S, Kaur G. 2007. Intermittent dietary restriction as a practical intervention in aging. *Ann N Y Acad Sci*. 1114:419-27.

Sidman RL, Cowen JS, Eicher EM. 1979. Inherited muscle and nerve diseases in mice: a tabulation with commentary. *Annals of the New York Academy of Sciences* 317, 497±505.

Simons M, Trotter J. 2007. Wrapping it up: the cell biology of myelination, *Current Opinion in Neurobiology*, 17(5): 533-540.

Skre H. 1974. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *ClinGenet*, 6, 98-118.

Smith GP. 2000. The Controls of Eating: A Shift From Nutritional Homeostasis to Behavioral Neuroscience. *Nutrition*. 16:814-820.

Snipes GJ, Suter U, Welcher AA, Shooter EM. 1992. Characterization of anovel peripheral nervous system myelin protein (PMP-22/SR13). *JCell Biol*; 117:225–38.

Snipes GJ, Suter U, Shooter EM. 1993. Human peripheral myelin protein-22 carries the L2/HNK-I carbohydrate adhesion epitope. *Journal of Neurochemistry*. 61(5):19614.

Snipes GJ, Suter U. 1995. Molecular anatomy and genetics of myelin proteins in the peripheral nervous system. *J Anat*. 186 (Pt 3):483-94.

Snipes GJ, Suter U. 1995. Molecular basis of common hereditary motor and sensory neuropathies in humans and in mouse models. *Brain Pathol*. 5(3):233-47.

Spreyer P, Kuhn G, Hanemann CO, Gillen C, Schaal H, Kuhn R, Lemke GE, Muller HW. 1991. Axon-regulated expression of a Schwann cell transcript that is homologous to a "growth-arrest-specific" gene. *EMBO J.*, 10, 3661-3668.

Steinkraus KA, Smith ED, Davis C, Carr D, Pendergrass WR, Sutphin GL, Kennedy BK, Kaerberlein M. 2008. Dietary restriction suppresses proteotoxicity and enhances longevity by an hsf-1-dependent mechanism in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*. 7:394–404.

Suter U, Welcher A, Özcelik T, Snipes GJ, Kosaras B, Francke U, Billings-Gagliardi S, Sidman RL, Shooter EM. 1992. Trembler mouse carries a point mutation in a myelin gene. *Nature* 356: 241-244

Suter U, Moskow JJ, Welcher AA, Snipes GJ, Kosaras B, Sidman RL, Buchberg AM, Shooter EM. 1992. A leucine-to-proline mutation in the putative first

transmembrane domain of the 22-kDa peripheral myelin protein in the trembler-J mouse. *Proc Natl Acad Sci.* 15;89(10):4382-6.

Suter U, Snipes GJ, Schoener-Scott R, Welcher A, Pareek S, Lupski JR, Murphy RA, Shooter EM, Patel PI. 1994. Regulation of Tissue-specific Expression of Alternative Peripheral Myelin Protein-22 (PM22) Gene Transcripts by Two Promoters. *The Journal of biological chemistry.* 269: 25795-25808.

Suter U, Snipes GJ. 1995. Molecular basis of common hereditary motor and sensory neuropathies in humans and in mouse models. *Brain Pathol.* Jul;5(3):233-47.

Suter U, Scherer S. 2003. Disease mechanisms in inherited neuropathies. *Nature Rev Neurosci* 4:714-726.

Suter U, Scherer S. 2003. Disease mechanisms in inherited neuropathies. *Nature Rev Neurosci* 4:714-726.

Tai H.-C, Schuman E. 2008. Ubiquitin, the proteasome and protein degradation in neuronal function and dysfunction. *Nature Rev. Neurosci.* 9, 826–838.

Tobler AR, Liu N, Mueller L, Shooter EM. 2002. Differential aggregation of the Trembler and Trembler-J mutants of peripheral myelin protein 22. *Proc Natl Acad Sci.* 99:483–488.

Tooth HH. 1886. The peroneal type of progressive muscular atrophy. London, H.K. Lewis & Co., Ltd.,

Trapp BD. 1990. The myelin-associated glycoprotein: location and potential functions. In: Colman D, Duncan I, Skoff R, editors. *Myelination and dysmyelination.* New York: The New York Academy of Sciences. pp 29–43.

Tzoumaka E, Tischler AC, Sangameswaran L, Eglén RM, Hunter JC, Novakovic SD. 2000. Differential distribution of the tetrodotoxin sensitive rPN4/NaCh6/Scn8a sodium channel in the nervous system. *J Neurosci Res.* 60(1):37-44.

Vabnick I, Shrager P. 1998. Ion channel redistribution and function during development of the myelinated axon. *J Neurobiol* 37:80–96.

Valentijn LJ, Baas F, Wolterman RA, Hoogendijk JE, van den Bosch NH, Zorn I, Gabreëls-Festen AW, de Visser M, Bolhuis PA. 1992. Identical point mutations of PMP-22 in Trembler-J mouse and Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet.* 2(4):288-91.

Vallat JM, Tazir M, Magdalaine C, Sturtz F, Grid D . 2005. Autosomal Recessive Charcot-Marie-Tooth diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 5: 363-370.

Varady KA, Hellerstein MK. 2007. Alternate-day fasting and chronic disease prevention: a review of human and animal trials. *Am J Clin Nutr.* 86(1):7-13.

Vonasek E, Mateu L, Luzzati V, Marquez G, Vargas R, Céspedes G, Cotúa M, Borges J. 2001. A reversible abnormal form of myelin: an X-ray scattering study of human sural and rat sciatic nerves. *Eur Biophys.* 30(1):11-6.

Webster H. 1993. Development of peripheral nerve fibers. *Peripheral Neuropathy*, 3rd Edn. WBSaunders, Philadelphia, pp. 243-66.

Welcher AA, Suter U, De Leon M, Snipes GJ, Shooter EM. 1991. Proc. Natl Acad. Sci. 88, 7195-7199.

Wohlgemuth SE, Julian D, Akin DE, Fried J, Toscano K, Leeuwenburgh C, Dunn WA. 2007. Autophagy in the heart and liver during normal aging and calorie restriction. *Rejuvenation Res.* 10:281-292.

Yin X, Crawford TO, Griffin JW, Tu P, Lee VM, Li C, Roder J, Trapp BD. 1998. Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. *J Neurosci* 18:1953-1962.

Zhou W, Goldin AL. 2004. Use-dependent potentiation of the Nav1.6 sodium channel. *Biophys J.* 87(6):3862-72.

Zoidl G, Blass-Kampmann S, D'urso D, Schmalenbach C, Muller HW. 1995. Retroviral-mediated gene transfer of the peripheral myelin protein PMP22 in Schwann cells: modulation of cell growth. *EMBO Journal* 14, 1122-1128.

Zoidl G, D'Urso D, Blass-Kampmann S, Schmalenbach C, Kuhn R, Müller HW. 1997. Influence of elevated expression of rat wild-type PMP22 and its mutant PMP22 Trembler on cell growth of NIH3T3 fibroblasts. *Cell Tissue Res* 287:459-470.

ANEXOS

ANEXO I. CUIDADO, MANTENIMIENTO Y OPTIMIZACIÓN DEL MANEJO ANIMAL.

Cuidado y mantenimiento.

Los roedores *TremblerJ* (B6. D2-PMP22 $\langle Tr-j \rangle / J$) que se utilizaron para el desarrollo de la tesis se obtuvieron de la colonia del IIBCE, la cual fue iniciada en 2008 con un grupo reducido de individuos obtenidos de la colonia original del Jackson Laboratory (Maine, USA). Una primera etapa de la tesis fue destinada al incremento del número de individuos de la colonia con el objetivo de conformar los diferentes grupos de experimentación planteados. Para ello se debieron optimizar las condiciones para el parto de las hembras.

Todos los ratones al momento del destete, eran registrados y numerados. El registro consistió en marcar a cada individuo mediante perforaciones en sus orejas con una pinza Hartmann (Fig. 1). Con este método se estableció un patrón de perforaciones que se correlaciona con valores numéricos (Fig. 2.1.1 b y c), permitiendo la identificación e individualización de los animales (De Luca et al., 1996; Cal K., 2009).

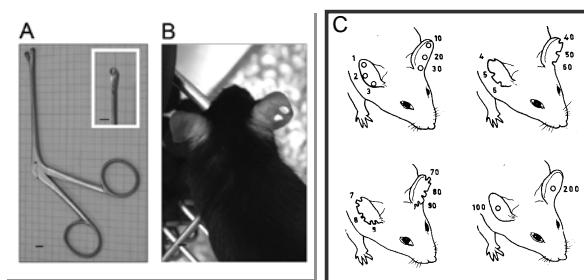


Figura 1. Identificación de cada ratón. A) Pinza Hartmann otorrinolaringológica utilizada para realizar las perforaciones en las orejas de los ratones. B) Vista dorsal de las perforaciones realizadas con la pinza Hartmann en la oreja derecha de un ratón para su identificación. C) Patrón de perforaciones para la identificación de ratones de laboratorio y sus correspondientes valores numéricos.

El fenotipo fue determinado a través de la utilización del Test de suspensión de la cola o MTST por su sigla en inglés Modified Tail Suspension, los fenotipos comportamentales

observados en la prueba son consistentes con el genotipo de cada animal, es decir, los ratones de tipo salvaje fueron capaces de extender completamente sus patas traseras con una apertura total por períodos temporales prolongados, en contraste con la imposibilidad de abducción y extensión de las patas posteriores a partir de P11 descritas en ratones *TrJ* (Rosso *et al.*, 2010) (Fig.2). Esta herramienta permitió inferir el genotipo de cada individuo.

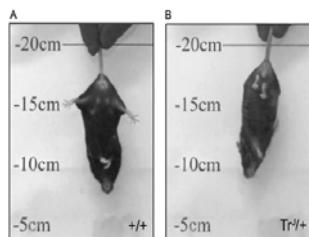


Fig.2. Test de suspensión de la cola. A través del Modified Tail Suspension Test (MTST) se infirió genotipo de cada ratón para formar grupos de experimentación (N=10). En el MTST, cada ratón se sostuvo desde el cuarto final de la cola durante 20 segundos. En los ratones *+/+* (A) se observa la extensión completa de extremidades posteriores mientras que los ratones de genotipo *TrJ/+* (B) son incapaces de obtener ni mantener esta extensión. Foto extraída de Rosso *et al.*, 2010.

Optimización del manejo de la colonia *TrJ*.

En 2010 la colonia contaba con 40 integrantes. Al inicio del presente proyecto, a través de la observación y seguimiento de harenos, detectamos y diagnosticamos una serie de dificultades propias de nuestra cepa cuya superación, nos ha permitido realizar un manejo más adecuado del grupo de roedores.

La mayor dificultad detectada se centraba en la tasa de crecimiento y el envejecimiento de la colonia. Las crías de la colonia no sobrevivían a los primeros días de vida, principalmente por falta de cuidado parental y canibalismo por sus progenitoras.

A los efectos de mejorar la performance reproductiva, así como el porcentaje de destete de las madres, se instrumentaron los siguientes cambios:

- 1) se posicionó a las hembras en las cercanías del parto en ubicaciones de menor exposición y mayor aislamiento al ruido habitual del bioterio;
- 2) se colocó a las ratonas gestantes a término a razón de 2 madres por caja;
- 3) se implementó una ración con mayor contenido proteico (31.5), graso (19.8) y de fibra cruda (2.3) así como una menor cantidad de carbohidratos (38.4) (Hill's Pet Nutrition, Inc. ®/™, Science Canine Growth), respecto de la dieta de mantenimiento (Hill's Pet Nutrition, Inc. ®/™, Science Original).

La estrategia de situar en pares a las hembras próximas al parto provocó un aumento en el cuidado maternal entre ambas madres. Las hembras a término armaban nidos previos

al parto y en ellos se depositaban las crías de ambas madres, trataban de mantener a las crías constantemente en este último y si eran movidas, se las volvía a posicionar en él. El cuidado era compartido, en algunos casos ambas madres amamantaban, en otros se observaba que solo una alimentaba a toda la camada. El cambio en la dieta, tuvo una incidencia también significativa. Se observó luego de estos cambios, una clara disminución del canibalismo y un aumento notorio del porcentaje de sobrevivencia de las crías, así como crías con mejor aspecto (pelaje más brillante). Al mismo tiempo y con el transcurrir del tiempo aumentaron la cantidad de crías por camada. La estrategia integral elegida resultó a muy corto plazo en la reversión de la situación inicial. La falta de individuos jóvenes constituía un factor limitante para el avance del proyecto, por lo que al superar estas dificultades se logró obtener un incremento sostenido del número de individuos que permitieron la realización de los distintos tratamientos. Al mismo tiempo se ha obtenido información y una muy valiosa experiencia, que integraremos al desarrollo de futuros proyectos de investigación.

Discusión.

El conocimiento de la colonia, obtenido a través de la experiencia en el manejo y manipulación, permitió sortear las dificultades iniciales que postergaron el comienzo de las tareas de experimentación. Estas se enfocaban principalmente en carencias en el cuidado maternal, en este sentido las alteraciones naturales en la atención materna se encuentran comúnmente asociadas a la capacidad de respuesta frente al stress, a las alteraciones de comportamiento social y a la capacidad de reconocimiento de la crías. Las consecuencias de alteraciones en el cuidado materno pre y postnatal son sus efectos epigenéticos, los cuales pueden llegar a alterar el desarrollo de las crías así como los futuros fenotipos conductuales de los adultos (Champagne *et al.*, 2007). Al comienzo de esta tesis un aspecto preocupante lo constituía el alto porcentaje de mortandad presente en las crías y el bajo cuidado materno que prestaban las madres de nuestra colonia. Esta situación no solo afectaba al comienzo la formación de grupos de experimentación, sino que también nos planteaba un problema mayor a la hora de evaluar las consecuencias de los tratamientos a través de análisis comportamentales, los cuales podrían estar alterados por los efectos del bajo cuidado materno. Al mismo tiempo, a largo plazo se presentaba un posible inconveniente relacionado con la

persistencia de nuestra colonia. El hallazgo de la estrategia de situar en pares a las hembras próximas al parto potenció el cuidado maternal entre ambas madres, con el costo indirecto de la introducción de cierto grado de incertidumbre en la determinación exacta del linaje de cada individuo que hasta el momento había sido registrado. Este acierto en la modificación en el sistema de parto permitió comprender un aspecto novedoso del comportamiento maternal de nuestra cepa e identificar cierta carencia en el cuidado maternal de hembras gestantes a término, hasta el momento no analizada ni considerada por nuestro grupo de trabajo. La significancia funcional del nido comunal (término comúnmente empleado para este sistema de parto) no es completamente comprendida. Este concepto implica la distribución de las responsabilidades parentales entre varias madres de una caja de madres. Las hembras que participan en estos comportamientos cuidan los nidos como en una comunidad sin hacer distinciones entre las distintas crías. El incremento en la supervivencia estaría dado por la anidación comunal y no se han hallado ventajas nutricionales en las crías creciendo bajo este sistema. Se sugiere que el cuidado comunal es una consecuencia inevitable del nido comunal. Si bien esta conducta es rara en los mamíferos, no lo es en roedores y la hipótesis que plantea que la anidación comunal provee protección y disminuye el infanticidio de individuos co-específicos ha sido avalado por poblaciones de *Mus musculus* domésticos (Manning *et al.*, 1995). Dos grupos de hipótesis no excluyentes son empleadas comúnmente para explicar la ocurrencia de la anidación comunitaria en roedores. Unas plantean restricciones ecológicas y otras beneficios de la filopatría (Hayes, 2000). Los efectos hallados en nuestra cepa, hacen acuerdo con una disminución en el infanticidio y un mayor cuidado maternal.

Creemos que la observación de crías con mejor pelaje y aspecto general, no solo se debió a la modificación en el sistema de parto, también se correspondió con las modificaciones en la dieta, alteración que consideramos tuvo una incidencia relevante en el estado de las nuevas crías y madres en gestación. Si bien la anidación comunal podría haber aumentado el infanticidio (Schultz y Lore, 1993), esto no ocurrió y de hecho si ocurrió una disminución en este comportamiento con respecto a la situación anterior en nuestro laboratorio. Uno de los principales causantes del canibalismo materno lo constituye el estrés, este último es inducido por factores físicos como el ruido excesivo, la brusca manipulación y limpieza de la cama así como frecuentes

cambios o movimiento de las mismas. Al mismo tiempo, el estrés nutricional, causado por la escasez de agua o alimentos, como por una dieta inadecuada, causan también este comportamiento (Lane-Petter, 1968). Una posible explicación a este comportamiento es una explicación adaptativa que plantea que si la madre percibe un ambiente demasiado hostil para la supervivencia de las crías, estas podrían dejar de cuidarlas y recuperar parte de su inversión energética mediante la ingestión de sus crías. Al mismo tiempo, las hembras que son sometidas a pequeñas proporciones proteicas en su dieta, tienden a tener hijos de más lento crecimiento y con un destete retardado en relación a las crías de madres que se alimentan con los niveles proteicos adecuados. Algunas de estas madres malnutridas frecuentemente cometen infanticidio durante el período de destete (Babicky y Novakova, 1986). Hembras alimentadas con una dieta vegetariana son más propensas a ser caníbales con sus crías que las hembras alimentadas con una dieta omnívora. El mismo patrón es observado en madres con deficiencias vitamínicas, asociados con el infanticidio y el canibalismo (Carlson y Hoelzel, 1948). Consideramos que las hembras gestantes de nuestra cepa presentaban una mayor exigencia proteica, la cual no era cubierta por la ración de mantenimiento utilizada en la alimentación de la colonia. La implementación de una dieta con mayor contenido proteico, ración de gestación, alivió los efectos de este déficit. Este hecho sumado a una posible disminución del estrés por las nuevas posiciones y cuidados, logrados por un mejor manejo y el nuevo sistema de parto, lograron su cometido e incrementaron la tasa de supervivencia de las crías y el consecuente crecimiento de la colonia. Estos hallazgos han constituido datos de suma importancia en el conocimiento de nuestro modelo de experimentación. El diagnóstico de estas características propias de nuestra cepa, nos han permitido ponernos en conocimiento de nuestras condiciones de trabajo “reales” actuales y trabajar siendo conscientes de ellas, así como tender a contrarrestar sus causantes.

ANEXO II- INDIVIDUOS NUMERADOS EN LOS DISTINTOS TRATAMIENTOS.

Los grupos de individuos Control (AL) (1) y AI (2) se conformaron por 10 individuos. El grupo de Restricción Calórica (3) se formó con 8 individuos. Todos ellos fueron numerados e individualizados. En la tabla siguiente se detalla el momento en que se comenzó y finalizó el tratamiento.

(1)	<p>142 (Nacido 17/04/2010- Entra 24/06/2010- Termina 31/12/2010)</p> <p>166 (Nacido 28/06-02/07/2010- Entra 04/09/2010- Termina 09/03/2011)</p> <p>155 (Nacido 28/06-02/07/2010- Entra 04/09/2010- Termina 09/03/2011)</p> <p>156 (Nacido 28/06-02/07/2010- Entra 04/09/2010- Termina 09/03/2011)</p> <p>180 (Nacido 25/07/2010- Entra 02/10/2010- Termina 06/04/2011)</p>	<i>TrJ</i>	<p>146 (Nacido 18/05/2010- Entra 24/07/2010 -Termina 28/01/2010)</p> <p>132 (desde el 4to mes)(Nacido 12/03/2010- Entra 9/05/2010-Termina 13/11/2010)</p> <p>148 (Nacido 17-20/06/2010- Entra 15/08/2010-Termina 19/02/2011)</p> <p>150(Nacido 17-20/06/2010- Entra 15/08/2010 -Termina 19/02/2011)</p> <p>27 (Nacido 28/08/2010- Entra 24/10/2010-Termina 28/04/2011)</p>
(2)	<p>171 (Nacido 25/07/2010- Entra 02/10/2010- Termina 02/03/2011)</p> <p>173 (Nacido 25/07/2010- Entra 02/10/2010- Termina 02/03/2011)</p> <p>185 (Nacido 09/08/2010- Entra 16/10/2010- Termina 16/03/2011)</p> <p>186 (Nacido 09/08/2010- Entra 16/10/2010- Termina 16/03/2011)</p> <p>1 (Nacido 11-17/08/2010- Entra 18/10/2010- Termina 18/03/2011)</p>	<i>TrJ</i>	<p>170 (Nacido 25/07/2010- Entra 02/10/2010- Termina 02/03/2011)</p> <p>172 (Nacido 25/07/2010- Entra 02/10/2010- Termina 02/03/2011)</p> <p>4 (Nacido 11-17/08/2010- Entra 18/10/2010- Termina 18/03/2011)</p> <p>5 (Nacido 11-17/08/2010- Entra 18/10/2010- Termina 18/03/2011)</p> <p>14 (Nacido 15-16/08/2010- Entra 22/10/2010- Termina 22/03/2011)</p>
(3)	<p>76 (Nacido 14/11/2010 Entra 17/01/2011-Termina 17/06/2011)</p> <p>77 (Nacido 14/11/2010 Entra 17/01/2011-Termina 17/06/2011)</p> <p>78 (Nacido 14/11/2010 Entra 17/01/2011(semana 9) Termina 17/06/2011)</p> <p>80 (Nacido 14/11/2010 Entra 17/01/2011-Termina 17/06/2011)</p>	<i>TrJ</i>	<p>101 (Nacido 25/11/2010, Entra 24/01/2011-Termina 24/06/2011)</p> <p>102 (Nacido 18/11/2010, Entra 17/01/2011-Termina 17/06/2011)</p> <p>105 Nacido 18/11/2010, Entra 17/01/2011-Termina 17/06/2011)</p> <p>218 Nacido 26/02/2010 Entra 25/04/2011-Termina 25/09/2011)</p>

ANEXO III - CONSUMO SEMANAL *AL*.

Medias de consumo para individuos de ambos genotipos (*Wt* y *TrJ*) y media general de individuos alimentados *AL*. Se muestran también los resultados del Test t de Student (*pT*). Se consideran significativos valores de $p \leq 0.05$ (*) y también se señalan los valores no significativos se señalan como n.s.

SEMANAS	Media X (WT)	SEM	Media Y (HZ)	SEM	pT	Media General	SEM
9	3.091	0.070	2.606	0.134	0.003(*)	2.857	0.087
10	3.354	0.246	3.022	0.169	0.262(n.s)	3.171	0.145
11	2.764	0.208	2.982	0.161	0.387(n.s)	2.883	0.123
12	3.092	0.125	3.170	0.127	0.666(n.s)	3.128	0.088
13	2.974	0.106	3.029	0.284	0.861(n.s)	3.002	0.153
14	3.148	0.153	3.140	0.132	0.968(n.s)	3.144	0.099
15	3.114	0.243	3.007	0.085	0.674(n.s)	3.059	0.124
16	3.097	0.136	3.225	0.250	0.638(n.s)	3.165	0.132
17	3.192	0.304	3.236	0.090	0.888(n.s)	3.215	0.151
18	3.606	0.214	3.099	0.077	0.037(*)	3.361	0.123
19	2.913	0.154	3.039	0.210	0.632(n.s)	2.976	0.129
20	3.301	0.123	3.340	0.215	0.878(n.s)	3.322	0.126
21	3.382	0.144	2.793	0.097	0.005(*)	3.145	0.097
22	3.380	0.103	3.218	0.168	0.443(n.s)	3.291	0.103
23	3.192	0.099	3.181	0.171	0.956(n.s)	3.187	0.073
24	3.455	0.138	3.208	0.172	0.285(n.s)	3.322	0.117
25	3.250	0.122	3.124	0.105	0.439(n.s)	3.187	0.080
26	3.227	0.119	3.566	0.227	0.188(n.s)	3.390	0.127
27	3.207	0.131	3.529	0.199	0.192(n.s)	3.373	0.122
28	3.335	0.158	3.281	0.185	0.826(n.s)	3.307	0.120
29	3.152	0.210	3.021	0.140	0.603(n.s)	3.084	0.127
30	4.116	0.205	3.216	0.168	0.002(*)	3.692	0.151
31	3.418	0.174	3.260	0.185	0.549(n.s)	3.348	0.128
32	3.622	0.296	4.033	0.246	0.356(n.s)	3.915	0.196
33	3.198	0.184	3.488	0.256	0.393(n.s)	3.354	0.161

ANEXO IV- PESO CORPORAL *AL*.

Medias de Peso Corporal para individuos de ambos genotipos (*Wt* y *TrJ*) alimentados *AL*. Se muestran también los resultados del Test t de Student (*pT*). Se consideran significativos valores de $p \leq 0.05$ (*) y también se señalan los valores no significativos se señalan como n.s.

SEMANAS	Media X (<i>Wt</i>)	SEM	Media Y (<i>TrJ</i>)	SEM	Pt
9	23.96	0.376	21.42	0.237	0.001(*)
10	24.49	0.355	21.78	0.265	0.002(*)
11	24.88	0.485	22.69	0.406	0.004(*)
12	25.60	0.520	24.32	0.329	0.298(n.s)
13	26.38	0.332	22.10	1.119	0.006(*)
14	26.22	0.340	23.58	0.893	0.002(*)
15	25.09	0.939	24.11	0.324	0.282(n.s)
16	27.84	0.414	24.49	0.192	0.000(*)
17	27.93	0.462	24.03	0.238	0.000(*)
18	29.36	0.876	24.85	0.292	0.001(*)
19	29.96	0.789	25.23	0.403	0.001(*)
20	31.45	1.289	25.55	0.342	0.004(*)
21	31.67	1.435	25.76	0.481	0.005(*)
22	32.21	1.580	25.63	0.415	0.006(*)
23	32.04	1.353	25.77	0.694	0.004(*)
24	32.12	1.389	27.18	0.665	0.007(*)
25	32.47	1.564	25.98	0.055	0.004(*)
26	32.81	1.613	26.22	0.403	0.005(*)
27	32.26	1.809	27.20	0.591	0.026(*)
28	33.70	1.802	27.78	0.677	0.016(*)
29	33.14	1.523	26.65	0.749	0.004(*)
30	34.45	1.962	27.99	0.577	0.013(*)
31	34.03	1.872	26.97	0.419	0.007(*)
32	34.11	1.895	26.58	0.697	0.034(*)
33	34.53	1.734	26.68	0.824	0.025(*)

ANEXO V - CONSUMO SEMANAL EN AI.

Medias de consumo para individuos de ambos genotipos (*Wt* y *TrJ*) y media general en individuos bajo AI. Se muestran también los resultados del Test t de Student (pT). Se consideran significativos valores de $p \leq 0.05$ (*) y también se señalan los valores no significativos se señalan como n.s.

SEMANAS	Media X (WT)	SEM	Medias Y (TrJ)	SEM	pT	Media General	SEM
9	6.370	0.340	6.175	0.357	0.678(n.s)	6.240	0.188
10	4.694	0.356	5.474	0.389	0.157(n.s)	5.064	0.272
11	5.344	0.358	6.145	0.185	0.055(n.s)	5.763	0.211
12	6.055	0.491	5.883	0.207	0.751(n.s)	5.969	0.258
13	5.113	0.329	5.685	0.596	0.395(n.s)	5.443	0.353
14	5.080	0.192	6.286	0.250	0.001(*)	5.640	0.191
15	5.314	0.266	5.587	0.421	0.590(n.s)	5.450	0.245
16	5.481	0.234	5.534	0.147	0.843(n.s)	5.172	0.250
17	5.238	0.294	5.406	0.168	0.650(n.s)	5.312	0.179
18	5.627	0.172	5.764	0.360	0.746(n.s)	5.312	0.191
19	5.137	0.268	6.102	0.395	0.050(*)	5.550	0.246
20	5.018	0.387	6.130	0.163	0.021(*)	5.528	0.247
21	5.434	0.660	5.475	0.379	0.955(n.s)	5.459	0.341
22	4.438	0.320	5.193	0.506	0.199(n.s)	4.747	0.285
23	4.459	0.576	5.000	0.360	0.412(n.s)	4.789	0.310
24	5.084	0.617	6.836	0.315	0.033(*)	5.863	0.418
25	5.395	0.528	6.222	0.101	0.253(n.s)	5.713	0.307
26	3.180	0.182	4.706	0.564	0.094(n.s)	4.198	0.430
27	4.160	0.257	5.486	0.324	0.058(n.s)	4.823	0.245
28	5.813	0.393	5.708	0.214	0.814(n.s)	5.204	0.318
29	5.779	0.470	6.160	0.437	0.569(n.s)	5.948	0.319
30	5.170	0.380	5.287	0.117	0.772(n.s)	5.229	0.194
31	4.858	0.342	5.785	0.253	0.107(n.s)	5.167	0.270
32	5.257	0.201	5.490	0.353	0.579(n.s)	5.373	0.197
33	6.565	0.530	5.705	0.828	0.519(n.s)	6.135	0.483

ANEXO VI- PESO CORPORAL CONTROL EN AI.

Medias de Peso Corporal para individuos de ambos genotipos (Wt y *TrJ*) bajo AI. Se muestran también los resultados del Test t de Student (pT). Se consideran significativos valores de $p \leq 0.05$ (*) y también se señalan los valores no significativos se señalan como n.s.

SEMANA	Media X (WT)	SEM	Media Y (TrJ)	SEM	pT	Media General	SEM
9	23.53	1.28	22.62	1.03	0.59(n.s)	23.08	0.90
10	23.68	1.17	23.26	0.98	0.79(n.s)	23.47	0.83
11	24.99	0.82	23.26	0.98	0.36(n.s)	23.75	0.44
12	24.40	1.73	23.91	0.94	0.81(n.s)	24.15	1.22
13	25.38	1.17	24.39	1.59	0.68(n.s)	24.76	0.72
14	25.63	1.72	24.39	1.59	0.59(n.s)	25.01	1.09
15	26.28	2.25	24.55	1.32	0.50(n.s)	25.20	1.38
16	25.57	0.95	25.32	1.37	0.88(n.s)	25.46	0.71
17	25.81	1.26	25.41	1.07	0.82(n.s)	25.61	0.89
18	26.19	1.10	26.06	1.12	0.94(n.s)	26.12	0.78
19	26.19	1.10	26.06	1.12	0.94(n.s)	26.12	0.78
20	26.28	1.37	24.20	0.34	0.37(n.s)	25.58	1.12
21	27.40	2.18	26.08	1.31	0.60(n.s)	26.58	1.42
22	26.58	1.36	25.60	1.33	0.62(n.s)	26.09	0.96
23	26.19	1.77	27.42	1.01	0.54(n.s)	26.96	1.08
24	26.71	1.51	27.42	1.01	0.69(n.s)	27.06	0.95
25	26.71	1.51	25.24	0.96	0.48(n.s)	26.16	1.07
26	26.31	1.27	27.46	2.25	0.65(n.s)	26.69	1.04
27	28.71	1.86	27.23	1.10	0.49(n.s)	27.79	1.14
28	27.44	1.26	27.87	0.96	0.79(n.s)	27.66	0.89
29	27.44	1.26	27.87	0.96	0.79(n.s)	27.66	0.89
30	26.25	0.92	26.92	2.55	0.77(n.s)	26.47	0.75
31	28.18	2.48	27.88	2.03	0.93(n.s)	28.03	1.76
32	28.18	2.48	27.88	2.03	0.93(n.s)	28.03	1.76
33	28.20	2.78	28.50	1.97	0.94(n.s)	28.35	1.97

ANEXO VII - CONSUMO SEMANAL EN RC.

Medias de consumo para individuos de ambos genotipos (*Wt* y *TrJ*) bajo RC. Se consideran significativos valores de $p \leq 0.05$ (*) y también se señalan los valores no significativos se señalan como n.s.

SEMANA	Media X (Wt)	SEM	Media Y (TrJ)	SEM	pT
10	3.602	0.131	2.685	0.168	0.005(*)
11	3.180	0.113	2.302	0.144	0.003(*)
12	3.180	0.113	2.238	0.192	0.005(*)
13	3.180	0.113	2.238	0.192	0.005(*)
14	3.180	0.113	2.336	0.124	0.002(*)
15	2.694	0.224	1.755	0.056	0.007(*)
16	2.678	0.261	1.800	0.055	0.017(*)
17	2.713	0.278	1.815	0.034	0.018(*)
18	2.655	0.190	1.748	0.038	0.003(*)
19	2.139	0.181	1.501	0.060	0.016(*)
20	2.307	0.187	1.612	0.071	0.013(*)
21	1.997	0.164	1.390	0.070	0.014(*)
22	1.902	0.141	1.448	0.035	0.020(*)
23	1.885	0.080	1.431	0.045	0.003(*)
24	1.915	0.075	1.503	0.048	0.004(*)
25	1.820	0.049	1.452	0.044	0.001(*)
26	1.730	0.116	1.485	0.053	0.103(n.s)
27	1.592	0.045	1.334	0.066	0.018(*)
28	1.879	0.047	1.622	0.048	0.009(*)
29	1.702	0.037	1.498	0.055	0.022(*)
30	1.977	0.064	1.686	0.041	0.009(*)
31	1.684	0.038	1.490	0.103	0.126(n.s)
32	1.684	0.038	1.490	0.103	0.126(n.s)
33	1.684	0.038	1.490	0.103	0.126(n.s)

ANEXO VIII- PESO CORPORAL EN RC.

Medias de Peso Corporal para individuos de ambos genotipos (*Wt* y *TrJ*) bajo RC. Se consideran significativos valores de $p \leq 0.05$ (*) y también se señalan los valores no significativos se señalan como n.s.

SEMANA	Media X (Wt)	SEM	Media Y (TrJ)	SEM	pT
10	27.75	1.01	21.51	1.06	0.003(*)
11	27.66	0.98	20.52	1.18	0.002(*)
12	29.54	2.36	20.31	1.29	0.007(*)
13	26.62	1.66	18.03	1.31	0.004(*)
14	26.20	2.06	17.94	0.87	0.004(*)
15	25.72	2.14	16.78	0.95	0.004(*)
16	24.56	2.39	16.46	0.50	0.007(*)
17	25.73	2.63	17.00	0.71	0.009(*)
18	24.71	1.78	16.36	0.75	0.002(*)
19	24.90	2.11	16.81	0.42	0.004(*)
20	23.82	1.91	16.32	0.60	0.004(*)
21	22.43	1.90	15.47	0.33	0.006(*)
22	21.78	1.67	15.69	0.44	0.005(*)
23	20.67	1.12	14.91	0.34	0.003(*)
24	21.02	0.89	15.26	0.48	0.001(*)
25	22.17	0.87	16.60	0.62	0.001(*)
26	19.39	0.52	14.91	0.89	0.002(*)
27	19.98	1.59	16.52	0.73	0.002(*)
28	18.31	0.52	14.65	1.06	0.090(n.s)
29	18.83	0.47	15.81	0.72	0.011(*)
30	18.77	0.48	15.04	0.76	0.007(*)
31	19.55	0.64	15.84	0.30	0.005(*)
32	20.20	0.45	16.65	0.31	0.005(*)
33	20.20	0.45	16.65	0.31	0.002(*)

ANEXO IX- PERMANENCIA SOBRE LA BARRA GIRATORIA.

En la primera tabla se expresan las medias y SEM de tiempo de permanencia sobre Rotarod para cada genotipo y tratamiento. En la segunda tabla se expresan las comparaciones estadísticas mediante ANOVA de dos vías.

Tratamientos		T1	T2	T3	Media	SEM
AL	+/+	222	240	197	172	17.8
	+/+	181	130	138		
	+/+	222	240	196		
	+/+	133	130	30		
	+/TrJ	78	80	61	63	6.3
	+/TrJ	61	110	82		
	+/TrJ	74	31	22		
	+/TrJ	34	59	72		
+/TrJ	68	80	29			
Ayuno Intermitente	+/+	300	261	172	175	16.0
	+/+	193	241	236		
	+/+	170	116	102		
	+/+	169	115	103		
	+/+	190	135	120		
	+/TrJ	119	84	120	66	10.0
	+/TrJ	81	73	22		
	+/TrJ	59	61	5		
+/TrJ	60	71	13			
+/TrJ	134	60	27			
Restricción Calórica	+/+	102	100	300	211	28.4
	+/+	300	300	252		
	+/+	300	54	266		
	+/+	72	245	242		
	+/TrJ	43	122	57	104	16.5
	+/TrJ	44	91	15		
	+/TrJ	213	107	74		
	+/TrJ	155	174	152		

ANOVA de Dos Vías. Post Hoc Test (Turkey HSD test)						
	Wt/AL	TrJ/AL	Wt/AI	TrJ/AI	Wt/RC	TrJ/RC
Wt/AL		0.0166(*)	0.9999 (n.s)	0.0217 (*)	0.8114 (n.s)	0.3002(n.s)
TrJ/AL	0.0167 (*)		0.0081(*)	0.9999 (n.s)	0.0009 (n.s)	0.7420 (n.s)
Wt/AI	0.9999 (n.s)	0.0081(*)		0.0108 (*)	0.8251(n.s)	0.2138 (n.s)
TrJ/AI	0.0217 (*)	0.9999 (n.s)	0.0108 (*)		0.0012 (*)	0.8062 (n.s)
Wt/RC	0.8114 (n.s)	0.0009 (n.s)	0.8251 (n.s)	0.0012 (*)		0.0285 (*)
TrJ/RC	0.3002 (*)	0.7420 (n.s)	0.2138 (n.s)	0.2138 (n.s)	0.0285 (*)	

ANEXO X- PARÁMETROS LOCOMOTORES MEDIDOS EN CAMPO ABIERTO.

En la tabla se muestran las medias y desvíos de los parámetros de actividad horizontal medidos en el campo abierto numerados del 1 al 5.

		Wt			TrJ		
		AL	AI	RC	AL	AI	RC
Distancia Recorrida(1) (m)	Media	13,8	22,6	11,7	9,1	17,8	8,7
	Ds	2,22	4,19	3,76	3,43	2,89	4,04
Duracion en periferia(2) (seg)	Media	209	233	262	268	204	282
	Ds	29	33	26	37	52	26
Duracion Centro(3) (seg)	Media	7,4	13,6	5,5	5,9	24,9	1,7
	Ds	4,9	5,8	5,2	7,2	24,5	2,0
Duracion de movimiento al punto central(4) (seg)	Media	158	217	135	124	201	112
	Ds	24	26	37	39	15	50
Velocidad(5) (m/seg)	Media	0,05	0,08	0,04	0,03	0,06	0,03
	Ds	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

Análisis estadísticos a través del Test de Student de los parámetros de la tabla anterior, se consideraron como significativos $p \leq 0.05$. Las comparaciones de la Tabla A corresponden a comparaciones de genotipos dentro de cada tratamiento y la Tabla B muestra comparaciones de los genotipos entre los diferentes tratamientos.

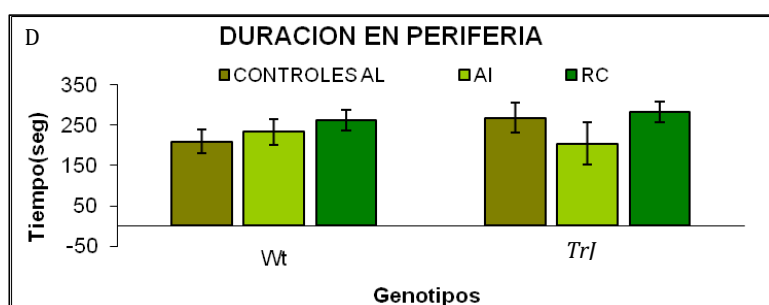
A	pT Test AL	pT Test AI	pT Test RC
1	0,011 (*)	0,066 (n.s)	0,358 (n.s)
2	0,021 (*)	0,322 (n.s)	0,258 (n.s)
3	0,745 (n.s)	0,343 (n.s)	0,286 (n.s)
4	0,111 (n.s)	0,272 (n.s)	0,508 (n.s)
5	0,011 (*)	0,066 (n.s)	0,358 (n.s)

B	Test de Student			
	Distancia Total		Velocidad Media	
	AL Wt	AL TrJ	AL Wt	AL TrJ
AI Wt	0.003 (*)	0.000 (*)	0.003(*)	0.000(*)
RC Wt	0.341 (n.s)	0.058 (n.s)	0.338 (n.s)	0.861 (n.s)
AI TrJ	0.040(*)	0.001(*)	0.041(*)	0.001(*)
RC TrJ	0.862 (n.s)	0.862 (n.s)	0.057 (n.s)	0.017(*)

ANEXO XI- DURACIÓN EN PERIFERIA Y ACTIVIDAD VERTICAL EN CAMPO

ABIERTO.

Al analizar la permanencia de los ratones en la periferia del campo, los ratones *Trembler J* en AL y RC permanecen más tiempo en esta área. Este patrón se revierte en los ratones con alimentación alternada (Gráfico 4.4.2D).



Gráficos 4.4.2 D. Duración en Periferia. En el gráfico se muestran las medias y desvíos de tiempo de duración en periferia para los individuos de todos los tratamientos y ambos genotipos. Los diferentes colores indican cada tratamiento. Las barras a la derecha corresponden a los ratones Wt y los de la izquierda a los *TrJ*.

Los parámetros de actividad vertical registrados brindan otro tipo de información, y en ellas se observan diferencias entre los distintos genotipos solo en los tratamientos AL en relación a la frecuencia de acicalamiento y el mantenerse parado sobre los miembros posteriores, definido como rearing ($p= 0.037$) (Fig. 4.4.2 f y g). Estas diferencias no se observan entre los genotipos de ratones con AI, volviendo a aparecer en los ratones de consumo calórico reducido, pero solo en relación al acicalamiento. Con referencia a las fecas no se notaron efectos genotípicos ni del tratamiento en su frecuencia.

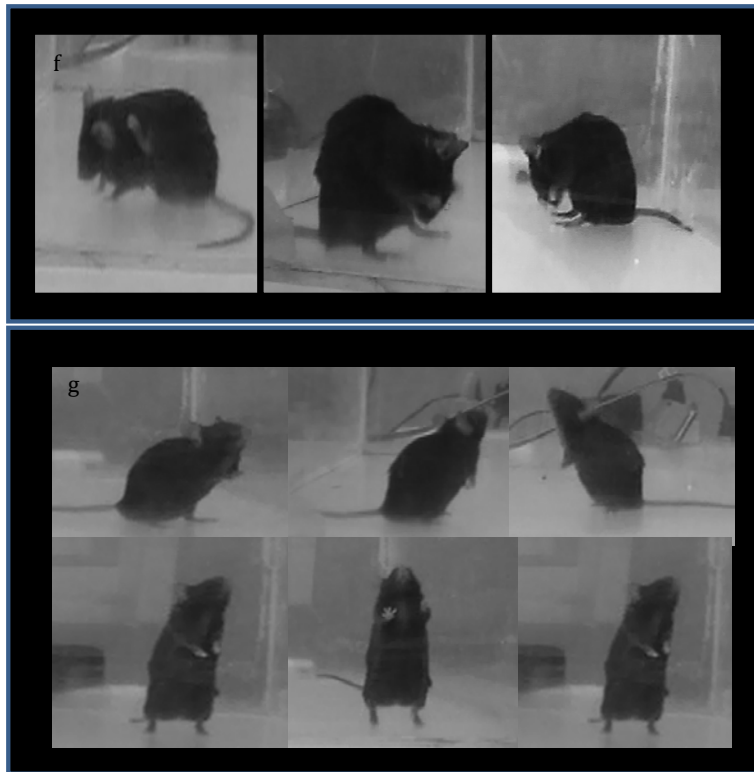


Figura 4.4.2 f y g. Parámetros de Actividad Vertical registrados en Campo Abierto. En las fotografías superiores (f) se ejemplifican los comportamientos que fueron registrados como acicalamientos y en las inferiores (g) se ejemplifican los rearings. Estas fotos fueron extraídas de las filmaciones de las pruebas de campo abierto realizadas por los individuos controles.

medianas y SRIC de los parámetros de actividad vertical medidos en el campo abierto numerados del 1 al 5.

		Wt			TrJ		
		AL	AI	RC	AL	AI	RC
Acicalamiento (a)	Mediana	3	4	1,5	26	5	5
	SRIC	1	4,5	1,75	6	4,5	15
Rearings (b)	Mediana	31	36	17,5	9	19	23
	SRIC	9,5	31,5	9,5	4	24	13,5
Fecas (c)	Mediana	2	3	0	2	3	0
	SRIC	3	2	0	3	4,5	1,5

Análisis estadísticos por U Mann-Whitney de los parámetros de la tabla anterior, se consideraron como significativos $p \leq 0.05$.

	UMW p AL	UMW p AI	UMW p RC
a	0,037(*)	0,46 (n.s)	0,027(*)
b	0,037(*)	0,34 (n.s)	0,8 (n.s)
c	0,88(n.s)	0,83 (n.s)	0,4 (n.s)

AGRADECIMIENTOS:

A UPM por la donación de papel de celulosa para las camas de los ratones.

Al Sr. Luis Inchausti por la fabricación de la barra giratoria.

A la ANII por financiar este proyecto de investigación.

A Lic. José Pedro Prieto por su ayuda y dedicación en el Campo Abierto.

A Héctor y los compañeros del bioterio por alimentar a los ratones cuando en mi ausencia o cansancio y mantenerme siempre al tanto de los inconvenientes que surgían.

A José Manuel Verdes por su colaboración.

A Aldo y Juan Pablo por su ayuda con la estadística.

A los miembros del tribunal por dedicarme prestarme su tiempo y sus correcciones.

A los compañeros de trabajo: Carlitos, Gonzalo, Carlos, Lucia, Kariana, Natalia, Matías, Andrés, Guillermo, Valeria que hacen que las tareas diarias sean más llevaderas y me ayudan con sus comentarios. En especial a aquellos que sufrieron conmigo el pesado continuo de la comida, que lo compartieron y hasta incluso se hicieron cargo en mi ausencia.

A Alejandra, por su gran paciencia y dedicación, y por contagiarme de su amor profundo a la investigación.

Al DPAN por abrirme sus puertas.

A mis amigos que compartieron parte o la totalidad de las horas de estudio a mi lado, de las horas de escribir, del aguante antes de los exámenes y después. Gracias por siempre apuntalarme y convencerme de que esto era lo mío.

A mis padres, Pablo y Lua que vivieron cada examen, presentación, seminarios, etc, etc, etc, a mi lado y compartieron siempre las alegrías y los fracasos.

A todos los que siempre me preguntan por los ratoncitos.

Mil Gracias!!!