



Estudio de la expresión de pmp22 en un modelo animal del Síndrome Charcot-Marie-Tooth.

Lic. Carlos Romeo

Tutor: Dr. Miguel Calero Lara

Co-Tutora: Dra. Alejandra Kun



INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
CLEMENTE ESTABLE



Tabla de abreviaturas

CMT –	Charcot Marie Tooth
CS –	Célula de Schwann
CSI -	Célula de Schwann Inmadura
E2F8-	Factor de inicio de la transcripción
EiF3E -	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E (Factor 3 de iniciación de la traducción eucariota sub-unidad E)
ERM –	Ezrina, Radexina y Moesina
ISL –	Insiura de Schimidt-Lantermann
MAG –	Myelin Associated Glyocoprotein (Glicoproteina Asociada a la Mielina)
MBP –	Myelin Binding Protein (Proteínas de Unión a la Mielina)
MEC –	Matriz ExtraCelular
MPZ –	Myelin Protein Zero (Proteína Mielinica Cero)
NF68 –	Neurofilamento 68
NHMS –	Nueropatías Hereditarias Motoras y Sensoriales
NR –	Nodo de Ranvier
PMP22 -	Peripheral Myelin Protein 22 (Proteína de la Mielina Periferica 22)
PsCS –	Precursor de Célula de Schwann
SN –	Sistema Nervioso
SNC –	Sistema Nervioso Central
SNP -	Sistema Nervioso Periférico
Tr –	Trembler
TrJ –	Trembler Jackson
VIM –	Vimentina

Resumen:

Dentro del heterogéneo grupo de las neuropatías hereditarias periféricas humanas del tipo Charcot-Marie-Tooth (CMT), las alteraciones en el gen codificante de la Proteína de Mielina Periférica 22 (PMP22) constituyen más del 50%. Las mutaciones puntuales en *pmp22* son agrupadas en el subtipo CMT1E. Dentro de ellas, la sustitución de una timina por una citosina en la posición 1703 en el gen *pmp22* produce un cambio de una leucina por una prolina en el aminoácido 16 de la proteína, en el primer dominio transmembrana de la proteína, que impiden su correcto plegamiento e inserción. Como consecuencia, la proteína se agrega y acumula en agregosomas perinucleares, produciendo una profunda alteración del tránsito intracelular. Los ratones Trembler-J son portadores de esta mutación y por esta razón se constituyen en un muy valioso modelo murino para el estudio de CMT1E.

Si bien la abundancia mayor de PMP22 es en la mielina, su presencia no es exclusiva de esta. Inicialmente *pmp22* fue descrito asociado al detenimiento del ciclo y diferenciación celular (fibroblastos); se encontró asociada a $\alpha 6$ - integrinas (endometrio); su ARNm fue descrito en neuronas centrales y en ganglios sensoriales periféricos y nuestro grupo ha reportado su presencia en núcleos de células de Schwann (ARNm y proteína).

Por lo tanto, la exploración y comprensión de los roles de *pmp22* en la patogenia del fenotipo neurodegenerativo CMT1E es un desafío por la diversidad y complejidad de las funciones hasta ahora descritas para este gen y su proteína.

En la presente Tesis exploramos la eventual regulación de la expresión génica modulada por PMP22, identificando alteraciones en el fenotipo neurodegenerativo Trembler-J. Para ello nos enfocamos en el *pmp22* junto a otros genes de importancia en el sistema nervioso periférico y relevantes en este fenotipo neurodegenerativo (*mag*, *mbp*, *vimentina*, *neurofilamentos*). Para la mayoría de los genes estudiados las diferencias se hallaron a nivel proteico teniendo la misma cantidad de mensajero, lo que nos lleva a pensar que ocurre una traducción diferencial en el genotipo Trembler-J respecto al wt.

Además, hemos explorado la expresión de un factor de inicio de la transcripción y otro de la traducción (*e2f8* y *eif3e*, respectivamente), para evaluar la modulación de estos procesos asociados al fenotipo neurodegenerativo Trembler-J, pero no hemos observado diferencias significativas entre genotipos. Conjuntamente evaluamos de forma indirecta el proceso traduccional a través de las señales ribosomales *in situ*, en los dominios gliales y axonales de la fibra nerviosa periférica y mediante su análisis por Western Blot. El genotipo Trembler-J mostró una distribución diferente e incrementada de esta señal en tanto que su análisis bioquímico demostró una diferente composición en proteínas ribosomales ácidas P.

Por otro lado sí hallamos un cambio a nivel transcripcional en el gen mitocondrial del citocromo B, en donde el genotipo Trembler-J mostró una marcada disminución de la expresión respecto al genotipo salvaje.

La principal modulación del fenotipo neurodegenerativo Trembler-J fue observada a nivel traduccional, aunque no descartamos la existencia de una más amplia modulación transcripcional, sólo hemos podido demostrarla para el gen del citocromo-B. Estos importantes hallazgos deberán ser profundizados, con la perspectiva de comprender a CMT1E como una patología que afecta la expresión de genes y no únicamente como un desorden estructural.

Tabla de Contenidos:

1.- Introducción:	1
1.a.- Unidad estructural y funcional del Sistema Nervioso Periférico (SNP) la fibra nerviosa:	1
1.a.1- Origen y desarrollo de las células gliales y fibras nerviosas del Sistema Nervioso Periférico de mamíferos:	2
1.a.2- La célula de Schwann madura:	3
1.a.3- Polaridad de la fibra nerviosa:	4
1.b.- Neuropatías y síndrome Charcot Marie Tooth	9
1.c.- Modelos animales de CMT1A y E:	13
1.d.- Otras funciones de PMP22:	14
2.- Hipótesis:	18
3.- Objetivos:	18
3.a.- Objetivo general:	18
3.b.- Objetivos específicos:	18
4.- Estrategia experimental:	20
5.- Metodología:	20
5.a.- Cuidado y mantenimiento de los animales:	20
5.b.- Disección de nervios ciáticos:	20
5.c.- Extracción de ARN y Retrotranscripción:	21
5.d.- PCR cuantitativo (QPCR):	22
5.e.- Fijación y preparación de nervios ciáticos para inmunohistoquímica:	25
5.f.- Inmunohistoquímica:	25
5.g.- Microscopía Confocal y cuantificación:	26
5.i.- Extracción de proteínas, SDS PAGE y WB de nervios ciáticos:	28
5.h.- Análisis Estadísticos:	29
5.j.- Análisis in silico de PMP22:	29
6.- Resultados:	30
6.a.- Cuantificación de mensajeros:	30
6.b.- Cuantificación y distribución de proteínas y ribosomas mediante IHQ:	32
6.c.- Cuantificación de proteínas mediante WB y SDS-PAGE:	37
7.- DISCUSIÓN:	42
8.- Conclusiones:	49
9.- Perspectivas:	49
10.- Referencias Bibliograficas:	51

1.- Introducción:

El Sistema Nervioso (SN) es una red de tejidos cuya unidad básica son las neuronas (Armati, 2007). Sus funciones primordiales son las de captar y procesar rápidamente las señales, ejerciendo control y coordinación sobre los demás órganos para lograr una adecuada interacción con el medio ambiente cambiante.

La clasificación principal divide al SN en: encéfalo y medula espinal que constituyen el SN Central (SNC), y los nervios periféricos que comunican estos centros con el resto del cuerpo y que constituyen el SN Periférico (SNP).

Dentro del sistema nervioso encontramos diferentes tipos celulares: neuronas, glías, tejido epitelial, conectivo, células madre y otros elementos celulares (Sergey & Richardson, 2001). Existen diferentes tipos de **neuronas**, las cuales se caracterizan por poseer un cuerpo celular y procesos neuríticos conocidos como dendritas y axones. Las **células gliales** (conocidas también genéricamente como **glía** o **neuroglía**) son células nodriza del sistema nervioso que desempeñan, de forma principal, la función de soporte mecánico, trófico y protección de las neuronas. En este trabajo haremos únicamente énfasis en las Células de Schwann (CS), por ser la glía presente en el SNP.

1.a.- Unidad estructural y funcional del Sistema Nervioso Periférico (SNP) la fibra nerviosa:

En el SNP, la **fibra nerviosa** esta compuesta por el axón y todas las células de Schwann (CS) que lo acompañan en su trayectoria, desde el cono de arranque hasta las proximidades de las terminales nerviosas. Las neuronas y las células gliales interactúan en el SNP, con una proporción significativamente mayor de glías que neuronas (Quintes *et al.*, 2010). Así, la **fibra nerviosa constituye una unidad estructural y funcional**, cuya

organización es esencial para la propagación del potencial de acción, la conducción saltatoria y la integridad funcional del axón (Salzer *et al.*, 2008; Simons & Trotter, 2007; Salzer, 2003). El desarrollo de la fibra requiere interacciones muy complejas (Simons & Trotter, 2007), hecho que se manifiesta cuando cualquiera de sus dos componentes se ven afectados, tal como describiremos más adelante.

1.a.1- Origen y desarrollo de las células gliales y fibras nerviosas del Sistema Nervioso Periférico de mamíferos:

En el SNP se da una temprana neurogenesis prenatal, seguida de una gliogenesis postnatal, para conformar la fibra nerviosa que es la unidad estructural y funcional del SNP (Pereira *et al.*, 2010).

Durante el desarrollo del SNP, las células de la cresta neural migran en dirección ventral para generar principalmente los ganglios sensoriales de la raíz dorsal y sus glías así como las neuronas y glías del SN autónomo. De estas células migratorias surgen los precursores de las CS (PsCS) y posteriormente las CS inmaduras (CSI). Ambas células transitorias presentan una dependencia paracrina con el axón, del cual dependen para la migración, supervivencia y proliferación. Esta dependencia asegura que las proporciones de CS y axones sean adecuadas para la formación de las futuras fibras nerviosas (Pereira *et al.*, 2010; Jessen & Mirsky, 2005). Mientras las CSI presentan esta dependencia, las neuronas que formarán los nervios periféricos se encuentran emitiendo prolongaciones axonales que buscan contactar sus tejidos blanco, para posteriormente inervarlos.

Continuando con el desarrollo de la CS, los PsCS pasan a ser CSI encerrando grupos de axones, momento en el cual, las CS ha adquirido la capacidad de auto-regular su supervivencia mediante la segregación autocrina de un grupo de factores de supervivencia (Meier *et al.*, 1999). Finalmente, cerca del nacimiento, las CSI pasarán a ser CS maduras. Aquellas CS que contactan grandes axones (>1 μm) se diferencian en CS

mielinizantes y las que contactan axones de pequeño calibre se diferencian en amielínicas formando los llamados “sacos de Remak” (Sherman & Brophy, 2005). El determinante de esta diferenciación parece ser la cantidad de **Neuroregulina 1 tipo III (NRG1-III)** expresada por el axón y no el diámetro axonal *per se* (Simons & Trotter, 2007). En el esquema de la Figura 1 se detallan las transiciones celulares que ocurren en desarrollo del linaje de las CS (Pereira *et al.*, 2010; Jessen & Mirsky, 2005).

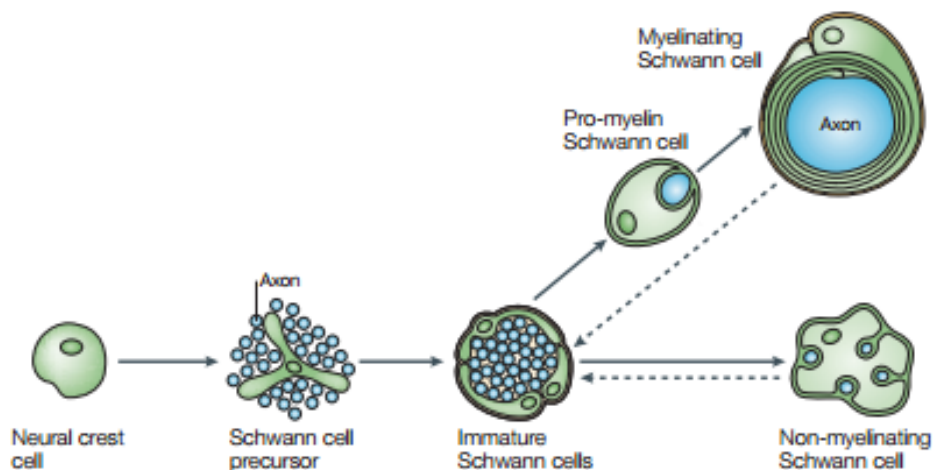


Figura 1. El linaje de las Célula de Schwann: Desde su desarrollo hasta su diferenciación, ocurren una sucesión de eventos celulares que determinan que las CS pasen por estados transicionales que incluyen: la transición de células madre migratorias de la cresta neural (**Neural crest cell**) hacia la formación de **PsCS**, la transición desde PsCS hacia la formación de **CS inmaduras** y finalmente, transición de CSI a CS maduras **pro-mielinizantes** o **no mielinizantes**. Imagen tomada de Jessen & Mirsky, 2005.

Cuando se da la unión entre CS pro-mielinizantes y axón, se activan cascadas moleculares que llevarán al comienzo de la mielinización. A través del proceso conocido como selección radial, previo a la mielinización, cada CS selecciona el axón que envainará, para establecer la **típica relación 1:1** de las CS maduras mielinizantes en el SNP (principal diferencia con la mielinización del SNC - Armati, 2007 ; Jessen & Mirsky, 2005). De esta manera, fibras nerviosas periféricas mielínicas presentan una CS para cada segmento internodal, pudiendo un axón periférico estar envainado por miles de CS a lo largo de su longitud.

1.a.2- La célula de Schwann madura:

En él SNP toda neurona se encuentra en íntimo contacto con las CS, tanto

sea sensorial, motora o autonómica, forme una fibra mielinica o amielínica (Armati, 2007). Existen evidencias cada vez mayores que apuntan a indicar funciones celulares específicas de las CS en relación con el axón, no relacionadas con la mielinización, (Lemke, 2001). El inicio de la mielinización, el número de vueltas y el mantenimiento de la organización compleja de las CS están controlados por el axón (Michailov *et al.*, 2004). De todas formas, algunos autores señalan que las CS podrían regular el diámetro axonal, a través de la modulación de los niveles de fosforilación de los neurofilamentos (Hsieh *et al.*, 1994) y la agrupación de los canales de iones en los nodos de Ranvier (NR) de los axones mielinizados (Poliak & Peles, 2003). La CS y la lámina basal están involucradas en la regeneración axonal y la orientación de los axones hacia sus destinos (Allodi *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2002; Son & Thompson, 1995). A su vez, las CS tienen la capacidad de interactuar con células por fuera del sistema nervioso, como se evidencia por su habilidad de comunicarse con células de sistema inmune (Armati & Pollard, 1996; Armati *et al.*, 1990).

1.a.3- Polaridad de la fibra nerviosa:

Las fibras nerviosas son extremadamente polarizadas, morfológica y molecularmente (Salzer *et al.*, 2008). La **polaridad longitudinal de la fibra nerviosa**, en la cual las CS contiguas se estructuran en torno al NR, flanqueándolo con las uniones paranodales, los juxtapanodos e internodo. Coincidente con esta polarización, una vez finalizada la mielinización, la membrana interna de la CS (adaxonal) y el axolema (membrana del axón) quedan en estrecho contacto y se organizan transversalmente, estableciendo una **polaridad radial**, donde la membrana glial externa está en contacto con la lámina basal y la matriz extracelular (MEC) y la interna con el axolema y el citoesqueleto submembranoso (Poliak & Peles, 2003; Salzer, 2003).

Los NR están cubiertos por interdigitaciones (microvillis) del citoplasma abaxonal de las CS (externo a la mielina). Los microvillis están enriquecidos

en el complejo de señalización ERM (Ezrin, Radixin y Moesin - Salzer *et al.*, 2008). Flanqueando los NR, en los **paranodos**, se hallan una serie de uniones axo-gliales especializadas que promueven la más estrecha adhesión en la fibra nerviosa, entre el axón y las CS, y constituyen una barrera a la difusión lateral de los canales iónicos nodales. Más allá de los paranodos, se encuentran los **juxtapanodos** que quedan debajo de la primera porción de mielina compacta. Por último llegamos al dominio más grande, comprendido entre dos juxtapanodos, el **internodo**, esta región mantiene un espacio periaxonal, de separación con la CS, uniforme, el cual esta alterado por ejemplo en las zonas donde los axones contactan con las incisuras de Schmidt - Lanterman (ISL). Allí se recapitulan los complejos proteicos presentes en paranodos y juxtapanodos (Peles & Salzer, 2000).

Cada dominio contiene un único conjunto de moléculas de adhesión entre las membranas de la CS y el axón. Estas moléculas de adhesión establecen contacto con el citoesqueleto submembranoso, mediante complejos proteicos, con lo que se da estabilidad a cada dominio (Fig.2) (Salzer *et al.*, 2008; Susuki & Rasband, 2008) .

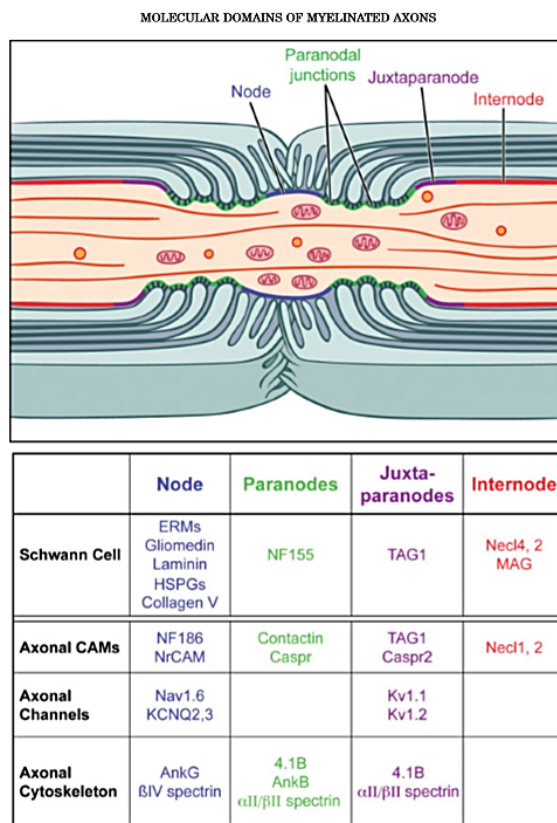


Figura 2. Organización y composición de los distintos dominios de las fibras mielínicas periféricas: Una sección longitudinal de la fibra nerviosa es esquemáticamente ilustrada en el panel superior, en ella se indica en azul la región nodal que es contactada por los microvilllis que provienen de las membranas externas de las CS, en verde las uniones entre los bucles paranodales y la membrana axonal a nivel del paranodo, en violeta el juxtapanodo y finalmente en naranja el internodo. El cuadro inferior, indica las principales proteínas de cada dominio que participan en el establecimiento de las uniones que mantienen estructurados los dominios, incluyendo los expresados por las CS, axón, citoesqueleto axonal y canales iónicos axonales. Imagen tomada de Salzer *et al.*, 2008.

Respecto de la **polaridad radial**, profundizaremos en ella en la región del internodo, donde las membranas plasmáticas de ambas células están separadas por una distancia constante (Oguievetskaia *et al.*, 2006). Si bien la identificación de las moléculas que participan en el ensamblaje de ambas membranas no es completa, **MAG** (glicoproteína asociada a mielina) ha sido una de las primeras proteínas descritas allí (Salzer *et al.*, 2008). Su función es actuar en la promoción de interacciones iniciales, uniendo la primera capa de mielina alrededor de los axones (mesaxón interno), actuando con diferentes componentes en el desarrollo ulterior de la mielina, encontrándose también en las ISL (Trapp, 1990). Ha sido también descrita la familia **Necl** de moléculas de adhesión (Necl, por su nombre en inglés Nectin like), las cuales presentarían roles claves en la relación axo-glial internodal, promoviendo la diferenciación y mielinización de CS, así como participando en la organización del internodo y las ISL (Sakisaka & Takai, 2004).

En sentido radial, luego del espacio entre axón – membrana adaxonal y citoplasma de la CS, sigue la región mielínica. Según el grado de compactación, la mielina puede ser dividida en dos subdominios: **mielina compacta y mielina laxa**. La primera región carece de citoplasma, su función es el aislamiento, inhibiendo completamente el intercambio de iones durante la conducción nerviosa. La composición proteica de la mielina principalmente es: proteína mielínica 0 (**MPZ**) (50%), proteínas de unión a la mielina (**MBPs**) (25%) y la proteína periférica de la mielina (**PMP22**) (5-7%), entre otras proteínas presentes en menor proporción (Salzer *et al.*, 2008). La glicoproteína MPZ es una proteína integral de membrana, cuyo rol es unir las láminas mielínicas adyacentes a intervalos espaciales regulares (Sherman *et al.*, 2003, Arroyo & Scherer., 2002). Las MBPs, se ubican en la cara citosólica de la membrana glial participando en la formación de la mielina y en la

reducción de la capacitancia del internodo (Sherman *et al.*, 2003, Arroyo & Scherer., 2002). Por último PMP22 es una pequeña glicoproteína integral de membrana (Mobley *et al.*, 2007), altamente hidrofóbica compuesta de 160 residuos aminoácidos, con una masa molecular de 22 kDa (Myers *et al.*, 2008) y un único sitio de N-glicosilación (Parmantier *et al.*, 1995) en el aminoácido Asn 41 (Taylor *et al.*, 2000; D'Urso & Müller, 1997). Los modelos tridimensionales propuestos plantean que PMP22 consta de 4 dominios transmembrana, dos bucles extracelulares, uno citoplasmático y sus extremos amino y carboxilo terminales están expuestos al citoplasma (Mobley *et al.*, 2007)(Fig 4). Se cree que el primer bucle extracelular mediaría interacciones de tipo homofílico y el segundo mediaría interacciones heterofílicas con MPZ (Hasse *et al.*, 2004.). Los modelos también plantean que PMP22 presenta mayormente una estructura en α -hélice con baja estabilidad termodinámica, que en estado nativo es propensa a agregarse (Tobler *et al.*, 2002; Snipes *et al.*, 1992). Del 70 - 80% de PMP22 neosintetizada es degradada rápidamente por el proteosoma, presumiblemente debido a su mal plegamiento (Yamada *et al.*, 2003; Notterpek *et al.*, 1999; Pareek *et al.*, 1997). Este comportamiento proteico afecta en especial a células metabólicamente activas, como las CS que son particularmente sensibles a la acumulación de proteínas dañadas (Rangaraju *et al.*, 2008). Las CS, parecieran lograr un equilibrio funcional en el cual participaría activamente la ruta de degradación proteasomal, permitiendo degradar el exceso de PMP22.

En la figura 3 se muestra la disposición de MPZ, MBP y PMP22 en la mielina compacta.

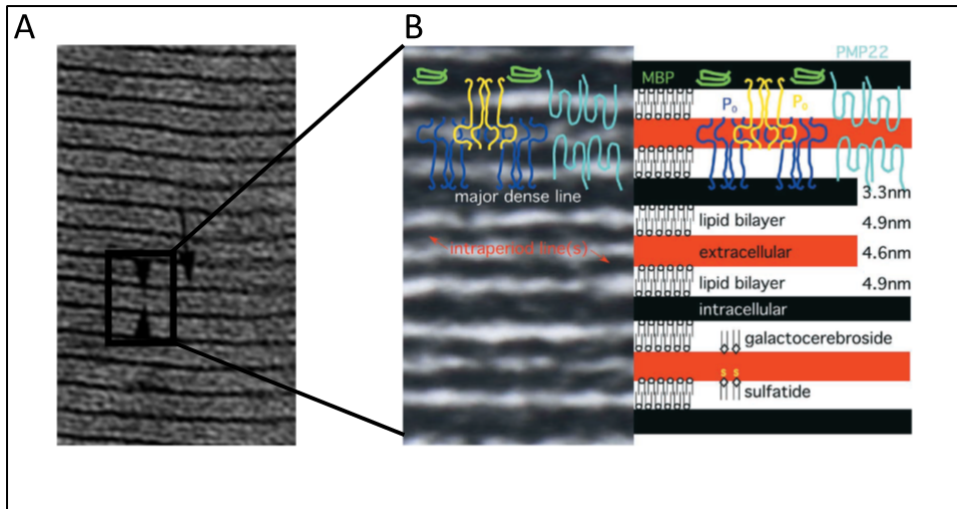


Figura 3. Estructura de la mielina y esquematización de su principal composición proteica: En la fotografía **A** se observa la típica alternancia entre las zonas electrondensas (señaladas con flechas) y traslúcidas (cabezas de flechas) de la mielina compacta. Imagen tomada de King R, 2013. En el panel izquierdo **B** se observa una microscopía electrónica de la mielina compacta a mayor aumento, donde se observan las láminas alternadas conocidas como intraperiodo (que es en realidad una doble lámina) y la línea densa principal. En el panel derecho **B** se observa como es la ubicación de las principales proteínas mielínicas: P0 formando tetrámeros, PMP22 formando dímeros y MBP monómeros. También se indican los glicolípidos galactocerebroside y sulfatide. Se indica además el grosor de las bicapas lipídicas, así como los espacios intra y extracelulares. Imagen tomada de Scherer & Arroyo, 2002.

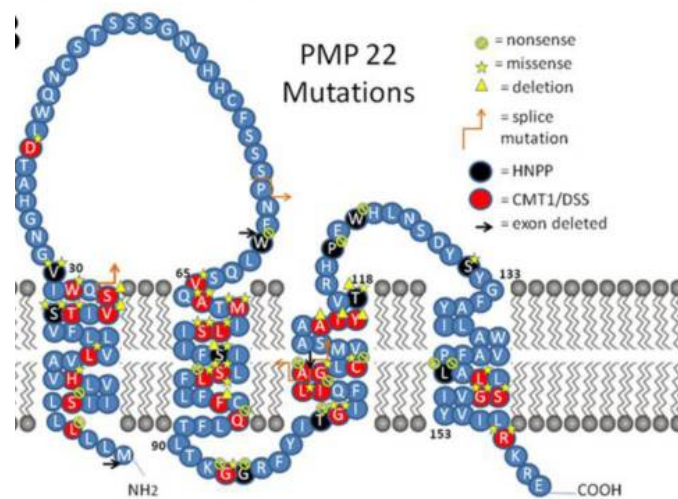


Figura 4. Modelización de PMP22: Se muestra una representación esquemática de la topología de la proteína donde se observan los dominios intra y extracelulares, así como los 4 dominios transmembrana. En ella se muestran además varias de las mutaciones que generan tanto CMT1A, CMT1E entre otras neuropatías causadas por alteraciones en PMP22. Figura tomada de Nave *et al.*, 2007.

Las regiones de mielina laxa contienen citoplasma entre sus láminas membranosas. Estas regiones están presentes en los **bucles paranodales**,

en ambos extremos de una misma CS, contiguos a las regiones nodales y en las **ISL, en las regiones nodales.**

La región abaxonal de la mielina está rodeada por una región de citoplasma, en la que frecuentemente se ubica el núcleo de la CS y que se encuentra en contacto con la membrana celular externa. Envolviendo la CS y la fibra nerviosa, se encuentra la **MEC**. Esta última consiste en una malla tridimensional, que rodea externamente a las fibras nerviosas (Bryan *et al.*, 2012). Está compuesta principalmente por proteínas y carbohidratos. En la fibra periférica, la lámina basal (capa de la MEC) es secretada principalmente por las CS maduras y está compuesta principalmente por colágeno del tipo IV, laminina, fibronectina y nidogenos (Bryan *et al.*, 2012). Por último, rodeando la lámina basal se encuentra una capa de tejido conectivo denominado endoneuro, que recubre cada fibra.

1.b.- Neuropatías y síndrome Charcot Marie Tooth

La comunicación entre las CS y las neuronas es crucial, cuando por diferentes causas (envejecimiento, cambios metabólicos agudos o crónicos, injurias puntuales o permanentes, mutaciones, etc), el equilibrio funcional y estructural axón-glía se altera, presentando consecuencias inmediatas, reflejándose en la responsabilidad integrada de ambos tipos celulares en el mantenimiento de la fibra nerviosa. Así, ambas células parecen compartir mecanismos de regulación que involucran y vinculan sus respuestas celulares (Niemann *et al.*, 2006; Maier *et al.*, 2002). Distintos fenotipos clínicos resultan de la perturbación de este equilibrio, como en el caso de muchas neuropatías hereditarias motoras y sensoriales (NHMS). Las NHMS constituyen un grupo de trastornos que difieren desde el punto de vista clínico y genético, incluyendo una amplia serie de síndromes que afectan CS y axones mielinizados del SNP (Suter & Scherer, 2003). Dentro de ellas se encuentra el heterogéneo grupo de Charcot-Marie-Tooth (CMT). CMT es causado por mutaciones genéticas expresadas en CS y neuronas, estando dividido en diferentes clases, dependiendo de si es principalmente

desmielinizante (CMT1, CMT3, CMT4) o axonal (CMT2) (Casasnovas *et al.*, 2008; Maier *et al.*, 2002).

CMT representa el 90 % de las NHMS diagnosticadas y afecta a 1 de cada 2500 personas (Vallat *et al.*, 2009). CMT se presenta entre la segunda y tercer década de vida, estando caracterizada clínicamente, por el debilitamiento progresivo de los músculos distales de las extremidades. Este debilitamiento puede causar deformidades características en manos y pies, como también una disminución en la sensibilidad (Patel & Lupski, 1994). Habitualmente, se hereda en forma autosómica dominante, aunque también existen formas recesivas y ligadas al cromosoma X (Russo *et al.*, 2011; Banchs *et al.*, 2009; Giambonini-Brugnoli *et al.*, 2005).

La neuropatía CMT1, se caracteriza por una disminución de la conducción del impulso nervioso y la presencia de “bulbos de cebolla” (una estructura que se visualiza en cortes transversales de nervios periféricos y que se asocia a la pérdida de compactación de la mielina, asociada con procesos continuos y alternados de demielinización y remielinización, así como de infiltración de macrófagos - Patel & Lupski, 1994). Otro cambio asociado a esta mielinopatía es, un aumento en la cantidad de mitocondrias en fibras periféricas desmielinizadas (Ravera *et al.*, 2013), coincidiendo con hallazgos previamente descritos en otras enfermedades desmielinizantes. El incremento en el número de mitocondrias, es considerado como un cambio adaptativo, para satisfacer requerimientos energéticos en las fibras periféricas desmielinizadas (Hogan *et al.*, 2009; Saporta *et al.*, 2009; Trapp & Nave 2008).

Las CMT1 y CMT2 son causadas por alteraciones en genes distintos. En las CMT1, se encuentran afectados genes que codifican para proteínas de la mielina, por lo que las CMT1 son consideradas mielinopatías, mientras que en las CMT2 se encuentran afectados genes que codifican para proteínas del citoesqueleto axonal, por lo que las CMT2 son consideradas axonopatías (Suter & Scherer, 2003). Con el avance en el conocimiento genético, se

identificaron 53 *loci* y 36 genes específicos relacionados con diferentes tipos de CMT, surgiendo así una clasificación más amplia de estas afecciones (en la Figura 5 se muestra una de las posibles clasificaciones de las CMT) (Bird, 2013).

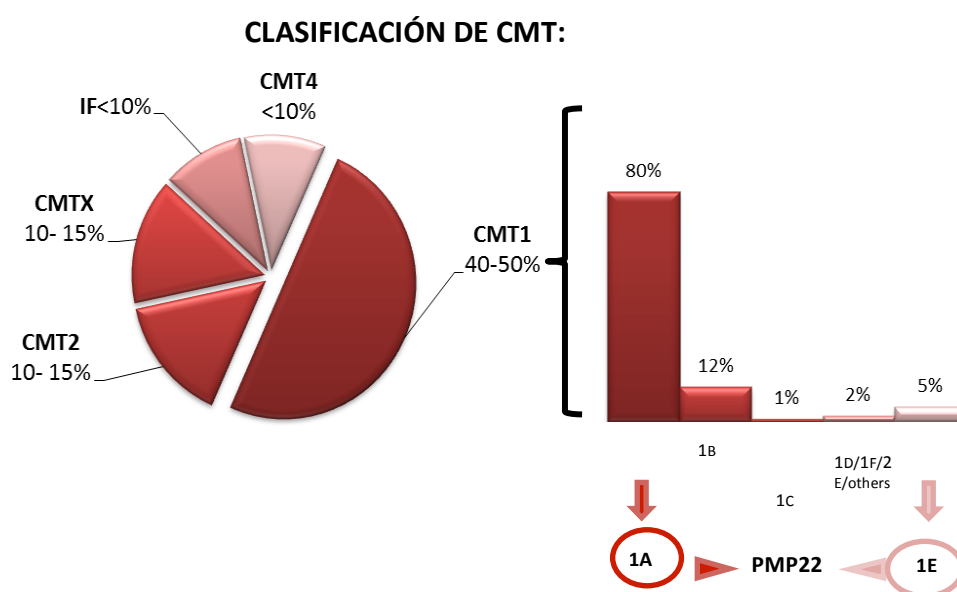


Figura 5. Clasificación de tipos de CMTs: extraída de NCBI Bookshelf Gene Reviews, Charcot-Marie-Tooth Hereditary Neuropathy, basada en patrones de herencia y genética molecular. Así, CMT1 se corresponde con anomalías mielínicas, CMT2 con axonopatías, IF o forma intermedia, incluye individuos con una combinación de axonopatía y mielinopatía, CMT4, puede ser axonopatía o mielinopatía, y CMTX es una axonopatía con cambios mielínicos secundarios. Dentro del grupo de las CMT1A, los 6 subtipos son clínicamente indistinguibles, diferenciándose únicamente en base a la alteración genética que lo provoca. Así, CMT1A y 1E son generadas por alteraciones genéticas en el gen de *PMP22*, CMT1B por mutaciones en *P0*, CMT1C por mutaciones en el liposacárido inducido por el TNF, CMT1D por la proteína 2(P2) de respuesta temprana al crecimiento y por último, CMT1F/2E por alteraciones en los neurofilamentos livianos. Datos tomados de Bird, 2013.

Dependiendo de los defectos moleculares que causan la CMT1, ésta puede a su vez ser clasificada en los subtipos CMT1A, B, C, D, E y F, siendo la CMT1A el subtipo más común de CMT1 en los países occidentales (Banchs *et al.*, 2009). Dentro de este grupo, las modificaciones en el gen de *pmp22* constituyen el 85% de las alteraciones observadas (Bird, 2013).

CMT1A es causado por una duplicación de un fragmento de 1.5 Mb en el brazo corto del cromosoma 17 (17p11), que incluye el gen *pmp22* en su totalidad (Valentijn *et al.*, 1992). Este desorden se caracteriza por una

disminución en la velocidad de conducción del impulso nervioso, generada por la demielinización axonal a intervalos a lo largo del internodo (desmielinización segmental) (Amici *et al.*, 2007).

Por otro lado, se ha encontrado que pacientes con fenotipo clínico CMT1A carecen de la duplicación de 1.5 Mb característica, pero presentan mutaciones puntuales en el gen *pmp22*, ocasionando sustituciones no conservativas en PMP22. Estas mutaciones puntuales tienen una frecuencia del 2 al 5% de los casos diagnosticados clínicamente como CMT1A (Banchs *et al.*, 2009), actualmente se los clasifica dentro de un nuevo subtipo, CMT1E (Bird, 2013; Li *et al.*, 2013).

Para poder explicar cómo ambas alteraciones (mutación y duplicación) son capaces de originar el fenotipo CMT, algunos autores han propuesto que ambos mecanismos podrían romper la estequiometría macromolecular de la membrana de la CS. El gen *pmp22*, que contiene estas mutaciones puntuales, podría constituir un alelo dominante que permite alterar la función de PMP22, incrementando los niveles de producto génico y de esta forma mimetizar el efecto de la duplicación (Roa *et al.*, 1993). Alternativamente, se ha propuesto que CMT1E posee un mecanismo de ganancia de función tóxica (Giambonini-Brugnoli *et al.*, 2005).

Las mutaciones conocidas en PMP22 incluyen: 44 sustituciones aminoacídicas provocadas por cambios de base, 14 deleciones, 2 inserciones, 1 translocación recíproca, varias mutaciones en sitios de empalme, así como sustituciones de una base en el exón1A no codificante y en la región 3'UTR (Bird, 2013). Dada la variabilidad fenotípica de los pacientes, el diagnóstico definitivo de CMT1E debe acompañarse del análisis genético de *PMP22*.

1.c.- Modelos animales de CMT1A y E:

En relación a las mutaciones en el gen *pmp22* que generan diversas neuropatías existen modelos específicos para cada una de las causantes genéticas, incluyendo duplicaciones, deleciones y mutaciones puntuales (Russo *et al.*, 2011).

Mucho de lo que se conoce de la patogénesis de CMT1E ha sido derivado del estudio de dos modelos murinos: Trembler (Tr) y Trembler Jackson (TrJ) (Suter *et al.*, 1992; Valentijn *et al.*, 1992). El modelo Tr fue descubierto en 1946 en el *Instituto de Genética Animal* de Edimburgo, ésta fue la primera cepa mutante de ratones encontrada. Estos ratones presentan una mutación puntual de carácter autosómico dominante (Suter *et al.*, 1992b), que afecta al cuarto dominio transmembrana de PMP22, en el cual se reemplaza una glicina en el sitio del residuo 150 por un ácido aspártico (G150D). En este artículo, se describe por primera vez la ubicación del gen de *pmp22* en el cromosoma 11 murino, el cual presenta regiones de síntena conservada con el cromosoma 17 humano (Buchberg *et al.*, 1989).

El mismo año, Suter describió la existencia de una segunda mutación espontánea presente en los ratones Trembler J de los *Laboratorios Jackson, en USA*. (Suter *et al.*, 1992). *TrJ* es una mutación puntual de carácter autosómico dominante, que afecta el primer dominio transmembrana de *PMP22*, en el cual se produce un reemplazo de una *leucina* por una *prolina* en el sitio del residuo 16 (L16P) (Baechner *et al.*, 1995 - Fig.6). Como consecuencia de esta mutación, se impide el plegamiento normal de la proteína y modifica su inserción en la membrana, afectando sus interacciones extra o intracelulares consigo misma, así como con otras moléculas (Quarles *et al.*, 2006; Suter *et al.*, 1992).

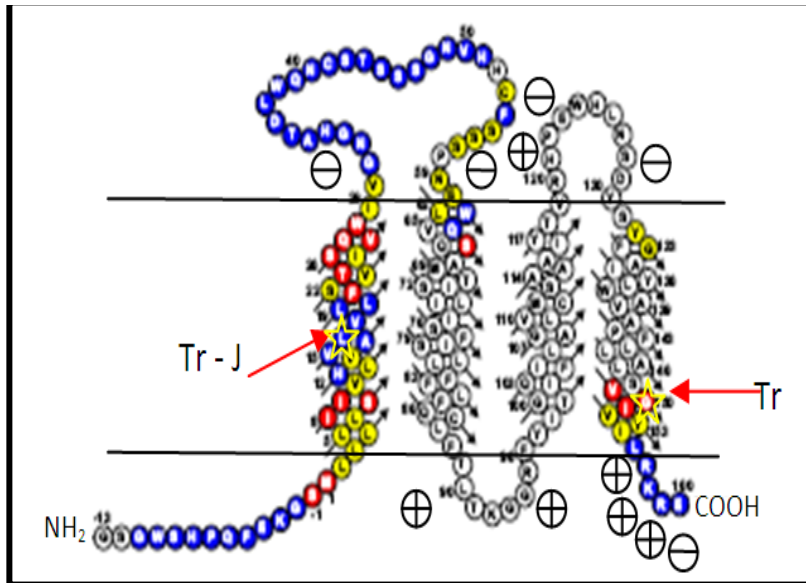


Figura 6. En código de una letra se muestra la secuencia aminoacídica de la PMP22 murina: Se indican con “+” o “-” las posiciones de los AA cargados a (pH neutro). Con flechas se indican las posiciones putativas de las mutaciones *Tr* y *TrJ*. El modelo está basado en ploteos hidrofóbicos de probabilidad de superficie y predicciones de estructura secundaria generados computacionalmente (Suter *et al.*, 1992b).

Los ratones *TrJ* presentan como características fenotípicas parálisis espástica y un temblor generalizado. Este modelo ha sido señalado en la literatura como un modelo válido para el estudio de neuropatías hereditarias periféricas, imitando características patológicas de los pacientes de CMT, exhibiendo una afección severa de la mielina y una disfunción del SNP muy similar a lo que se reporta en humanos nacidos con las mismas mutaciones (Fortun *et al.*, 2005 & 2007; Valentijn *et al.*, 1992). Estos ratones modelan además, el comportamiento y fenotipo histopatológico del trastorno, lo cual incluye la presencia de agregados citoplasmáticos de proteína (Notterpek & Tolwani, 1999).

1.d.- Otras funciones de PMP22:

Inicialmente, *pmp22* fue aislado de fibroblastos murinos NIH3T3 como un gen específico asociado a la detención del ciclo celular “*growth arrest-specific gene*” (*gas-3*) (Manfioletti *et al.*, 1990; Schneider *et al.*, 1988). Al deprivar a estas células de suero, la expresión de *pmp22* se veía incrementada (Manfioletti *et al.*, 1990; Schneider *et al.*, 1988). Homólogo al gen *gas3*, fue descrito el transcripto SR13, aislado del nervio de ratas cuya expresión disminuye en la fase aguda luego de una injuria. Así, *gas3/SR13* fue más

tarde caracterizado como un solo gen, cuya expresión origina PMP22 (Snipes *et al.*, 1992; Welcher *et al.*, 1992).

Tanto en humanos como en ratón, los transcritos de *PMP22* se expresan de forma ubicua durante los estadios embrionarios, incluso en el SN. En adultos, la expresión de *pmp22* es relativamente baja en el SNC, estando incrementado en núcleos motores de los nervios craneales y en las neuronas espinales, sin embargo los transcritos y la expresión de los mismos son abundantes en las CS de los nervios periféricos (Ohsawa *et al.*, 2006; Roux *et al.*, 2004; Jetten & Suter, 2000; van de Wetering *et al.*, 1999; Parmantier *et al.*, 1995).

La vida media de PMP22 en CS en cultivo es corta (aprox. de 30 a 60 minutos). Sin embargo, en nervios periféricos de ratas de edad avanzada, los niveles de ARNm de *pmp22* son marcadamente menores a los niveles de proteína, sugiriendo una tasa lenta de recambio en células mielinizantes (Pareek *et al.*, 1993). En CS en cultivo, PMP22 posee una localización predominantemente citoplasmática (Pareek *et al.*, 1993) y acúmulos en el aparato de Golgi (Pareek *et al.*, 1997), en contraste con la localización preferencial a nivel de membrana que tiene en nervios periféricos *in vivo* (Pareek *et al.*, 1993). Una posible explicación a estos hechos, es que la retención de PMP22 que se observa en CS en cultivo sea necesaria para su posterior direccionamiento hacia la membrana (Pareek *et al.*, 1997).

Si bien la mayor expresión ocurre en la CS, donde participa en la iniciación de la mielinización y se localiza luego en la mielina compacta cumpliendo un rol estructural, se han descrito diferentes roles para esta proteína no relacionados con la mielinización. Dentro de estos, se plantea un rol de PMP22 en la proliferación celular y la supervivencia (Baechner *et al.*, 1995; Schneider *et al.*, 1988). En dicho sentido, se ha observado que tanto la sobreexpresión como la represión de PMP22, influyen la proliferación con consecuencias que fluctúan en función del modelo utilizado (Li *et al.*, 2013). En cuanto a la relación de PMP22 con la supervivencia, se ha señalado que

alteraciones genéticas en el gen *PMP22* resultan en una apoptosis incrementada de CS en cultivo, lo cual implicaría su participación en las vías de señalización apoptóticas. El mecanismo por el cual *PMP22* estaría involucrado en la muerte celular es aún incierto y no sólo podría estar presente en las CS, sino que se plantean nuevas interrogantes en relación a qué rol juega *PMP22* en el balance arresto celular versus muerte (Li *et al.*, 2013; Attardi *et al.*, 2000).

PMP22, a diferencia de *MPZ*, la más abundante de las proteínas mielínicas periféricas (Snipes *et al.*, 1992) y *MAG* que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Lai *et al.*, 1987; Lemke *et al.*, 1988), pertenece a la superfamilia de las claudinas (pfam00822), encontrándose además de en el SNP, en zonula occludens, en epitelios de vasos sanguíneos, en la barrera hematonerviosa (*blood nerve barrier* en inglés) y hematoencefálica cerebro (Roux *et al.*, 2004). Algunos autores señalan su interacción con integrinas de membrana, lo que permitiría estabilizar la adhesión entre lámina basal y membrana mielínica (Itou *et al.*, 2009). En tejidos no neurales *PMP22* también se asocia a integrinas en la fase proliferativa uterina, interaccionando con $\alpha 6$ integrina en la unión a la lamina basal y el colágeno (Rao *et al.*, 2011). Otros roles la vinculan con procesos de apoptosis, extensión y forma celular (Chies *et al.*, 2003; Attardi *et al.*, 2000; Brancolini *et al.*, 2000), dependiente de su presencia en la membrana o de sitio de N-glicosilación, respectivamente (Attardi *et al.*, 2000; Brancolini *et al.*, 2000).

El patrón de expresión de *PMP22* varía a lo largo del desarrollo del SNP, siendo idéntico al de otras proteínas mielínicas periféricas como *MPZ* y *MBP* (Nave & Werner 2014; Stah *et al.*, 1990; Lees & Brostoff., 1984, Wiggins *et al.*, 1975). La expresión tanto del mensajero como de la proteína es apenas detectable en ratas recién nacidas, llegando a valores de la mitad de su expresión máxima entre los días 10 y 15, mostrando su máximo el día 21 post-nacimiento (Snipes *et al.*, 1992). Estos niveles de expresión se ven alterados cuando se desestabiliza la mielina, como resultado de una lesión, siendo menor en estadios iniciales y aumentando durante la regeneración

axonal (Snipes *et al.*, 1992; De Leon *et al.*, 1991; Spreyer *et al.*, 1991; Welcher *et al.*, 1991).

A su vez ha sido reportado que la sobre-expresión de PMP22, así como también la expresión de la forma mutante Trembler da lugar a cambios en la expresión génica (Giambonini-Brugnoli *et al.*, 2005; Vigo *et al.*, 2005), con una alta variabilidad según la alteración de PMP22 presente (Giambonini-Brugnoli *et al.*, 2005). Asimismo se ha reportado la presencia de la proteína en el núcleo (Figura 7 - Kun *et al.*, 2012). Sin embargo el único estudio que vincula PMP22 con alguna vía de transducción de señales, fue realizado para la proteína humana, mediante doble híbrido en levadura, y establece la interacción de PMP22 con un receptor miembro de la familia de los receptores similares a lectina de los linfocitos NK (KLRC1), utilizando este último como "*bait*" (Rolland *et al.*, 2014).

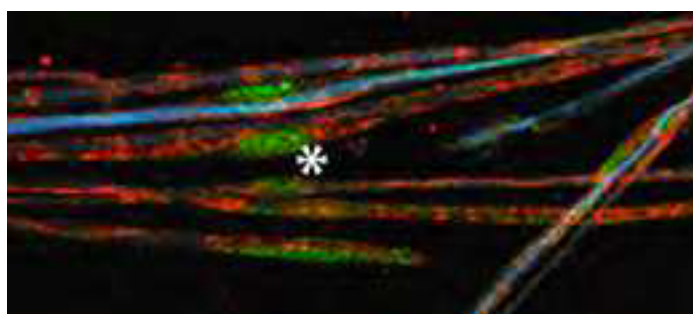


Figura 7. Presencia de PMP22 en el núcleo: Se aprecia un peinado de fibras nerviosas en donde en verde se identifica la proteína PMP22, la cual esta presente en el núcleo de la CS. Imagen tomada y modificada de Kun *et al.*, 2012.

Las evidencias descritas anteriormente en cuanto a la localización de PMP22 en el núcleo y cambios de expresión génica asociados a alteraciones en esta proteína, nos lleva a preguntarnos si la misma podría estar alterando la expresión de genes en la fibra nerviosa del modelo TrJ.

2.- Hipótesis:

En base a las funciones no clásicas de PMP22 y a su alta expresión en la CS, se plantea como hipótesis, que PMP22 podría estar jugando un rol en la regulación de la expresión génica en el SNP y en particular en la CS. Esto podría implicar diferencias en la regulación de la expresión génica entre los genotipos TrJ y Wt.

3.- Objetivos:

3.a.- Objetivo general:

Estimar el rol de PMP22 como eventual regulador génico, mediante la evaluación de la expresión de genes relevantes para la neuropatía CMT1E, a nivel transcripcional y traduccional, en ratones TrJ y wt.

3.b.- Objetivos específicos:

Se plantean los siguientes objetivos a realizarse a partir de muestras de nervio ciático de ratones de genotipo TrJ y wt:

1.- Cuantificar los niveles de expresión de los siguientes ARN mensajeros:

a.- ***pmp22*** por ser el gen alterado en el modelo murino TrJ.

b.- ***mag***, ***vim*** y ***mbp*** por estar alterados en neuropatías y poseer observaciones de nuestro grupo, que indican cambios en los niveles de las proteínas para las cuales codifican estos mensajeros (Kinter *et al.*, 2013; Rangaraju *et al.*, 2008; Adlkofer *et al.*, 1997).

c.- ***Cytb*** por tratarse de un gen mitocondrial codificado en el cromosoma mitocondrial, el cual podría darnos una medida indirecta respecto a las mitocondrias., ya que según la literatura hay un aumento en la cantidad de mitocondrias en las neuropatías (Ravera *et al.*, 2013).

d.- ***E2f8*** y ***Eif3e*** por ser respectivamente, factores de inicio de la transcripción y traducción, que nos podrían dar información de forma indirecta acerca de estos procesos (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q58FA4> ; <http://www.uniprot.org/uniprot/P60228>).

2.- Cuantificar los niveles de expresión de las siguientes proteínas:

a.- **PMP22** por ser la proteína alterada en el modelo murino TrJ, de la cual esta descrita una diferente distribución, pero no niveles totales (Notterpek *et al.*, 1999).

b.- **MAG, VIM y NF68**, por estar alterados en otras mielinopatías y poseer observaciones que indican cambios en los niveles de estas proteínas (Kinter *et al.*, 2013; Rangaraju *et al.*, 2008; Hsieh *et al.*, 1994).

3.-Analizar y evaluar la cantidad y distribución de ribosomas en la fibra nerviosa, ya que se sabe que los mismos están alterados en neuropatías (Verheijen *et al.*, 2011 & 2014).

4.- Realizar estudios *in-silico* de presencia de dominios proteicos conservados en PMP22, con el fin de identificar predicciones de dominios posiblemente involucrados en la regulación génica.

4.- Estrategia experimental:

Nuestra estrategia experimental consistió en la cuantificación de ARN mensajeros y proteínas específicas, en nervios ciáticos TrJ (CMT1E) y wt, en todos los casos se utilizaron machos jóvenes (entre 2 y 4 meses de edad). Los análisis se realizaron utilizando abordajes moleculares, qPCR, microscopía confocal cuantitativa y WB. Conjuntamente se realizó un análisis *in silico* de PMP22.

5.- Metodología:

5.a.- Cuidado y mantenimiento de los animales:

Para la realización de esta tesis se utilizaron ratones de la colonia TrJ (B6.D2-Pmp22<Tr-J>/J) (Jackson Lab., USA) de genotipo salvaje Wt y heterocigota TrJ para la mutación puntual L16P asociada con el gen *pmp22*. Todos los ratones de la colonia fueron identificados mediante numeración y genotipado siguiendo los criterios establecidos en Rosso *et al.*, 2010. El mantenimiento de la colonia así como la eutanasia de los ratones fue realizado en estricto acuerdo con las normas del Comité de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) bajo las regulaciones establecidas en la ley nacional de experimentación animal N°18611.

5.b.- Disección de nervios ciáticos:

Los ratones fueron sacrificados por medio de dislocación cervical y se procedió a la extracción de ambos nervios ciáticos. Para ello se ubicó al ratón en posición decúbito ventral y se le practicó una sección a nivel de la parte inferior de la región glútea y femoral posterior (Fig.8A), realizando posteriormente una incisión longitudinal paralela al eje del fémur, en la aponeurosis que separa los músculos abductor mayor y el bíceps crural (Fig.8B). Se abre una cavidad entre ambas masas musculares, en el fondo de la que se encuentran el nervio ciático que se observa como una cinta de

aproximadamente 1mm de grosor de color blanco brillante (Fig. 8B). 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 (Fig. 8C) (siguiendo el procedimiento descrito en Martin *et al.*, 2012).

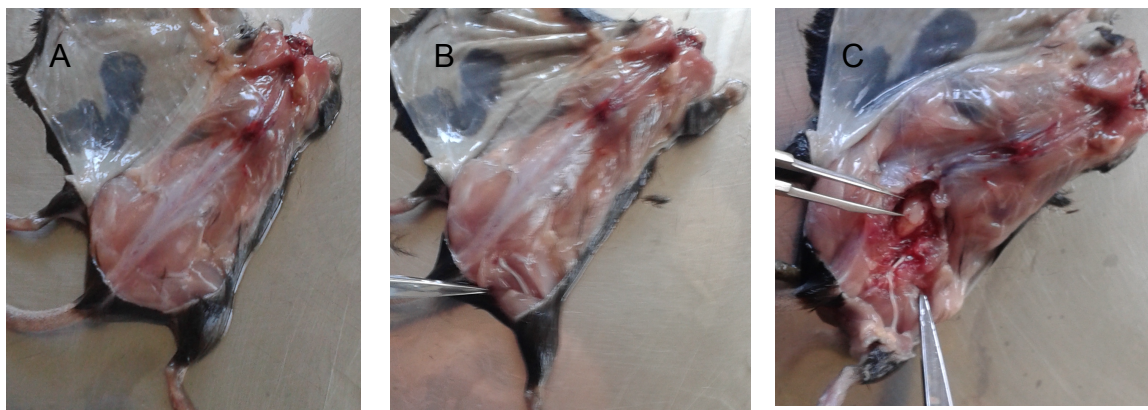


Figura 8.- Procedimiento de disección del nervio ciático: A) Se puede apreciar la zona en donde debe realizarse la incisión en donde se encuentra el nervio. B) Después de diseccionar el bíceps crural y el músculo abductor mayor. C) El recorrido completo del nervio ciático hasta su entrada en la columna vertebral.

5.c.- Extracción de ARN y Retrotranscripción:

Los nervios utilizados para extracción de ARN, fueron inmediatamente puestos en 500 μ l de Trizol y se siguió el protocolo provisto por el fabricante (TRI Reagent[®] SIGMA-ALDRICH Alemania, número de catálogo T9424, <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/tri-reagent.html>). La integridad del ARN total extraído fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% en TAE (40 mM Tris, 1,15% (v/v) ácido acético, 2mM EDTA). La cantidad de ARN extraída fue cuantificada mediante espectrofotometría midiendo absorbancia a 260 nm y la pureza se observó con la relación de la absorbancia 260/280 nm, para ello se empleó un nanodrop (Thermo Scientific EEUU), de modo de utilizar el mínimo volumen de muestra para la cuantificación. Inmediatamente se realizó la retrotranscripción, empleando iguales cantidades de ARN para cada muestra (50 ng), con la retrotranscriptasa SuperScript III (SuperScript III[®] Reverse Transcriptase, Invitrogen EEUU, número de catálogo 18080-044), utilizando oligo dT como cebador o *primer*, de modo de retrotranscribir todos los

mensajeros desde su cola poli-A, utilizando las condiciones recomendadas por el fabricante.

5.d.- PCR cuantitativo (QPCR):

Para las QPCR primero se diseñaron los *primers* específicos para cada gen. Para ello se utilizó la biblioteca de diseño virtual **Universal Probe Library Assay Design Center** de la página de Roche (<https://lifescience.roche.com/webapp/wcs/stores/servlet/CategoryDisplay?tab=Assay+Design+Center&identifier=Universal+Probe+Library&langId=-1>) y las secuencias provistas por el banco de datos Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>).

Posteriormente se evaluaron las condiciones fisicoquímicas predichas para cada par de *primers* directo y reverso (*forward* y *reverse* en inglés). Para ello se empleó el programa OligoAnalyzer 3.1 (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) y se verificó que únicamente se amplificara el segmento deseado realizando una búsqueda de homología de secuencias para *primers* (Primer Blast).

Durante el diseño de *primers*, se puso especial énfasis en intentar obtener valores teóricos iguales para las condiciones fisicoquímicas requeridas por los mismos para la PCR, de forma de poder realizar las corridas con los mismos parámetros y poder realizar los experimentos más rápido, esto permite realizar PCR para diferentes genes al mismo tiempo.

Luego se realizó una PCR a tiempo final en gradiente de temperatura (los pasos la PCR fueron desnaturalización: 95 °C 10 min; ciclado: 95 °C 30 sec, gradiente, 72 °C), para poner a punto las temperaturas de hibridación (*annealing* en inglés) para cada par de *primers*, a continuación se corrieron los productos de PCR en un gel de acrilamida 6% TAE, y se observó a qué temperatura se producía el *annealing*, para los genes de *pmp22*, *mag* y *vim* la misma fue de 58 °C y para *e2f8*, *EIF3E*, *mbp* y *cytb* fue de 56 °C.

Finalmente se corrió la qPCR, utilizando un volumen final de reacción de 25 µl para *pmp22*, *mag* y *vim* y 15 µl para *e2f8*, *EIF3E*, *mbp* y *cytb*, en el Rotor Gene 3000 (Corbett Research Alemania) del IIBCE, con las condiciones anteriormente puestas a punto, utilizando el kit Platinum SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG with ROX (Invitrogen EEUU número de catálogo 11744-100).

La eficiencia de la reacción para los cebadores utilizados se determinó mediante diluciones seriadas en base 5 con 5 puntos del producto de retrotranscripción para los *primers* de *pmp22*, *mag* y *vim* ejemplificado en la figura 9 A y B, para los de *Cytb*, *mbp*, *Eif3e* y *E2f8* se realizaron diluciones en base 2 también con 5 puntos ejemplificado en la figura 9 C. Para todos los casos se realizaron triplicados y se analizaron a través del software Rotor Gene 6000 Series v.1.7 (QIAGEN Alemania). Se define C_T (*Cycle Threshold*) como el número de ciclos de PCR donde la señal de fluorescencia de una reacción excede el valor de *Background*. El C_T es inversamente proporcional a la cantidad de ADN blanco presente en la reacción. Mediante la herramienta *Auto-Find Threshold* del programa mencionado, se determinó los valores C_T y la eficiencia de la reacción de cada réplica técnica para cada dilución, de acuerdo a la siguientes fórmulas:

$$C_T = M \times \log(\text{Concentración}) + B \quad (\text{Ec. 1})$$

Siendo M y B la pendiente y la ordenada en el origen respectivamente. La pendiente de esta curva permite calcular la eficiencia de la reacción:

$$\% \text{ Eficiencia} = (10^{-1/M} - 1) \times 100 \quad (\text{Ec. 2})$$

Cabe destacar que la herramienta *Auto-Find Threshold*, establece automáticamente un umbral para determinar los C_{Ts} , optimizando el coeficiente de correlación de la Ec. 1, que ajusta los datos de la curva estándar a una regresión lineal, en todos los casos se obtuvieron eficiencias mayores el 90% y fueron consideradas como 100%. Con el valor de umbral obtenido en la curva estándar, se analizaron las reacciones de PCR realizadas con las muestras extraídas de nervios ciáticos de ratones TrJ y Wt. Los C_{Ts} obtenidos para cada genotipo fueron analizados estadísticamente.

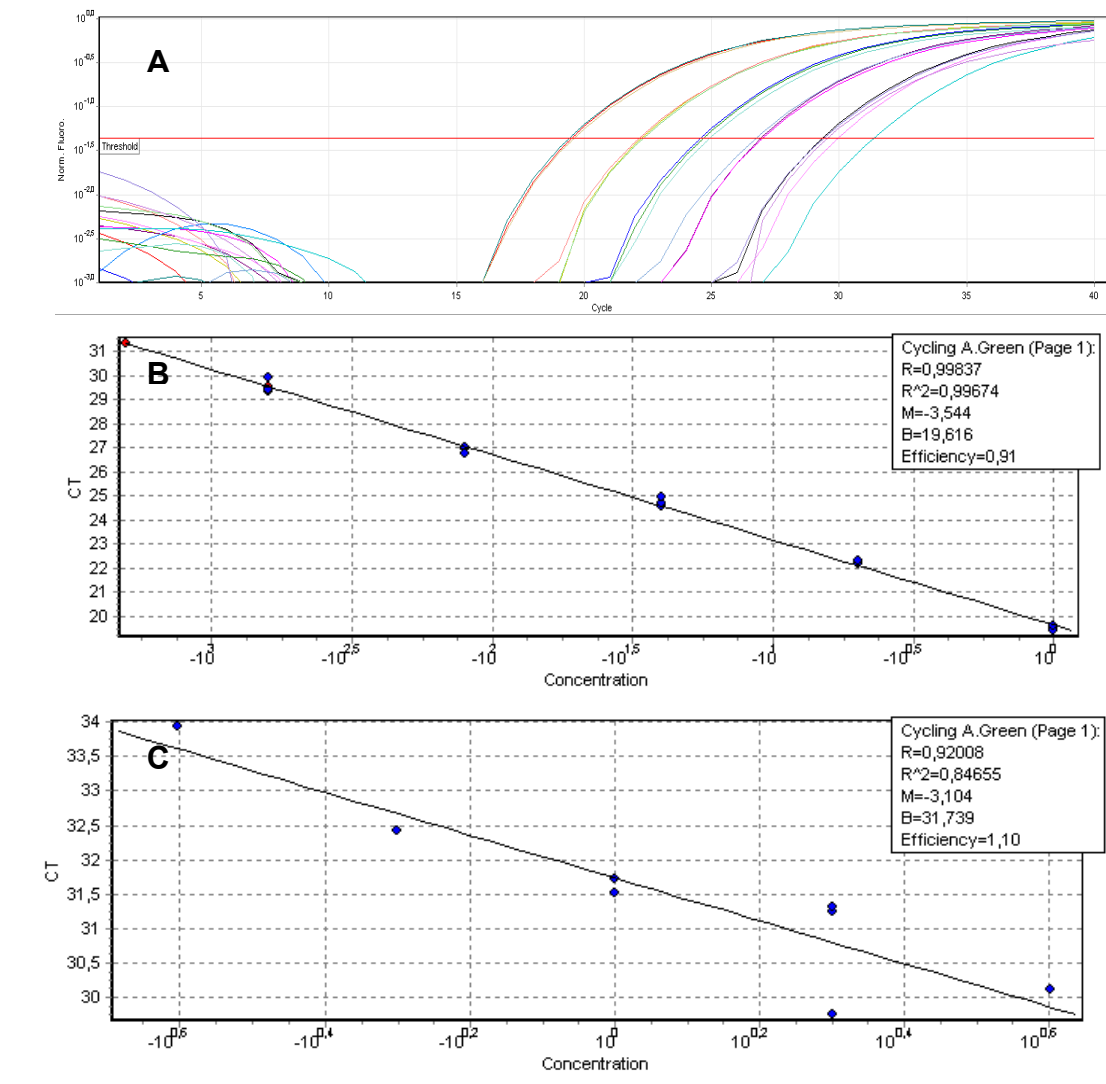


Figura 9.- Determinación de la eficiencia de los primers mediante diluciones seriadas: A) Gráfico de fluorescencia vs C_T para la dilución seriada en base 5 de los primers de *mag*. B) Gráfico de C_T vs concentración en base 5 de los primers de *mag*. C) Gráfico de C_T vs concentración en base 2 de los primers de *Cytb*.

Los primers utilizados fueron:

Gen	Ensembl Gene id	Tamaño amplicon	Primer Forward	Primer Reverse
Pmp22	ENSRNOG00000003338	126	GAATTCCTGTTCTTCTTCTGCCAGCTC	AAGCTTGTAGATGGCCGCTGCACTCATC
Cytb	ENSRNOG000000031766	71	GTCACCCACATCTGCCGAGACG	ATTGAGGCGCCGTTGGCGTG
Mag	ENSRNOG000000021023	94	AGGATGATGGGGAATACTGGT	AGGATTATGGGGCAAATC
Mbp	ENSRNOG00000016516	102	ACGGACACCCTTTCAAGTTCAC	GTGCCTGTCTATCCGCAGTG
E2f8	ENSRNOG000000022537	109	ATCTATGGCGGCCGTACC	CAAGTGCTGCAGGGTAAAGTT
Eif3e	ENSRNOG000000027690	112	TTATTCTGATGATATCCCTCATGC	TGGATCTTCAAACATCTTCACG
Vim	ENSMUSG000000026728	114	AGATCGCCACCTACAGGAAG	CCAGAGGAAGTGACTIONCAGGT

5.e.- Fijación y preparación de nervios ciáticos para inmunohistoquímica:

Los nervios ciáticos fueron fijados por inmersión en paraformaldehído al 3% en PHEM (60mM Pipes, 2mM Hepes, 10mM EGTA, 2mM MgCl₂, pH 7,4) durante 1 h. a Temperatura Ambiente (T.A.). Luego las muestras se crioprotegieron por inmersión en solución de sacarosa al 30% en PHEM, hasta que los nervios cayeron al fondo del tubo. Posteriormente, las muestras fueron infiltradas en soluciones crecientes de medio de inclusión y decrecientes de sacarosa, hasta medio de inclusión puro. El tejido se colocó en un molde en medio de inclusión nuevo y se congeló a -20 °C. Se realizaron criosecciones de 10 µm de espesor en criostato (SLEE medical® Alemania). Las criosecciones (recogidas sobre portaobjetos pretratados con sustancias adherentes (Histogrip, Invitrogen EEUU), se mantuvieron a -20 °C hasta el momento de realizar la inmunohistoquímica.

5.f.- Inmunohistoquímica:

Para el análisis de las criosecciones se utilizaron técnicas de inmunotinción indirecta, para detectar proteínas específicas de nuestro interés, junto con sondas fluorescentes (DAPI, para el reconocimiento de los núcleos y Faloidina (Alexa 546) para el reconocimiento del citoesqueleto de actina). En todos los casos se utilizaron anticuerpos policlonales comerciales producidos en conejo, en pollo o humano. Además se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo anti-ribosomas, producido y caracterizado en nuestro laboratorio (Kun *et al.*, 2007). Para visualizar la marcación del anticuerpo primario se utilizaron anti-anticuerpos comerciales conjugados a fluoró cromos con emisiones en distintas longitudes de onda. Las criosecciones fueron permeabilizadas con Triton X-100 al 0,1% en PHEM durante 10 minutos a T.A. En el caso del reconocimiento de PMP22 se realizó un paso posterior de desenmascaramiento con ácido fórmico al 70% por 15 segundos (este protocolo fue adaptado del protocolo de desenmascaramiento utilizado por Kitamoto *et al.*, 1987). Luego se bloquearon las uniones inespecíficas con suero normal de cabra al 5% en buffer de incubación (BI)(Glicina 150mM,

BSA 1%, en PHEM) durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, los cortes fueron incubados 16 h a 4 °C con anticuerpos específicos. El exceso del anticuerpo primario se lavó con BI seguido de una incubación durante 45 minutos a 37 °C con anticuerpos secundarios y sondas fluorescentes. El exceso de anticuerpos secundarios fue retirado por sucesivos lavados en buffer PHEM. Se eliminó el exceso de humedad y se realizó el montaje definitivo con Prolong® Gold Antifade (Invitrogen EEUU).

Tabla de anticuerpos utilizados tanto en inmunomicroscopía como en WB:

Anticuerpos específicos, anti-anticuerpos y sondas fluorescentes	Procedencia y Marca	Dilución de trabajo
PMP22	Rabbit ab15506, Abcam	1/100
MAG S/L	Rabbit 34-6200, Invitrogen	1/150
Vimentina	Chicken MBS502145, MyBioSource	1/250
RIB	DPAN	1/1000
Anti-P	HPO-0100, Immunovision	1/1000
Neurofilamento 68	Chicken ab72997, Abcam	1/300
Falloidina 543	A22283, Invitrogen	1/150
Dapi	D1306, Invitrogen	1/1000
Goat anti Rabbit Alexa 488	A11034, Invitrogen	1/1000
Goat anti Rabbit Alexa 546	A11035, Invitrogen	1/1000
Goat anti Rabbit Alexa 633	A10523, Invitrogen	1/1000
Goat anti Chicken Cy5	ab97147, Abcam	1/1000
Goat anti Human Alexa 647	A-21445, Invitrogen	1/1000

5.g.- Microscopía Confocal y cuantificación:

Las criosecciones de nervio ciático inmunomarcadas fueron visualizadas y registradas en el microscopio confocal FV300 (Olympus Japón) del IIBCE. Las condiciones de confocalidad y ajuste de parámetros (fotomultiplicador-PMT-, intensidad de láser, magnificación, profundidad de imagen, etc) utilizadas fueron las mismas en los registros de cada anticuerpo para ambos genotipos, cumpliéndose siempre que el valor del PMT utilizado cumpliera con que no se observara señal en el control negativo ni saturación en la muestra a analizar. La adquisición de las imágenes se realizó en una misma sesión confocal para evitar el decaimiento de la señal.

Las cuantificaciones de las intensidades de las señales para cada anticuerpo se realizaron utilizando el *software* Image J (*software* libre desarrollado en el NIH EEUU). Fueron utilizados dos métodos de cuantificación, uno para cuantificar cantidad total y otro para distribución a lo ancho de la fibra. En el método utilizado para cuantificación total, se realizó una proyección de 10 planos en el eje óptico Z, con planos tomados cada 1 μm . La proyección es una herramienta que permite obtener una imagen virtual bidimensional conteniendo la información más relevante de varios planos secuenciales capturados en el eje Z, proyectados pixel a pixel. El programa permite considerar opcionalmente, valores de intensidad de fluorescencia diferentes (mínimos, medios o máximos). En nuestro caso utilizamos proyecciones de intensidad de fluorescencia máxima. Sobre esta proyección se dispusieron 9 ventanas idénticas, distribuidas de forma homogénea en el tejido. Donde se tomo el valor promedio de intensidad de fluorescencia de cada ventana. Fueron realizadas un total de 45 ventanas por animal (esto implica que se utilizaron 5 proyecciones de 10 planos por animal, con 9 ventanas en cada proyección). A partir de esta información se calculó el promedio de intensidad de señal de fluorescencia para cada genotipo, posteriormente se realizó el análisis estadístico mediante Test de T y se graficó.

Para observar la distribución a lo ancho de la fibra se utilizó un método de líneas ensanchadas, que dibujaban un área rectangular cubriendo la fibra de lado a lado (CS-axón-CS). El largo del rectángulo coincidió con el ancho de la fibra, ubicado perpendicular al eje mayor de ella. El ancho del rectángulo permaneció constante en todas las medidas, para todas las imágenes examinadas. Las medidas se realizaron en los planos focales donde se apreciaba el mayor diámetro de la fibra, para todas las fibras consideradas. Mediante la herramienta *Plot Profile* del *software* mencionado, se obtiene la intensidad de señal promedio, en función del ancho de la fibra, considerada como 100% para normalizar todas las medidas obtenidas. El gráfico de intensidad de fluorescencia promedio en función del ancho de la fibra nos permite obtener los patrones de distribución de señal transversal a la fibra donde se pueden discriminar los dominios gliales (0-30% y 70-100%) y

axonales (30-70%). A partir de esta información se calculó el promedio de intensidad de señal de fluorescencia en cada dominio (Bresque, 2014), para 100 observaciones, en cada genotipo, se promedió la intensidad por genotipo, se analizó estadísticamente y se graficó.

5.i.- Extracción de proteínas, SDS PAGE y WB de nervios ciáticos:

La extracción de proteínas se realizó en tampón de lisis (Pipes 50mM, EGTA 5mM, NaCl 50mM, MgCl₂ 5mM, Nonidet P40 0,1%, Tritón X-100 0,1%, Tween-20 0,1%, Glicerol 5%, pH 6,9), previo al inicio de la extracción se agregó un cóctel de inhibidores de proteasas (*SIGMAFASTTM Protease inhibitor, S8830-20TAB* Alemania), a continuación se realizó una centrifugación a 300g por 10 minutos para eliminar los remanentes de tejido. Luego se procedió a cuantificar la cantidad de proteína utilizando el Quanti-iTTM Protein Assay (Invitrogen EEUU).

Posteriormente se utilizó el sistema de electroforesis desnaturizante SDS-PAGE, en donde se sembraron 29,7 µg de proteína para cada muestra. Una vez desnaturizadas y cargadas las muestras, se realizó la electroforesis, proceso en el cual pasaron las proteínas primero a través de un gel concentrador a 60 voltios constante y posteriormente fueron separadas en un gel separador al 12% de acrilamida a 90 voltios constante. A continuación fueron transferidas a una membrana a 350 mA constante (Immuno-BlotTM PVDF Membrane, de BIO RAD EEUU, número de catálogo 162-0177) y se procedió con el inmunoreconocimiento.

El inmunoreconocimiento de las bandas transferidas, se realizó mediante marcación indirecta. Se utilizaron anticuerpos específicos (se utilizaron las mismas diluciones de trabajo que en IHQ, si bien no es lo que comunmente se realiza, fue así por el sistema de detección empleado) sin marca y posteriormente anti-anticuerpos conjugados a un fluorocromo. El procedimiento consistió en bloquear la membrana con TBS-T leche al 10% una vez terminada la transferencia, para bloquear sitios de unión inespecíficos, seguido de una incubación de 16 h a 4 °C con el anticuerpo

específico. El exceso de anticuerpo específico se eliminó lavando con TBS-T y se procedió a incubar con el anti-anticuerpo, 1 h a TA. El exceso de anti-anticuerpo fue eliminado por sucesivos lavados con el mismo tampón. Finalmente la membrana fue escaneada en el escáner fla reader 9000 (Fuji Japón) del IIBCE.

Para todo gel transferido se realizó un gel gemelo, el cual fue teñido con Coomassie Blue al 1% preparado en fijador (30% EtOH, 7% ácido Acético) 16 h TA, el exceso de tinción se eliminó con H₂O pura y se procedió a escanear en el fla reader 9000, posteriormente cuantificamos la cantidad de proteína de cada carril como control de carga.

5.h.- Análisis Estadísticos:

El análisis estadístico fue realizado mediante la prueba t de Student, considerando que las poblaciones de ratones TrJ y wt, eran muestras independientes, con una distribución normal para los parámetros analizados. Sin embargo, como el tamaño de la muestra que analizamos era pequeño, la inferencia estuvo basada en una estimación de la desviación típica. Empleamos la prueba t de dos colas para muestras con diferente varianza. Al considerar diferencias en los parámetros analizados entre los ratones TrJ y wt, se consideraron diferencias significativas entre poblaciones a los valores de error de tipo 1 o valores de $p < 0.05$.

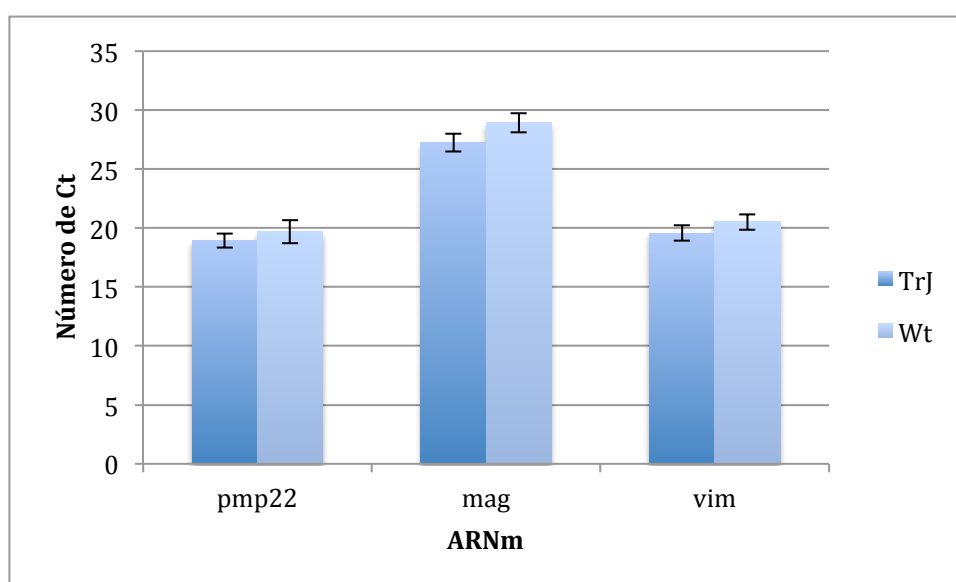
5.j.- Análisis *in silico* de PMP22:

El análisis *in silico* se realizó en busca de secuencias conservadas para PMP22, en el Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB – PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). En el mismo se buscaron secuencias conservadas de PMP22 de unión o interacción con ácidos nucleicos.

6.- Resultados:

6.a.- Cuantificación de mensajeros:

Fueron evaluadas las cantidades relativas de los mensajeros *pmp22*, *mag* y *vim*, de los cuales poseíamos observaciones de un aumento en la cantidad sus proteínas, asociado al genotipo TrJ. Nuestro análisis no mostró diferencias significativas en la expresión de estos ARNm entre genotipos TrJ y wt. Para la realización de los mismos se emplearon muestras provenientes de nervios ciáticos de 6 ratones TrJ y 6 wt (Graf. 1).

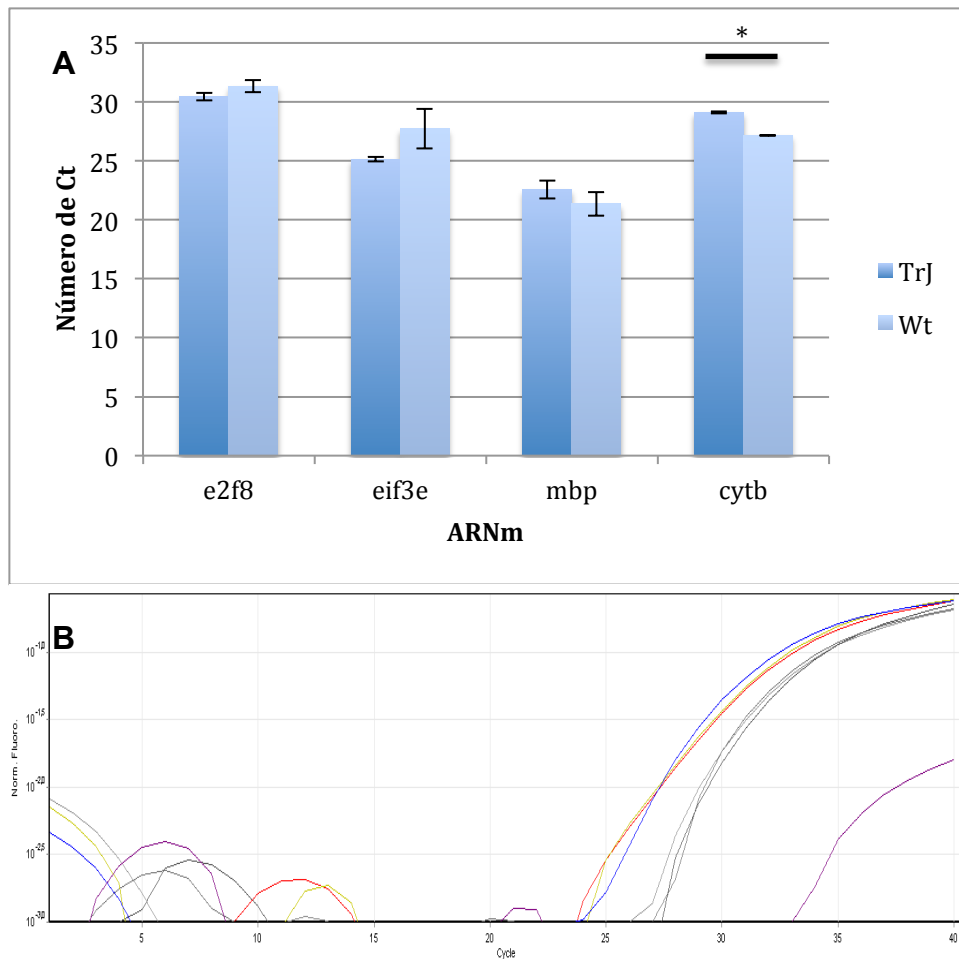


Gráfica 1.- Gráficos de C_T de QPCR para *pmp22*, *mag* y *vimentina (vim)*: Nuestros resultados indican que no hay diferencias significativas entre los genotipos TrJ y wt en la abundancia relativa de los mensajeros de *pmp22*, *mag* y *vim*. En las barras de error se aprecia la SEM (error estándar de la media), los valores obtenidos para cada uno de los ARNm fueron: *pmp22* - TrJ 18,94 ± 0,6 vs wt 19,69 ± 0,99 p=0,532; *mag* -TrJ 27,25± 0,75 vs wt 28,92 ± 0,80 p= 0,16; *vim* - TrJ 19,58 ± 0,65 vs wt 20,52 ± 0,66 p= 0,34

Posteriormente fue analizado el grupo de mensajeros *e2f8*, *eif3e*, *cytb* y *mbp*. Los factores de inicio de la transcripción y de la traducción (*e2f8* y *eif3e*, respectivamente) se consideraron relevantes, para explorar la posibilidad de que estos procesos pudieran tener una alteración asociada al genotipo mutante. La exploración de los niveles de expresión del gen mitocondrial que codifica para el citocromo b (*cytb*), nos permitió obtener indicios de eventuales alteraciones mitocondriales. La posibilidad de comprender el

fenotipo neurodegenerativo TrJ como una mitocondriopatía no ha sido hasta el presente señalado en la literatura, aunque si ha sido descrito para otras neuropatías (Ravera *et al.*, 2013). El ARNm *mbp* lo exploramos por ser específico del SN y por estar descrito en la literatura un cambio en la abundancia relativa de esta proteína en TrJ (Adlkofer *et al.*, 1997). En este caso se utilizaron muestras provenientes de 3 ratones wt y 3 TrJ. Como se puede observar en el gráfico 2 no fueron halladas diferencias significativas para los genes *e2f8*, *eif3e* y *mbp* entre genotipos TrJ y wt. Sin embargo, el ARN mensajero del gen mitocondrial *cytb* mostró diferencias significativas entre genotipos TrJ y wt.

Esta diferencia en *cytb* fue de 2 C_T , siendo el genotipo mutante el que posee mayor número de C_T . Esta diferencia entre los valores de C_T implica una disminución del 75% en el ARN mensajero de *cytb* en el genotipo TrJ respecto del wt (TrJ: $29,12 \pm 0,099$ vs wt: $27,18 \pm 0,035$; $p < 0,001$). En todos los casos fueron realizadas curvas de calibración estándar, como se describe en la estrategia experimental, sobre las que se interpolaron las medidas de las muestras.



Gráfica 2.- Cuantificación de los mensajeros de e2f8, eif3e, mbp y cytb:

A) Nuestros resultados indican que no hay diferencias significativas entre los genotipos TrJ y wt en la abundancia relativa de los mensajeros de *e2f8*, *eif3e* y *mbp*. Y una diferencia significativa de $2C_T$ para el mensajero de *cytb*, siendo menor el número de C_T en el wt. En las barras de error se aprecia la SEM (error estándar de la media) y los valores obtenidos para cada uno de los ARNm fueron: *e2f8* - TrJ $30,47 \pm 0,33$ vs wt $31,35 \pm 0,52$ $p=0,23$; *eif3e* - TrJ $25,15 \pm 0,19$ vs wt $27,73 \pm 1,17$ $p= 0,26$; *mbp* - TrJ $22,58 \pm 0,73$ vs wt $21,35 \pm 0,99$ $p= 0,38$; *cytb* - TrJ $29,12 \pm 0,099$ vs wt $27,18 \pm 0,035$ $p=0,0097$

B) Se aprecia la gráfica de C_T vs fluorescencia para el *cytb*, en donde se evidencia la clara diferencia entre genotipos.

6.b.- Cuantificación y distribución de proteínas y ribosomas mediante

IHQ:

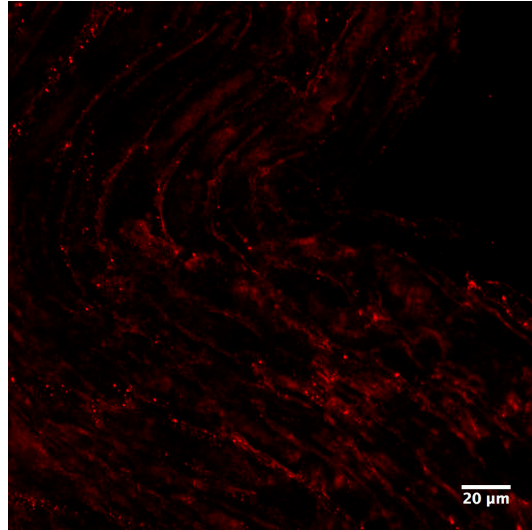
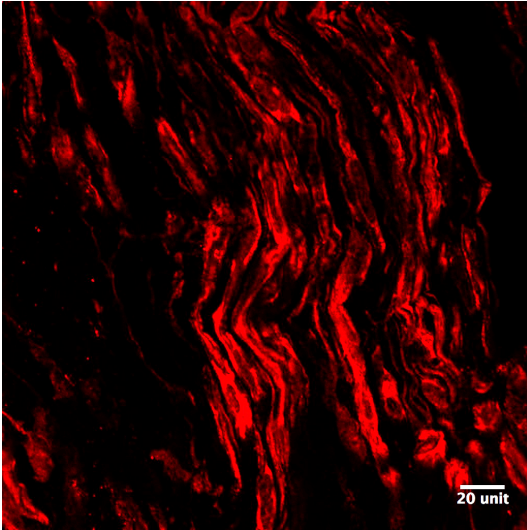
Estudios realizados *in-situ*, mediante criosecciones e inmunomarcación específica, para las proteínas PMP22, MAG y VIM, revelaron diferencias significativas genotipo específicas. Para todos los estudios de IHQ se emplearon muestras provenientes de 3 individuos TrJ y 3 wt.

Para todas estas proteínas, observadas *in-situ*, se halló un aumento en el genotipo TrJ respecto al wt (Fig. 10).

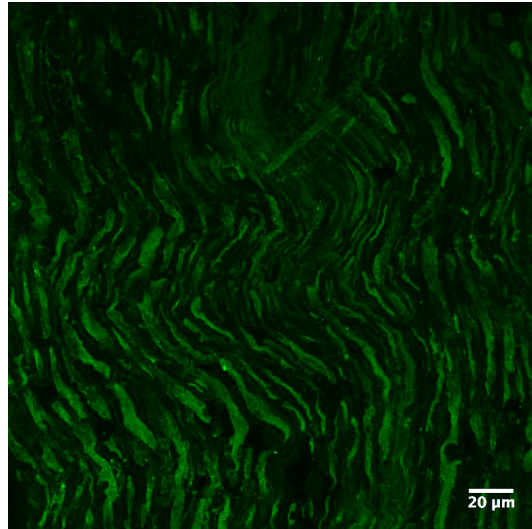
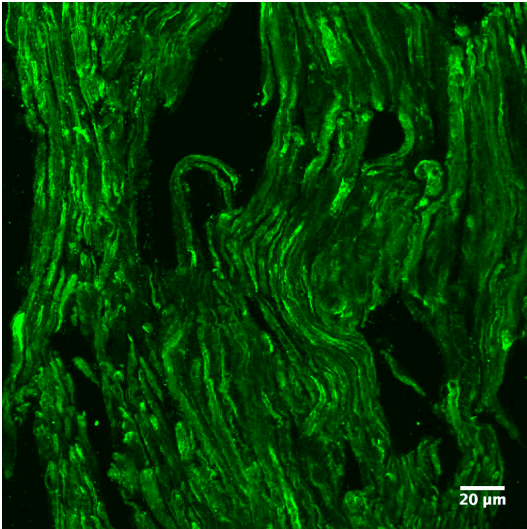
TrJ

wt

PMP22



MAG



VIM

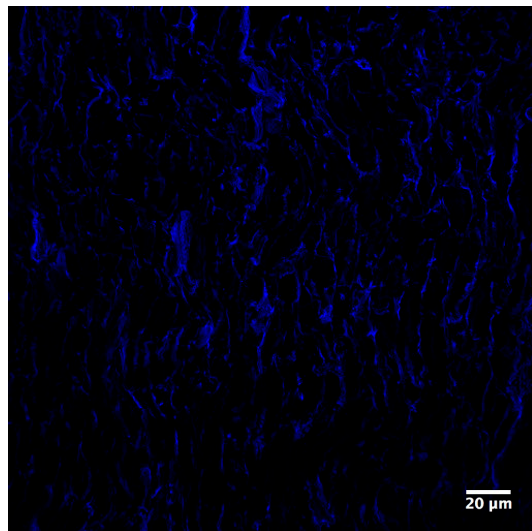
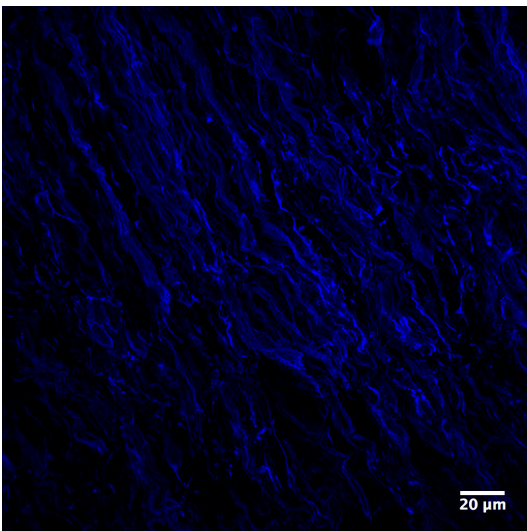
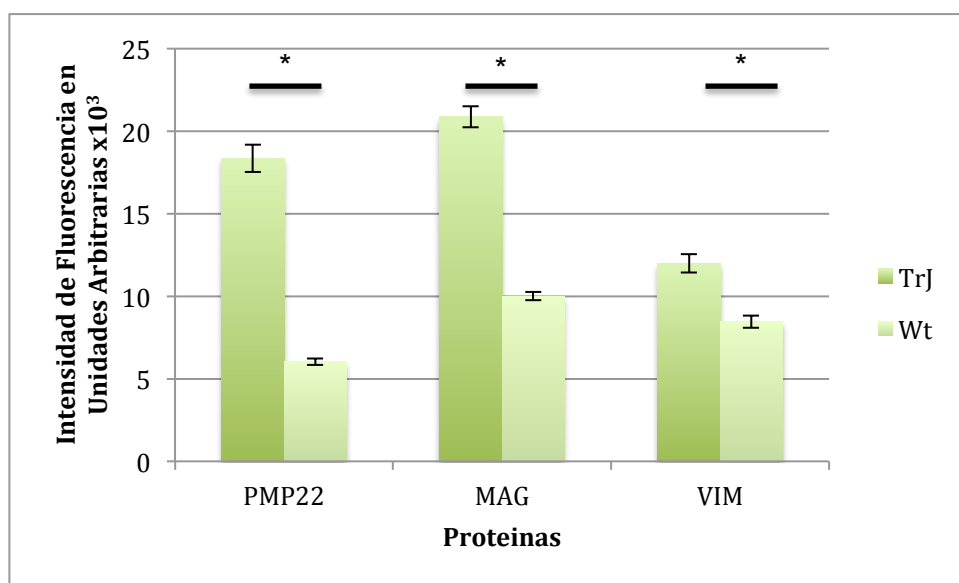


Figura 10.- Marcación de PMP22, MAG y VIM en cortes longitudinales de nervio ciático de ratón TrJ y wt: Para las tres proteínas inmunoreconocidas se aprecia una mayor intensidad de marcación en el fenotipo TrJ .

Las diferencias fueron cuantificadas mediante intensidad de fluorescencia en las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal (Graf.3), utilizando el método de ventanas previamente descrito en metodología. Hallándose que el TrJ posee un incremento de 200% de PMP22 respecto al wt (TrJ: 18362 ± 827 UA vs wt: 6028 ± 196 UA; $p < 0,001$), un 100% más de MAG (TrJ: 20882 ± 640 UA vs wt: 10011 ± 245 UA; $p < 0,001$) y 50% más de VIM (TrJ: 12007 ± 565 UA vs wt: 8451 ± 362 UA; $p < 0,001$), siendo estas diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 3.- Cuantificación de PMP22, MAG y VIM: En estas cuantificaciones se puede apreciar un aumento de un 200% en la cantidad total de PMP22, un aumento del 100% en la cantidad de MAG y un aumento del 50% en la cantidad de Vimentina (VIM), en criosecciones de nervios ciáticos de TrJ con respecto a wt. En las barras de error se aprecia la SEM (error estándar de la media) y los valores obtenidos para cada una de las proteínas fueron: PMP22 - TrJ: 18362 ± 827 UA vs wt: 6028 ± 196 UA $p < 0,001$; MAG - TrJ: 20882 ± 640 UA vs wt: 10011 ± 245 UA; $p < 0,001$ y VIM - TrJ: 12007 ± 565 UA vs wt: 8451 ± 362 UA; $p < 0,001$.

Teniendo en cuenta las diferencias en los niveles de proteína y no en mensajeros, observamos la marcación de ribosomas, como cuantificación indirecta de síntesis proteica, realizada con el anticuerpo generado en nuestro laboratorio, en criosecciones de nervios ciáticos, para ambos genotipos (Fig.11), en donde se aprecian diferencias genotipo específicas en la intensidad y distribución de los ribosomas empleando el método de líneas ensanchadas descrito en materiales y métodos. Se apreció un aumento de la señal en el genotipo TrJ comparado con el genotipo wt (Graf.4B),

representando un incremento del 50% en la zona glial y del 250% la axonal (Graf.4A).

RIB

TrJ

wt

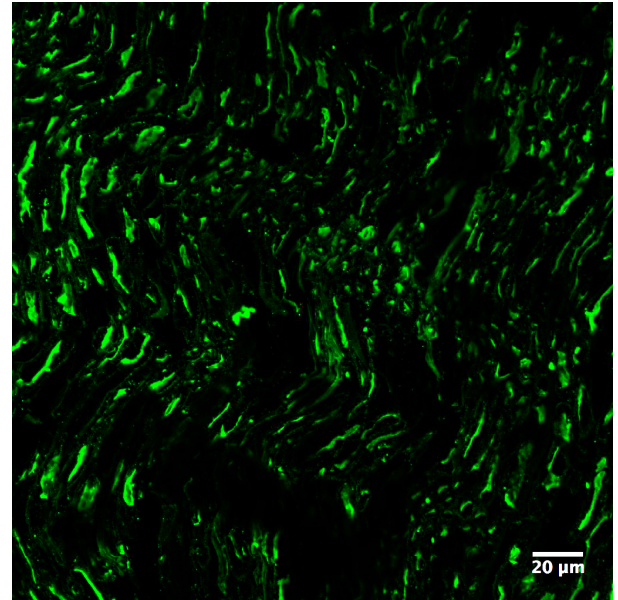
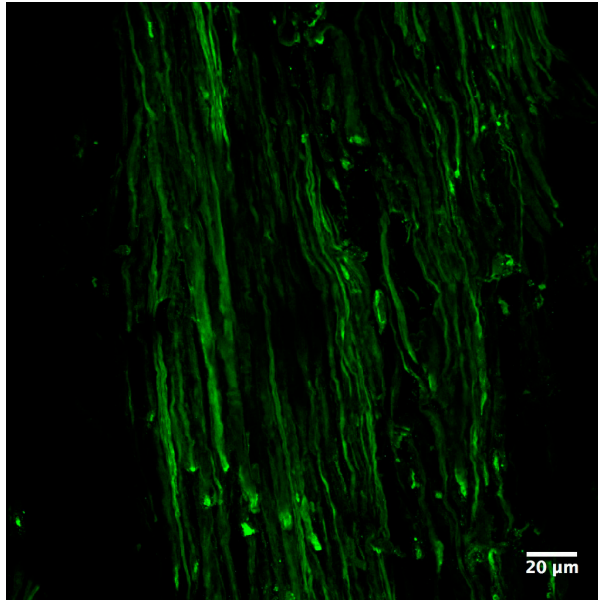


Figura 11.- Marcación Ribosomal en cortes transversales de nervio ciático TrJ y wt: en esta inmuno-marcación se observa un aumento y diferente distribución de los ribosomas en los ratones que presentan la mutación respecto a los wt. En la misma fue empleado el anticuerpo desarrollado y caracterizado en el DPAN (Kun *et al.*, 2007).

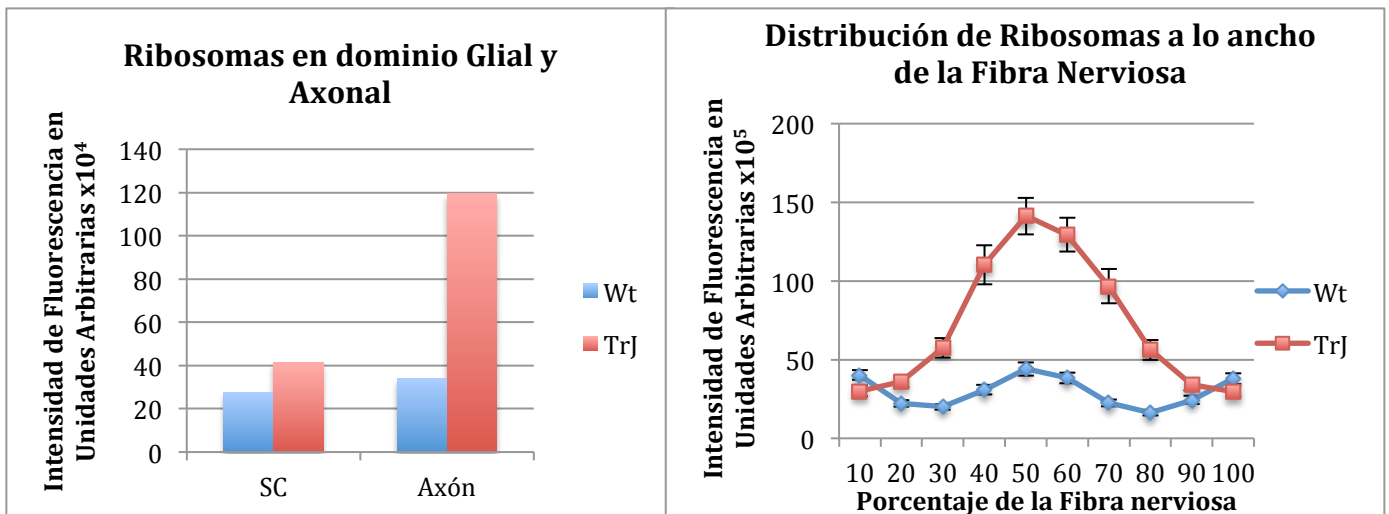


Gráfico 4.- Distribución de Ribosomas en la fibra nerviosa wt y TrJ: A) Cuantificación en dominio glial (SC) y axonal en donde observamos un incremento del 50% en la señal glial y un incremento del 250% en la señal axonal B) Se aprecia la distribución transversal de la señal cuantificada en un perfil perpendicular al eje principal de la fibra nerviosa, en donde se nota un incremento en la señal en TrJ principalmente en el axón.

6.c.- Cuantificación de proteínas mediante WB y SDS-PAGE:

Estudios realizados mediante WB, para las proteínas NF68, VIM, MAG y proteínas ribosomales, revelaron algunas diferencias significativas genotipo específicas. En todos los casos se emplearon muestras provenientes de 3 individuos TrJ y 3 wt.

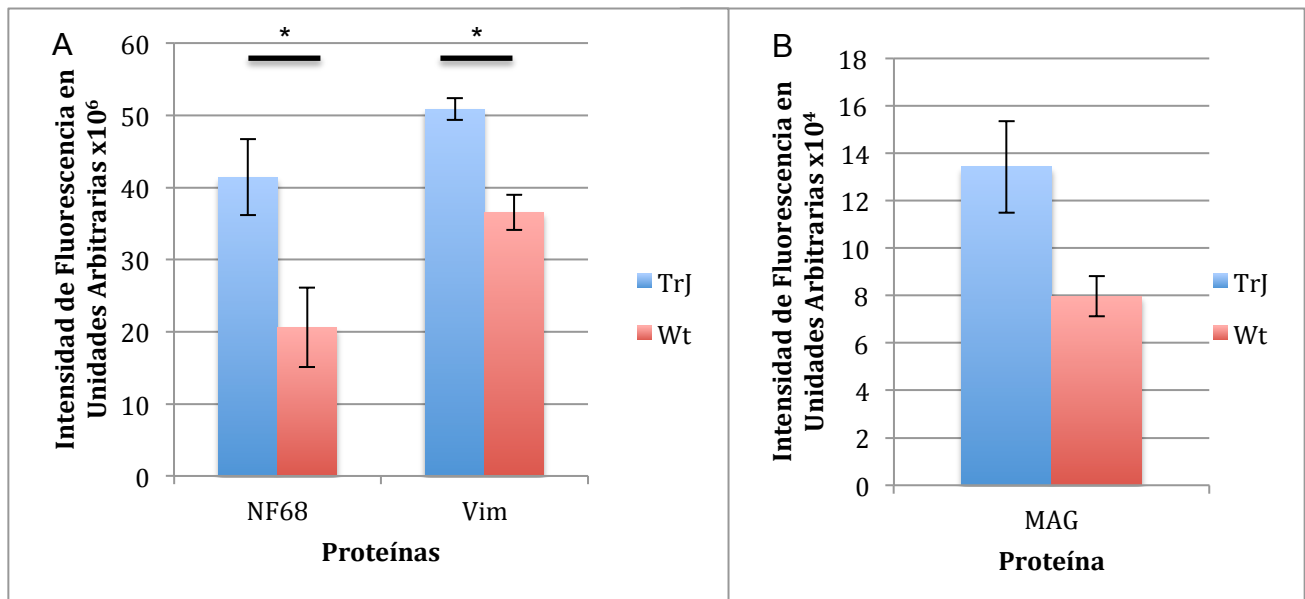
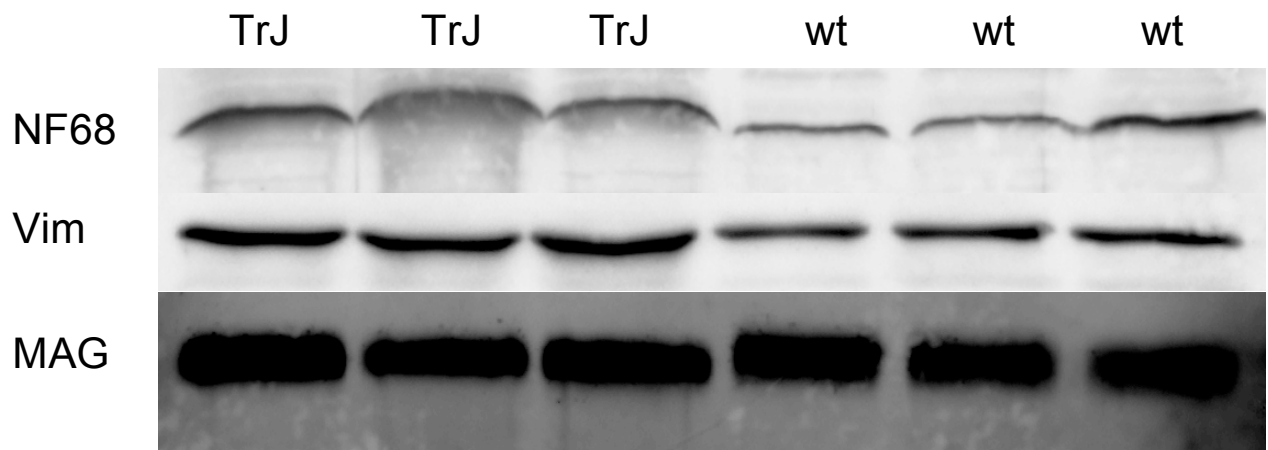


Figura 12.- Cuantificación mediante WB de las proteínas NF68, VIM y MAG: en la parte superior se observan los WB, en donde hay una notoria diferencia genotipo específica en NF68 y VIM, mientras que para MAG no es tan evidente. Al cuantificar y graficar se aprecia en: A) NF68 y VIM, un incremento del 100% para NF68 y un incremento de 39% para VIM en nervio ciático de TrJ respecto a wt, siendo ambos estadísticamente significativos. B) MAG presenta una tendencia al aumento en nervio ciático de TrJ respecto a wt. En las barras de error se aprecia la SEM (error estándar de la media) y los valores obtenidos para cada una de las proteínas fueron: NF68 - TrJ: 41425944 ± 5255433 UA vs wt: 20614448 ± 5516600 UA $p = 0,05$; VIM - TrJ: 50849274 ± 1492568 UA vs wt: 36548453 ± 2436920 UA $p = 0,01$ y MAG - TrJ: $134148,1833 \pm 19269,14713$ UA vs wt: $79626,40333 \pm 8397,375066$ UA $p = 0,33$.

Se apreciaron diferencias significativas genotipo específicas para la subunidad liviana de los neurofilamentos (NF68) que mostró un 100% más de esta proteína en el genotipo TrJ respecto al wt (TrJ: 41425944 ± 5255433 UA vs wt: 20614448 ± 5516600 UA; $p = 0,05$) y un 39% más de Vim en el (TrJ: 50849274 ± 1492568 UA vs wt: 36548453 ± 2436920 UA; $p = 0,01$) (Figura 12A). A su vez, se apreció una tendencia de aumento de MAG en el TrJ respecto al wt (Figura 12B).

El densitograma correspondiente a la intensidad de fluorescencia de las proteínas ribosomales se realizó con el anticuerpo humano anti-P (el cual reconoce las proteínas ribosomales P), halló un aumento del 33% de P0 (TrJ: 36800038 ± 1315257 UA vs wt: 27584395 ± 1006895 UA; $p = 0,01$), no se observaron diferencias significativas para P1 y se observó una tendencia al aumento para P2 (TrJ: 22058762 ± 590516 UA vs wt: 15332411 ± 2056703 UA), en nervios ciáticos de TrJ respecto a wt (Figura 13).

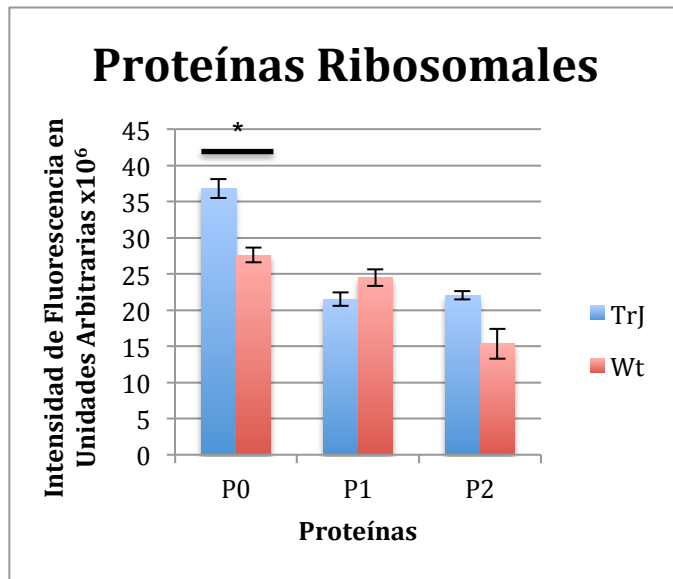
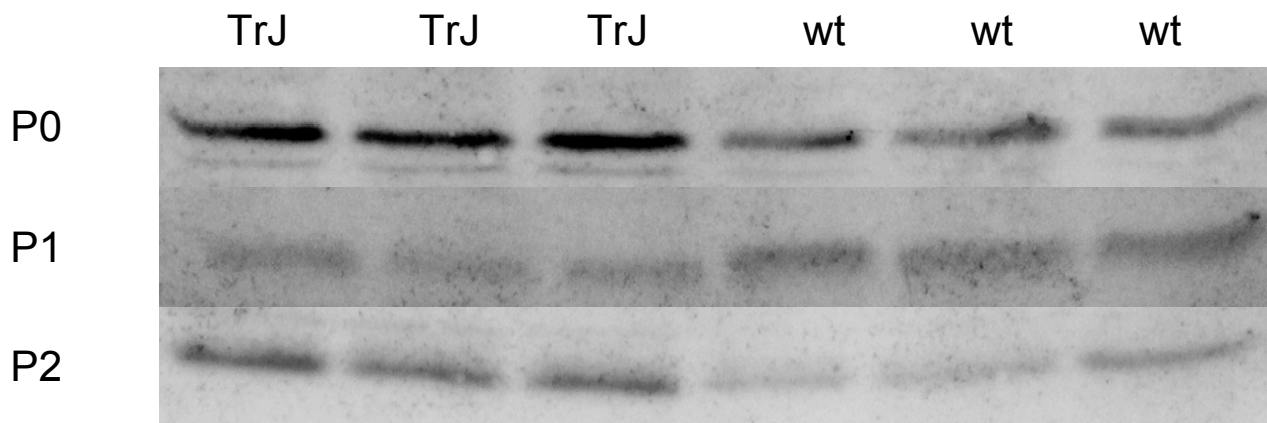


Figura 13.- WB de proteínas ribosomales P0, P1 y P2: En la parte superior se pueden apreciar los WB, en donde es evidente el aumento de P0 en el genotipo TrJ. En la gráfica se aprecia la cuantificación, en donde se nota un aumento del 33% de P0, ausencia de diferencias significativas en P1 y una tendencia al aumento de P2. Para este WB fue utilizado en anti-P, anticuerpo comercial. En las barras de error se aprecia la SEM (error estándar de la media) y los valores obtenidos para cada una de las proteínas fueron: P0 - TrJ: 36800038 ± 1315257 UA vs wt: 27584395 ± 1006895 UA p = 0,01; P1 TrJ: 21479227 ± 926038 UA vs wt: 24456729 ± 1123328 UA p = 0,11; P2 - TrJ: 22058762 ± 590516 UA vs wt: 15332411 ± 2056703 UA p = 0,07

En el gel gemelo, además de constatar que la carga de proteína por carril era la misma (mediante la cuantificación de proteína total por carril, analizando las imágenes obtenidas mediante el software Image J), se identificaron (Fig.14) grandes diferencias en el patrón de bandas genotipo específicas, al comparar el genotipo TrJ con el wt. Es notorio un aumento de intensidad en bandas de alto peso molecular, especialmente en una banda de alrededor de 70 kDa y una disminución en una banda de alrededor de 30 kDa en TrJ respecto a wt .

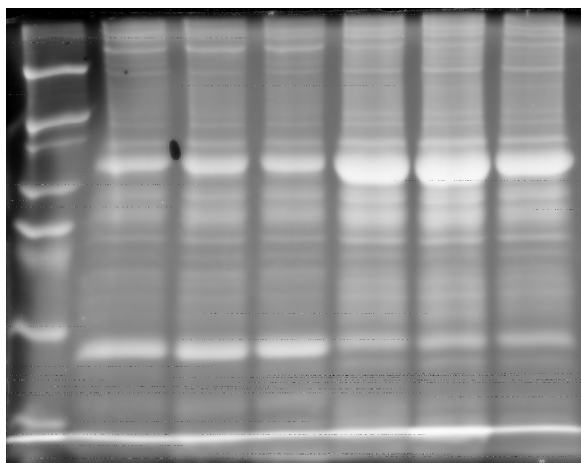
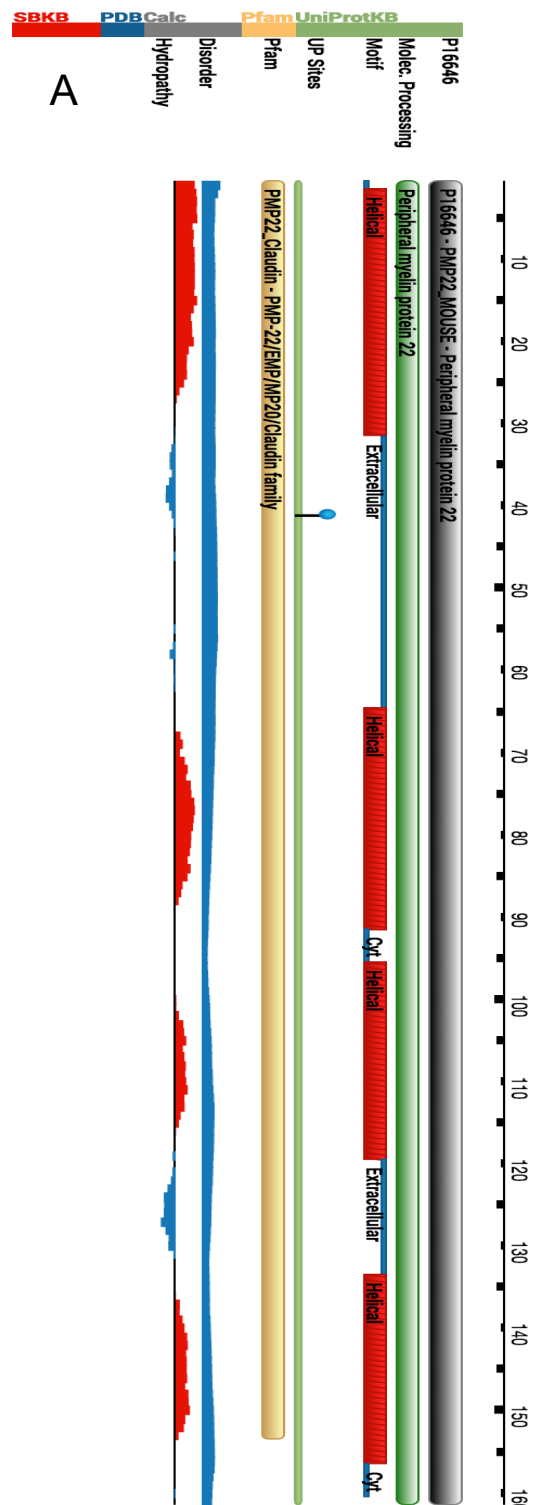
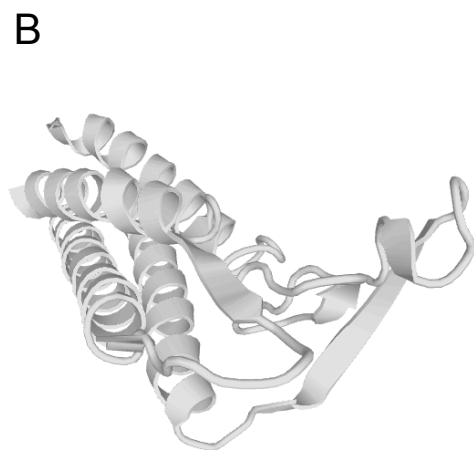


Figura 14.- Gel gemelo SDS-PAGE teñido con Coomassie: De izquierda a derecha se pueden apreciar el marcador de peso molecular, 3 carriles con diferentes muestras de nervio ciático de wt y 3 carriles con diferente muestra de nervio ciático de TrJ. En este gel se puede apreciar un aumento en la intensidad de bandas de alto peso molecular en TrJ, principalmente en una banda de alrededor de 70 kDa y una disminución en una banda de alrededor de 30 kDa.

El análisis *in-silico*, realizado de forma extensa en diferentes bases de datos, no arrojó evidencias de la presencia de dominios conservados en PMP22 involucrados en la regulación génica. Se apreció únicamente un dominio claudina, constituido por las alfa hélice transmembrana, los dominios amino y carboxilo terminales intracelulares, dos bucles extracelulares y un bucle intracelular. El resultado obtenido en las diferentes bases de datos se esquematiza en la fig 15.

Figura 15.- Dominios conservados de PMP22: A) Resultado obtenido en el *Protein Data Bank* para PMP22: en donde se aprecia un dominio de tipo Claudina formado por 4 motivos alfa hélice, 2 bucles extracelulares y uno intracelular y los dominios amino y carboxilo terminal intracelulares. B) Se aprecia una modelización de la proteína en el *Swiss Prot structure prediction*, en donde se aprecian los mismos dominios previamente mencionados.



7.- DISCUSIÓN:

Exploramos la expresión génica de *pmp22*, *mag*, *vim*, *mbp*, *citocromo b*, *e2f8* y *eif3e* en el nervio ciático de ratones adultos TrJ, cuya alteración génica (T1703C, produciendo un cambio L16P en el primer dominio transmembrana de PMP22) constituye un modelo de neuropatía periférica hereditaria crónica, equivalente a la humana CMT-1E. Al comparar su expresión con la mostrada en el genotipo wt, no hallamos cambios en los nivel de expresión de ninguno de estos ARNm, a excepción del ARNm del citocromo b.

Esperabamos encontrar diferencias significativas a favor de una mayor producción de ARNm de *pmp22* en el genotipo Trembler-J, comparado con el wt. Las diferencias a nivel transcripcional, podrían haberse debido al incremento de expresión durante la regeneración de la fibra nerviosa, ya señalada por otros autores para *pmp22* (Snipes *et al.*, 1992; De Leon *et al.*, 1991; Spreyer *et al.*, 1991; Welcher *et al.*, 1991). Sin embargo, esto no es exactamente lo que sucede en los ratones TrJ, donde hay una mielinización defectuosa e inestable, que alterna constantemente episodios de degeneración y regeneración, dando como resultado una hipomielinización crónica (Verheijen *et al.*, 2011). Al no haber observado diferencias en la cantidad de ARN mensajero de *pmp22*, estimamos muy improbable una regulación transcripcional diferencial del gen, en nervio ciático de los ratones TrJ respecto de los wt. Sin embargo, la expresión de la proteína PMP22 mostró niveles significativamente más altos en el genotipo TrJ. La mayor producción de proteínas asociada al genotipo TrJ coincide con los incrementos reportados en la formación de agregosomas (Notterpek *et al.*, 1999). Concomitantemente, se reporta un déficit en la producción de mielina, puesto que la proteína que presenta la mutación es incapaz de insertarse en la membrana (Rangaraju *et al.*, 2008; Ryan *et al.*, 2002; Notterpek *et al.*, 1999). En condiciones normales la proteína PMP22 posee una alta tasa de mal plegamiento, enviando el 80% de la proteína a las vías de degradación (Yamada *et al.*, 2003; Notterpek *et al.*, 1999; Pareek *et al.*, 1997). Tanto en condiciones patológicas de sobre-expresión de la proteína normal (ej.

CMT1A, la más frecuente neuropatía periférica humana), como de acumulación de la proteína mutada, no integrada a la membrana (ej. CMT1E humana y TrJ murina), las vías celulares de degradación de proteínas se ven colapsadas. (Ryan *et al.*, 2002). Como consecuencia, se produce una ruptura de la homeostasis celular, las proteínas no degradadas se acumulan, produciendo una alteración del tránsito intracelular (incluido su propio tránsito) y la generación de acúmulos en el Golgi (Snipes *et al.*, 1992) y en los agregosomas (Notterpek *et al.*, 1999). Se genera así un mecanismo patológico de formación de agregados intracelulares que incluyen, además de PMP22, otras proteínas celulares y mielínicas, típicamente empaquetadas por filamentos de vimentina, que caracterizan al fenotipo neurodegenerativo de la fibra nerviosa TrJ. (Ryan *et al.*, 2002).

De acuerdo a nuestros hallazgos, la modulación de *pmp22* parece no ocurrir durante la transcripción de su mensajero, sino en una instancia ulterior. Esto coincide con los hallazgos señalados en la descripción inicial del gen, cuando se lo caracterizó como perteneciente a *gas3*, en cultivos de fibroblastos NIH3T3 (Manfioletti *et al.*, 1990). Algunos autores han señalado que la transcripción de *pmp22*, parece estar mediada por el factor de transcripción EGR2, aunque a diferencia de lo que ocurre con los genes de *mpz*, *mbp* y *mag*, esta modulación no es directa. Un posible candidato involucrado en la regulación transcripcional de otros genes de proteínas mielínicas, durante el desarrollo y la diferenciación, el AMP cíclico (cAMP), no parece estar, sin embargo, involucrado en la regulación de *pmp22* (Nobbio *et al.*, 2014). La expresión de *pmp22* parece estar regulada por hormonas esteroideas en tejido no neural (Rao *et al.*, 2011). Igualmente en un contexto terapéutico, se ha señalado la regulación hormonal de la expresión de *pmp22*, en células de Schwann, activándola transitoriamente con glucocorticoides y 5 α -androstano-3 α ,17 β -diol (un metabolito de la dihidrotestosterona - Desárnaud *et al.*, 2000; Melcangi *et al.*, 2000).

Con respecto a la posibilidad de que PMP22 pueda actuar como regulador de la expresión génica, nuestro grupo reportó la presencia nuclear tanto del transcripto, como de la proteína PMP22 (o al menos del segmento carboxilo terminal reconocido por los anticuerpo comerciales anti PMP22 que hemos utilizado) (Kun *et al.*, 2012). Sin embargo el análisis *in-silico* de la proteína sólo mostró un dominio conservado de tipo Claudina. No se demostró la presencia de una señal de localización nuclear, ni de otro tipo de dominio específico conservado, con predicción de interactuar como regulador de expresión genica. La estructura predicha coincide con los descrito para PMP22, proteína que integra la mielina, formando dímeros contiguos (en cis) y participa de uniones estrechas de la mielina del SNP (Nave & Werner, 2014; Oguievetskaia & Goutebroze, 2006; Arroyo & Scherer, 2000). El primer bucle extracelular mediaría interacciones homofílicas consigo misma y el segundo mediaría interacciones heterofílicas con MPZ (Hasse *et al.*, 2004).

En cuanto a los niveles de ARN mensajero de *mag*, se encuentran incrementados en un modelo murino de CMT1A (ratones C22), donde existe una expresión supernumeraria del alelo normal de *pmp22* humano (Kinter *et al.*, 2013), por ello esperabamos un aumento en los niveles de este mensajero. Sin embargo en nervios ciáticos de ratones TrJ, no encontramos diferencias significativas en los niveles de ARNm de *mag*, al compararlos con los wt. Esto tal vez se deba a qué, si bien ambos tipos de ratón son modelo de CMT, son diferentes, un modelo sobre-expresa PMP22 (CMT1A) y el otro presenta una mutación puntual (CMT1E). Con respecto a la expresión de la proteína MAG, encontramos niveles significativamente más altos en ciáticos provenientes de ratones TrJ. Este resultado verifica hallazgos preliminares realizados durante mi Tesis de Grado, en células de Schwann TrJ comparadas con wt. Es interesante señalar que en el cultivo primario de CS, a diferencia de lo que ocurre en la fibra nerviosa donde el ciclo celular está detenido, las células se encontraban en fase proliferativa. Esto indicaría que las diferencias en la expresión de MAG, no están asociadas a la presencia del axón, sino que se correspondería con una regulación intrínseca de la CS y diferencial en el genotipo TrJ respecto del wt. Niveles más altos de

MAG también fueron descritos en nervios ciáticos de ratones C22 y Tr (Kinter *et al.*, 2013; Bürgisser *et al.*, 1987; Inuzuka *et al.*, 1985). Sin embargo, se ha propuesto que el aumento de MAG, se produciría como una reacción compensatoria, para mantener la integridad de la relación axo-glial (Kinter *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta que en los ratones TrJ hay una mayor cantidad de la proteína MAG, pero no de su mensajero, pensamos que *mag* tiene una regulación pos-transcripcional diferencial en ratones TrJ.

Cuando analizamos los resultados del mensajero de Vimentina, hallamos que tanto el TrJ como el wt, poseen la misma cantidad de este mensajero, sin embargo el TrJ posee más cantidad de proteína que el wt. La diferencia en cuanto a cantidad de esta proteína es un resultado que esperabamos, debido a que la Vimentina se encuentra empaquetando los agregosomas presentes en el TrJ (Rangaraju *et al.*, 2008; Fortun *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2002; Notterpek *et al.*, 1999). Para esta proteína, al igual que para las anteriormente observadas, parecería haber una regulación postranscripcional diferencial entre TrJ y Wt.

MBP, una proteína mielinica, que representa alrededor de 25% del total de proteínas mielinicas del SNP, en condiciones normales (Sherman *et al.*, 2003, Arroyo & Scherer., 2002), se encuentra alterada en numerosas mielinopatías (Jacque *et al.*, 1983), incluidos los modelos en Tr y TrJ, donde su expresión está disminuída (Adlkofer *et al.*, 1997). Nosotros no encontramos diferencias significativas en la expresión del ARNm de *mbp*, entre el genotipo TrJ y wt. Es muy probable que las diferencias señaladas en la literatura, entre TrJ y wt, a nivel de la expresión de la proteína MBP, se deban igualmente a una regulación a nivel postranscripcional.

A nivel del axón (el componente neuronal presente en la fibra nerviosa), hemos explorado parcialmente la expresión de la subunidad menor de los neurofilamentos (NF68), elemento crucial del citoesqueleto axonal. Su expresión está relacionada con la tensión estructural y acompaña el

desarrollo normal y el brotamiento axonal, especialmente presente cuando la CS por diferentes razones, deja de ejercer su rol inhibitorio sobre el axón. En este sentido, la desmielinización glial presente en ratones de genotipo Trembler se ha asociado a cambios en el citoesqueleto de los filamentos intermedios axonales (neurofilamentos), especialmente en su organización, niveles de fosforilación, espaciamiento y cantidad de neurofilamentos (Hsieh *et al.*, 1994). Nuestro grupo ha encontrado diferencias significativas en la expresión de NF-68 entre los genotipo TrJ y wt, que describen importantes incrementos de esta proteínas asociadas al genotipo mutante (datos no publicados). En nuestra aproximación actual, hemos verificado este hallazgo a nivel molecular mediante WB. La mayor cantidad de NF68 asociada al genotipo TrJ mostró diferencias significativas respecto del genotipo salvaje. Deseamos en un futuro cercano poder relacionarlo con los niveles de expresión del ARNm codificando para esta proteína.

Con el fin de aportar más información acerca del proceso mismo de la transcripción y de la traducción, analizamos los niveles de expresión de los ARN mensajeros de los factores E2F8 y EIF3E, de inicio de la transcripción y de la traducción respectivamente, en nervio ciático de ratones TrJ y wt.

E2F8 es un factor de transcripción atípico, que participa en varios procesos como ser la angiogénesis y poliploidización de células especializadas (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q58FA4>). Principalmente actúa como represor de la transcripción, uniéndose a ADN independiente de factores de transcripción DP (un complejo multiproteico que puede actuar tanto como activador, como represor de la transcripción dependiendo del contexto) y específicamente reconoce el sitio de reconocimiento E2 (5'-TTTC[CG]CGC-3') (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q58FA4>).

EIF3E es un componente del factor de inicio de la traducción eucariotica 3 (EIF-3), el cual es requerido para muchas etapas de inicio de la síntesis proteica (<http://www.uniprot.org/uniprot/P60228>). El complejo EIF-3 se asocia con el 40S ribosomal, reclutando otros factores de inicio de la traducción, formando el complejo 43S de preiniciación

(<http://www.uniprot.org/uniprot/P60228>). Nuestros resultados indican que no hay diferencias, a nivel de los ARNm de estos factores, en nervios ciáticos de ratones TrJ respecto a wt. Lo cual no descarta que haya diferencias a nivel de las proteínas de estos mensajeros o que haya otro componente alterado de alguna de las dos vías.

Considerando que los ratones TrJ desarrollan una mielinopatía hipomielinizante, se podría especular sobre un incremento en el número de mitocondrias, aunque en la literatura esto aún no ha sido descrito, para CMT1E. En nervio ciático de ratones Tr de 15 días de edad (portadores de una mutación G150D en el tercer dominio transmembrana de PMP22), se ha señalado un aumento de 2 a 3 veces del consumo de oxígeno, aunque no se ha descrito un incremento específico en el número de mitocondrias (Matthieu *et al.*, 1981). Nuestros resultados indican una notable regulación a la baja en la expresión del gen de *cytb*, codificado por el cromosoma mitocondrial, asociado al genotipo TrJ. Esta disminución en la producción de ARNm del *cytb* en TrJ, representa un cuarto del nivel del ARNm observado en el genotipo wt. No hemos analizado cuantitativamente la presencia de mitocondrias, ni su eventual alteración estructural, en el genotipo TrJ. Pero esto constituirá un objetivo en el futuro inmediato, con el fin de determinar alteraciones mitocondriales presentes en este modelo murino.

El análisis de la traducción, fue enfocado en la cuantificación de ribosomas, en donde encontramos un aumento en la marcación de ribosomas totales al comparar la fibra nerviosa TrJ respecto de la wt. Observamos una diferente distribución de la señal, obtenida por IHQ, en los dominios gliales, respecto de los axonales, que fueron significativamente mayores en el TrJ, siendo los dominios axonales los que mostraron los mayores niveles y la mayor diferencia respecto del wt. El análisis bioquímico de la expresión de las proteínas ribosomales ácidas P, por WB, mostró en nervio ciático TrJ un aumento significativo de la proteína P0, una tendencia al aumento de P1, e iguales cantidades de P2, al compararlo con wt. Recientemente, ha sido descrito en la literatura un aumento en la cantidad de ribosomas en la fibra

nerviosa, incluido los dominios axonales, en donde se describieron polirribosomas por microscopía electrónica de transmisión, en enfermedades neurodegenerativas, incluida CMT (Verheijen *et al.*, 2011 & 2014). En ratones TrJ ha sido señalado un incremento de la ribofagia, mecanismo señalado como inicial en la respuesta autofágica, en respuesta a la saturación de las vías canónicas de degradación, generado por el mal plegamiento y acumulación de PMP22 normal y mutada (Fortun *et al.*, 2007). Así, en base a nuestros resultados y a lo señalado en la literatura, hipotetizamos sobre los hallazgos vinculados a los niveles de expresión ribosomal en la fibra nerviosa periférica, lo siguiente: 1) Parte del aumento en la señal de ribosomas, estaría dada por ribosomas incompletos, que podrían estar en vías de degradación, vinculados al evento de la ribofagia. A esto atribuimos las diferencias en la relación entre las proteínas ribosomales P observadas, por WB entre, TrJ y wt. Y 2) Si los ribosomas tuvieran igual constitución en ambos genotipos, y fueran igualmente funcionales, se podría estar produciendo un aumento en la tasa de traducción, debido al aumento de la marcación para ribosomas, que eventualmente estarían formando polisomas como lo señalado en la literatura para CMT. En este sentido es importante señalar, que en las células eucariotas la mayoría de los ribosomas traduccionalmente activos, se encuentran formando polisomas (Liu & Qian, 2016).

El análisis de las proteínas totales del nervio ciático de ratones TrJ y wt, mostró cambios en cuanto a las intensidades de bandeos en el gel SDS-PAGE, teñido con azul de Coomassie. Se observó un aumento de intensidad en bandas de alrededor de 70 KDa en TrJ respecto de wt y una disminución en bandas de alrededor de 30 kDa en TrJ respecto de wt. Este resultado es coincidente con lo señalado por Bürgisser y colaboradores para ratones Tr, en donde observan, un aumento en bandas de alrededor de 67 KDa, una disminución en bandas de 27 KDa, comparados con el genotipo salvaje, estos autores atribuyen estas diferencias a una disminución en MPZ, a su vez aprecian un aumento en bandas inferiores a 20 KDa, que asocian, en parte, a un aumento de histonas en ratones Tr respecto a wt (Bürgisser *et al.*, 1987),

a una disminución de la sintetasa de palmitoil –CoA (Cantrill *et al.*, 1982), a un aumento de la síntesis y degradación de estearoil-CoA (Boiron *et al.*, 1984) y a una menor cantidad de bomba de sodio/potasio ATPasa (Bürgisser *et al.*, 1987). La caracterización molecular específica por espectrometría de masa será un paso ineludible para discernir con claridad estas diferencias.

8.- Conclusiones:

1. No encontramos diferencias en la expresión de los ARNm de los genes *pmp22*, *mbp*, *mag*, *vim*, *e2f8* y *eif3E*, entre fibras nerviosas TrJ y wt. Sin embargo, encontramos una disminución significativa a nivel transcripcional para el gen mitocondrial del *cytb*, lo cual podría implicar una deficiencia en la actividad mitocondrial.
2. Las proteínas MAG, PMP22, VIM y MBP, implicadas en el mantenimiento de la estructura de la fibra nerviosa, poseen una traducción diferencial en los nervio ciáticos TrJ respecto del wt.
3. La expresión de la proteína NF-68 está incrementada en fibras de nervio ciático TrJ respecto del wt.
4. Las proteínas ribosomales P muestran diferentes correlaciones en el genotipo TrJ comparadas con el wt.
5. No descartamos la existencia de una regulación transcripcional mediada por PMP22. Sin embargo, consideramos que no tenemos evidencia suficiente que apoye este tipo de mecanismo en fibras nerviosas periféricas.

9.- Perspectivas:

1. Determinar la existencia de eventuales diferencias a nivel del transcriptoma, entre ratones TrJ y wt, mediante secuenciación masiva

del transcriptoma. De especial interés serían las diferencias en otros mensajeros codificantes para proteínas de la cadena respiratoria entre estos genotipos.

2. Identificar mediante espectrometría de masa las proteínas mayoritarias en las bandas que presentan una marcada diferencial en el SDS PAGE (en nervio ciático entre genotipo TrJ y wt). Y cuantificarlas por WB. Complementariamente, analizaríamos estas diferencias para ver si se ven reflejadas al nivel del transcrito, mediante qPCR.
3. Realizar análisis de coinmunoprecipitación utilizando un anticuerpo contra PMP22, para establecer interacciones físicas con otras proteínas y analizar si alguna de estas interacciones podría influenciar en la regulación de la expresión génica.
4. Realizar purificación de ribosomas a partir de nervios ciáticos provenientes de ratones TrJ y wt y estudiar su funcionalidad *in vitro*.
5. Realizar estudios de cuantificación y distribución de mitocondrias, en nervios ciáticos de ratones TrJ y wt, mediante inmunomicroscopía confocal y microscopía electrónica de transmisión.
6. Realizar análisis de respiración mitocondrial, mediante el estudio de los componentes de la cadena respiratoria utilizando el equipo Oxygraph 2 K (Oroboros Instruments Corp). Estos dos últimos análisis serán realizados con el fin de describir posibles alteraciones mitocondriales en el fenotipo TrJ.

10.- Referencias Bibliograficas:

Adlkofer, K.; Naef, R.; Suter, U. (1997). Analysis of compound heterozygous mice reveals that Trembler mutation can behave as a gain of function allele. *J Neurosci Res.* 1997 Sep 15;49(6):671-80.

Allodi, L.; Udina, E.; Navarro, X. (2012). Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. *Prog. Neurobiol.* 2012 Jul 98(1):16-37. doi: 10.1016/j.pneurobio.2012.05.005. Epub 2012 May 15.

Amici, S.A.; Dunn, W.A. Jr.; Notterpek, L. (2007) Developmental abnormalities in the nerves of peripheral myelin protein 22-deficient mice. *J Neurosci Res.* 2007 Feb 1;85(2):238-49.

Anelli, T.; Sitia, R. (2008) Protein quality control in the early secretory pathway. *EMBO J.* 2008 Jan 23;27(2):315-27. doi: 10.1038/sj.emboj.7601974.

Argall, K.G.; Armati, P.J.; Pollard, J.D.; Watson, E.; Bonner, J. (1992) Interactions between CD4+ T-cells and rat Schwann cells in vitro. 1. Antigen presentation by Lewis rat Schwann cells to P2-specific CD4+ T-cell lines. *J Neuroimmunol.* 1992 Sep;40(1):1-18.

Armati, P.J.; Pollard, J.D.; Gatenby, P. (1990) Rat and human Schwann cells in vitro can synthesize and express MHC molecules. *Muscle Nerve.* 1990 Feb;13(2):106-16.

Armati, P.J.; Pollard, J.D. (1996) Immunology of the Schwann cell. *Bailliers Clin Neurol.* 1996 Mar;5(1):47-64.

Armati, P.J. (2007). The biology of the schwann cell development differentiation and immunomodulation.

Arroyo, E.J.; Scherer S.S. (2000) On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem Cell Biol.* 2000 Jan;113(1):1-18.

Attardi, L.D.; Reczek, E.E.; Cosmas, C.; Demicco, E.G.; McCurrach, M.E.; Lowe, S.W.; Jacks, T. (2000) PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family. *Genes Dev.* 2000 Mar 15;14(6):704-18.

Bachelin, C.; Lachapelle, F.; Girard, C.; Moissonnier, P.; Seguera-Lagache, C.; Mallet, J.; Fontaine, D.; Chojnowski, A.; Le Guern, E.; Nait-Oumesmar, B.; Baron-Van Evercooren, A. (2005) Efficient myelin repair in the macaque spinal cord by autologous grafts of Schwann cells. *Brain.* 2005 Mar;128(Pt 3):540-9. Epub 2005 Feb 2.

Banchs, L.; Casasnovas, C.; Albertí, A.; De Jorge, L.; Povedano, M.; Montero, J.; Martínez-Matos, J.A.; Volpini, V. (2009) Diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease. *J Biomed Biotechnol.* 2009;2009:985415. doi: 10.1155/2009/985415. Epub 2009 Oct 8.

Baechner, D.; Liehr, T.; Hameister, H.; Altenberger, H.; Grehl, H.; Suter, U.; Rautenstrauss, B. (1995) Widespread expression of the peripheral myelin protein-22 gene (PMP22) in neural and non-neural tissues during murine development. *J Neurosci Res.* 1995 Dec 15;42(6):733-41.

Berthold, C.H.; Fraher, J.P.; King, R.H.; Rydmark, M. (2005) Microscopic anatomy of the peripheral nervous system. *Peripheral Neuropathy*. 4th Edn, Elsevier Saunders, Philadelphia, P.A., pp3592.

Bird, T.D. 2013(1998) Charcot-Marie-Tooth Hereditary Neuropathy Overview. 1998 [Updated 2013]. In: Pagon, R.A.; Adam, M.P.; Ardinger, H.H.; Wallace, S.E.; Amemiya, A.; Bean, J.H.L.; Bird, T.D.; Fong, C.T.; Mefford, H.C.; Smith, R.J.H.; Stephens, K. editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1358/>

Boiron, F.; Heape, M.A.; Cassagne, C. (1984). Assay stearyl-CoA synthesis in microsomes from normal and Trembler mouse sciatic nerves. *Neurosci Lett.* 1984 Jul 13;48(1):7-12.

Brancolini, C.; Edomi, P.; Marzinotto, S.; Schneider, C. (2000) Exposure at the cell surface is required for gas3/PMP22 To regulate both cell death and cell spreading: implication for the Charcot-Marie-Tooth type 1A and Dejerine-Sottas diseases. *Mol Biol Cell.* 2000 Sep;11(9):2901-14.

Bryan, D.J.; Litchfield, C.R.; Manchio, J.V.; Logvinenko, T.; Holoway, A.H.; Austin, J.; Summerhayes, I.C.; Rieger-Christ, K.M. (2012) Spatiotemporal expression profiling of proteins in rat sciatic nerve regeneration using reverse phase protein arrays. *Proteome Sci.* 2012 Feb 10;10(1):9. doi: 10.1186/1477-5956-10-9.

Buchberg, A.M.; Brownell, E.; Nagata, S.; Jenkins, N.A.; Copeland, N.G. (1989). A comprehensive genetic map of murine chromosome 11 reveals extensive linkage conservation between mouse and human. *Genetics.* 1989 May;122(1):153-61.

Bürgisser, P.; Greering, K.; Rossier, B.C.; Matthieu, J.M. (1987). Three ATPase activities have an abnormal developmental time course in trembler sciatic nerves. *Dev Neurosci.* 1987;9(1):45-52.

Cantrill, R.C.; Bourre, J.M.; Boutry, J.M.; Hauw, J.J. (1982). A comparison of fatty acid activation in sciatic nerve and Schwann cell rich cultures from normal and trembler mice. *Neurosci Lett.* 1982 Aug 16;31(2):185-8.

Casasnovas, C.; Cano, L.M.; Albertí, A.; Céspedes, M.; Rigo, G. (2008) Charcot-Marie-Tooth disease. *Foot Ankle Spec.* 2008 Dec;1(6):350-4. doi: 10.1177/1938640008326247. Epub 2008 Oct 22.

Chies, R.; Nobbio, L.; Edomi, P.; Schenone, A.; Schneider, C.; Brancolini, C. (2003). Alterations in the Arf6-regulated plasma membrane endosomal recycling pathway in cells overexpressing the tetraspan protein Gas3/PMP22. *J Cell Sci.* 2003 Mar 15;116(Pt 6):987-99.

Chan, J.R.; Watkins, T.A.; Cosgaya, J.M.; Zhang, C.; Chen, L.; Reichardt, L.F.; Shooter, E.M.; Barres, B.A. (2004) NGF controls axonal receptivity to myelination by Schwann cells or oligodendrocytes. *Neuron.* 2004 Jul 22;43(2):183-91.

Chan, J.R.; Jolicoeur, C.; Yamauchi, J.; Elliott, J.; Fawcett, J.P.; Ng, B.K.; Cayouette, M. (2006). The polarity protein Par-3 directly interacts with p75NTR to regulate myelination. *Science.* 2006 Nov 3;314(5800):832-6.

Corfas, G.; Velardez, M.O.; Ko, C.P.; Ratner, N.; Peles, E. (2004). Mechanisms and roles of axonSchwann cell interactions. *J Neurosci.* 2004 Oct 20;24(42):9250-60.

De Leon, M.; Welcher, A.A.; Suter, U.; Shooter, E.M. (1991). Identification of transcriptionally regulated genes after sciatic nerve injury. *J Neurosci Res.* 1991 Aug;29(4):437-48.

Désarnaud, F.; Bidichandani, S.; Patel, P.I.; Baulieu, E.E.; Schumacher, M. (2000). Glucocorticosteroids stimulate the activity of the promoters of peripheral myelin protein-22 and protein zero genes in Schwann cells. *Brain Res.* 2000 May 19;865(1):12-6.

D'Urso, D.; Müller, H.W. (1997). Ins and outs of peripheral myelin protein-22: mapping transmembrane topology and intracellular sorting. *J Neurosci Res.* 1997 Sep 1;49(5):551-62.

Dyck, P.J. (1975). Inherited neuronal degeneration and atrophy affecting peripheral motor, sensory, and autonomic neurons. *Peripheral Neuropathy*, Eds: Dyck P.J., Thomas P.K., Lambert E.H.), Ed Philadelphia and London: W.B. Saunders Co., 825-867.

Fannon, A.M.; Sherman, D.L.; Ilyina-Gragerova, G.; Brophy, P.J.; Friedrich, V.L.Jr.; Colman, D.R. (1995). Novel E-cadherin-mediated adhesion in peripheral nerve: Schwann cell architecture is stabilized by autotypic adherens junctions. *J Cell Biol.* 1995 Apr;129(1):189-202.

Fortun, J.; Li, J.; Go, J.; Fenstermaker, A.; Fletcher, B.S.; Notterpek, L. (2005). Impaired proteasome activity and accumulation of ubiquitinated substrates in a hereditary neuropathy model. *J Neurochem.* 2005 Mar;92(6):1531-41.

Fortun, J.; Verrier, J.D.; Go, J.C.; Madorsky, I.; Dunn, W.A.; 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.* 2007 Feb;25(2):252-65. Epub 2006 Dec 13.

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

Giambonini-Brugnoli, G.; Buchstaller, J.; Sommer, L.; Suter, U.; Mantej, N. (2005) Distinct disease mechanisms in peripheral neuropathies due to altered peripheral myelin protein 22 gene dosage or Pmp22 point mutation. *Neurobiol Dis.* 2005 Apr;18(3):656-68.

Girard, C.; Bemelmans, A.P.; Dufour, N.; Mallet, J.; Bachelin, C.; Nait-Ousmesmar, B.; Baron-Vann Evercooren, A.; Lachapelle, F. (2005). Grafts of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin 3-transduced primate Schwann cells lead to functional recovery of the demyelinated mouse spinal cord. *J Neurosci.* 2005 Aug 31;25(35):7924-33.

Gold, R.; Toyka, K.V.; Hartung, H.P. (1995). Synergistic effect of IFN-gamma and TNF-alpha on expression of immune molecules and antigen presentation by Schwann cells. *Cell Immunol.* 1995 Oct 1;165(1):65-70.

Gonzalez-Perez, F.; Udina, E.; Navarro, X. (2013) Extracellular matrix components in peripheral nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol.* 2013;108:257-75.
doi: 10.1016/B978-0-12-410499-0.00010-1.

Hall, S.M.; Williams, P.L. (1970). Studies on the "incisures" of Schmidt and Lanterman. *J Cell Sci.* 1970 May;6(3):767-91.

Hanani, M. (2005). Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res Brain Res Rev.* 2005 Jun;48(3):457-76.

Hasse, B.; Bosse, F.; Hanenberg, H.; Müller, H.W. (2004). Peripheral myelin protein 22 kDa and protein zero: domain specific transinteractions. *Mol Cell Neurosci.* 2004 Dec;27(4):370-8.

Heape, A.; Juguelin, H.; Fabre, M.; Boiron, F.; Cassagne, C. (1986). A quantitative developmental study of the peripheral nerve lipid composition during myelinogenesis in normal and trembler mice. *Brain Res.* 1986 Mar;390(2):181-9.

Henry, E.W.; Sidman, R.L. (1983). The murine mutation trembler-J: proof of semidominant expression by use of the linked vestigial tail marker. *J Neurogenet.* 1983 Sep;1(1):39-52.

Hogan, V.; White, K.; Edgard, J.; McGill, A.; Karim, S.; McLaughlin, M.; Griffiths, L.; Turnbull, D.; Nichols, P. (2009). Increased in mitochondrial density within axons and supporting cells in response to demyelination in the Plp 1 mouse model. *J Neurosci Res.* 2009 Feb;87(2):452-9. doi: 10.1002/jnr.21867.

Hsieh, S.T.; Kidd, G.J., Crawford, T.O.; Xu, Z.; Lin, W.M.; Trapp, B.D.; Cleveland, D.W.; Griffin, J.W. (1994). Regional modulation of neurofilament organization by myelination in normal axons. *J Neurosci.* 1994 Nov;14(11 Pt 1):6392-401.

<http://www.uniprot.org/uniprot/Q58FA4>

<http://www.uniprot.org/uniprot/P60228>

Inuzuka, T.; Quarles, R.H.; Heath, J.; Trapp, B.D. (1985). Myelin-associated glycoprotein and other proteins in Trembler mice. *J Neurochem.* 1985 Mar;44(3):793-7.

Itou, J.; Suyama, M.; Imamura, Y.; Deguchi, T.; Fujimori, K.; Yuba, S.; Kawarabayasi, Y.; Kawasaki, T. (1985). Functional and comparative genomics analysis of pmp22 in medaka fish. *BMC Neurosci.* 2009 Jun 17;10:60. doi: 10.1186/1471-2202-10-60.

Jacobs, J. M. & Love, S. (1985). Qualitative and quantitative morphology of human sural nerve at different ages. *Brain.* 1985 Dec;108 (Pt 4):897-924.

Jacque, C.; Delassalle, A.; Raoul, M.; Baumann, N. (1983). Myelin basic protein deposition in the optic and sciatic nerves of dysmyelinating mutants quaking, jimpy, Trembler, mld, and shiverer during development. *J Neurochem.* 1983 Nov;41(5):1335-40.

Jessen, K.R. & Mirsky, R. (2005) The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci.* 2005 Sep;6(9):671-82.

Jetten, A.M.; Suter, U. (2000) The peripheral myelin protein 22 and epithelial membrane protein family. *Prog Nucleic Acids Res Mol Biol.* 2000;64:97-129.

King, R. (2013) Microscopic anatomy: normal structure. *Peripheral Nerve Disorders. Handbook of Clinical Neurology.* Publicado por Aminoff, M.J.; Boller, F.; Swaab, D.F. Volumen 115, capítulo 2.

Kinter, J.; Lazzati, T.; Schmid, D.; Zeis, T.; Erne, B.; Lützeischwab, R.; Steck, A.J.; Payerson, D.; Peles, E.; Schaeren-Wiemers, N. (2013). An essential role of MAG in mediating axon-myelin attachment in Charcot-Marie-Tooth 1A disease. *Neurobiol Dis.* 2013 Jan;49:221-31. doi: 10.1016/j.nbd.2012.08.009. Epub 2012 Aug 25.

Koirala, S.; Reddy, L.V.; Ko, C.P. (2003). Roles of glial cells in the formation, function, and maintenance of the neuromuscular junction. *J Neurocytol.* 2003 Jun-Sep;32(5-8):987-1002.

Kun, A.; Calnclini, L.; Rosso, G.; Bresque, M.; Romeo, C.; Cal, K.; Calliari, A.; Sotelo Silveira, J.; Sotelo, J.R.(2012) The Schwann Cell-Axon Link in Normal Condition or Neuro-Degenerative Diseases: An Immunocytochemical Approach

Lai, C.; Brown, M.A.; Nave, K.A.; Noronha, A.B.; Quarles, R.H.; Bloom, F.E.; Milner, R.J.; Sutcliffe, J.G. (1987) Two forms of 1B236/myelin-associated glycoprotein, a cell adhesion molecule for postnatal neural development, are produced by alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987 Jun;84(12):4337-41.

Lambert, E.H.; Dyck, P.J. (1968) Compound action potentials of human sural nerve biopsies. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 1968 Oct;25(4):399-400.

Lees, M.B.; S . W. Brostoff. (1984). Protein s of myelin . In *Myelin*. P. Morell, editor. Plenum Publishing Corp ., New York . 197-224 .

Lemke, G.; Lamar, E.; Patterson, J. (1988) Isolation and analysis of the gene encoding peripheral myelin protein zero. *Neuron.* 1988 Mar;1(1):73-83.

Lemke, G. (2001). Glial control of neuronal development. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:87-105.

Li, J.; Parker, B.; Martyn, C.; Natarajan, C.; Guo, J. (2013) The PMP22 gene and its related diseases. *Mol Neurobiol.* 2013 Apr;47(2):673-98. doi: 10.1007/s12035-012-8370-x. Epub 2012 Dec 7.

Lilje, O.; Armati, P.J. (1997). The distribution and abundance of MHC and ICAM-1 on Schwann cells in vitro. *J Neuroimmunol.* 1997 Jul;77(1):75-84.

Liu, B.; Qian, S.B. (2016). Characterizing inactive ribosomes in translational profiling. *Translation (Austin).* 2016 Jan 8;4(1):e1138018. doi: 10.1080/21690731.2015.1138018.

Low, P.A. (1976). Hereditary hypertropic neuropathy in the trembler mouse. Part2. Histopathological studies: electron microscopy. *J Neurol Sci.* 1976 Dec;30(2-3):343-68.

Maier, M.; Berger, P.; Suter, U. (2002) Understanding Schwann cell-neurone interactions: the key to Charcot-Marie-Tooth disease? *J Anat.* 2002 Apr;200(4):357-66.

Manfioletti, G.; Ruaro, M.E.; Del Sal, G.; Philipson, L.; Schneider, C. (1990) A growth arrest-specific (gas) gene codes for a membrane protein. *Mol Cell Biol.* 1990 Jun;10(6):2924-30.

Martin, I.; Nguyen, T.D.; Krell, V.; Greiner, J.F.; Müller, J.; Hauser, S.; Heimann, P.; Widera, D. (2012). Generation of the Schwann cell-derived multipotent neurospheres isolated from intact sciatic nerve. *Stem Cell Rev.* 2012 Dec;8(4):1178-87. doi: 10.1007/s12015-012-9387-2.

Matthieu, J.M.; Reigner, J.; Costantino-Ceccarini, E.; Bourre, J.M.; Rutti, M. (1980). Abnormal sulfate metabolism in hereditary demyelinating neuropathy. *Brain Res.* 1980 Nov 3;200(2):457-65.

Matthieu, J.M.; Markert, M.; Vanier, M.T.; Rutti, M.; Reigner, J.; Bourre, J.M. (1981). Lipid metabolism and oxygen consumption in hereditary demyelinating neuropathy, the trembler mouse: an in vitro study. *Brain Res.* 1981 Dec 7;226(1-2):235-44.

Mäurer, M.; Toyka, K.V.; Gold, R. (2002). Cellular immunity in inflammatory autoimmune neuropathies. *Rev Neurol (Paris).* 2002 Dec;158(12 Pt 2):S7-15.

Meier, C.; Parmentier, E.; Brennan, A.; Mirsky, R.; Jessen, K.R. (1999) Developing Schwann cells acquire the ability to survive without axons by establishing an autocrine circuit involving insulin-like growth factor, neurotrophin-3, and platelet-derived growth factor-BB. *J Neurosci.* 1999 May 15;19(10):3847-59.

Melcangi, R.C.; Magnaghi, V.; Galbiati, M.; Ghelarducci, B.; Sebastiani, L.; Martini, L. (2000). The action of steroid hormones on peripheral myelin proteins: a possible new tool for the rebuilding of myelin?. *J Neurocytol.* 2000 May-Jun;29(5-6):327-39.

Michailov, G.V.; Sereda, M.W.; Brinkmann, B.G.; Fischer, T.M.; Haug, B.; Birchmeier, C.; Role, L.; Lai, C.; Schwan, M.H., Nave, K.A. (2004). Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science.* 2004 Apr 30;304(5671):700-3. Epub 2004 Mar 25.

Mobley, C.K.; Myers, J.K.; Hadziselmovic, A.; Ellis C.D.; Sanders, C.R. (2007) Purification and initiation of Structural Characterization of Human Peripheral Myelin Protein 22 an Integral Membrane Protein Linked to Peripheral Neuropathies. *Biochemistry.* 2007 Oct 2;46(39):11185-95. Epub 2007 Sep 7.

Myers, J.K.; Mobley, C.K.; Sanders, C.R. (2008) The peripheral neuropathy-linked Trembler and Trembler-J mutant forms of peripheral myelin protein 22 are folding-destabilized. *Biochemistry.* 2008 Oct 7;47(40):10620-9. doi: 10.1021/bi801157p. Epub 2008 Sep 17.

Nave, K.A.; Sereda, M.W.; Ehrenreich, H. (2007) Mechanisms of disease: inherited demyelinating neuropathies—from basic to clinical research. *Nat Clin Pract Neurol.* 2007 Aug;3(8):453-64.

Nave, K.A.; Werner, B.H. (2014). Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2014;30:503-33. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013101.

Nobbio, L.; Visigalli, D.; Radice, D.; Fiorina, E.; Solari, A.; Lauria, G.; Reilly, M.M.; Santoro, L.; Schenone, A.; Pareyson, D.; CMT-TRIAAL Group. (2014). PMP22 messenger RNA levels in skin biopsies: testing the effectiveness of the Charcot-Mari-Tooth 1Ambiomarker. *Brain.* 2014 Jun;137(Pt 6):1614-20. doi: 10.1093/brain/awu071. Epub 2014 May 8.

Notterpek, L.; Ryan, M.C.; Tobler, A.R.; Shooter, E.M. (1999). PMP22 accumulation in aggresomes: implications for CMT1A pathology. *Neurobiol Dis.* 1999 Oct;6(5):450-60.

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

Nguyen, Q.T., Sanes, J.R.; Lichtman, J.W. (2002). Pre-existing pathways promote precise projection patterns. *Nat Neurosci.* 2002 Sep;5(9):861-7.

Niemann, A.; Berger, P.; Suter, U. (2006) Pathomechanisms of mutations in Charcot-Marie-Tooth disease. *Nueromolecular Med.* 2006;8(1-2):217-42.
Notterpek, L.; Ryan, M.C.; Tobler, A.R.; Shooter, E.M. (1999). PMP22 accumulation in aggresomes: implications for CMT1A pathology. *Neurobiol Dis.* 1999 Oct;6(5):450-60.

Ohsawa, Y.; Murakami, T.; Miyazaki, Y.; Shirabe, T.; Sunda, Y. (2006). Peripheral myelin protein 22 is expressed in human central nervous system. *J Neurol Sci.* 2006 Aug 15;247(1):11-5. Epub 2006 Apr 19.

Oguievetskaia, K.; Goutebroze, L. (2006). Cellular contacts in myelinated fibers of the peripheral nervous system. *J Soc Biol.* 2006;200(4):281-92.

Pareek, S.; Suter, U.; Snipes, G.J.; Welcher, A.A.; Shooter, E.M.; Murphy, R.A. (1993) Detection and processing of peripheral myelin protein PMP22 in cultured Schwann cells. *J Biol Chem* 1993 May 15;268(14):10372-9.

Pareek, S.; Notterpek, L.; Snipes, G.J.; Naef, R.; Sossin, W.; Laliberté, J.; Iacampo, S.; Suter, U.; Shooter, E.M.; Murphy, R.A. (1997). Neurons promote the translocation of peripheral myelin protein 22 into myelin. *J Neurosci.* 1997 Oct 15;17(20):7754-62.

Parmantier, E.; Cabon, F.; Braun, C.; D'Urso, D.; Müller, H.W.; Zalc, B. (1995) Peripheral Myelin Protein-22 is Expressed in Rat and Mouse Brain and Spinal Cord Motoneurons. *Eur J Neurosci.* 1995 May 1;7(5):1080-8.

Patel, P.I.; Lupski, J.R. (1994) Charcot-Marie-Tooth disease: a new paradigm for de mechanism of de inherited disease. *Trends Genet.* 1994 Apr;10(4):128-33.

Peles, E.; Salzer, J.L. (2000) Molecular domains of myelinated axons. *Curr Opin Neurobiol.* 2000 Oct;10(5):558-65.

Pereira, J.A.; Baumann, R.; Normén, C.; Somandin, C.; Miehle, M.; Jacob, C.; Lühmann, T.; Hall-Bozic, H.; Mantei, N.; Meijer, D.; Suter, U. (2010). Dicer in Schwann cells is required for myelination and axonal integrity. *J Neurosci.* 2010 May 12;30(19):6763-75. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0801-10.2010.

Poliak, S.; Peles, E. (2003) The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci.* 2003 Dec;4(12):968-80.

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

Quintes, S.; Goebbels, S.; Saher, G.; Schwab, M.H.; Nave, K.A. (2010) Neuron-glia signaling and the protection of axon function by Schwann cells. *J Peripher Nerv Syst.* 2010 Mar;15(1):10-6. doi: 10.1111/j.1529-8027.2010.00247.x.

Rao, R.G.; Sudhakar, D.; Hogue, C.P.; Amici, S.; Gordon, L.K.; Braun, J.; Notterpek, L.; Goodglick, L.; Wadehra, M. (2011). Peripheral myelin protein-22 (PMP22) modulates alpha 6 integrin expression in the human endometrium. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011 Apr 25;9:56. doi: 10.1186/1477-7827-9-56.

Ravera, S.; Nobbio, L.; Visigalli, D.; Bartolucci, M.; Calzia, D.; Florese, F.; Mancardi, G.; Schenone, A.; Morelli, A.; Panfolio, L. (2013). Oxidative phosphorylation in sciatic nerve myelin and its impairment in a model of dysmyelinating peripheral neuropathy. *J Neurochem.* 2013 Jul;126(1):82-92. doi: 10.1111/jnc.12253. Epub 2013 Apr 30.

Rangaraju, S.; Hankins, D.; Madorsky, I.; Madorsky, E.; Lee, W.H.; Carter, C.S.; Leeuwenburgh, C.; Notterpek, L. (2008). Molecular architecture of myelinated peripheral nerves is supported by calorie restriction with aging. *Aging Cell.* 2009 Apr;8(2):178-91. doi: 10.1111/j.1474-9726.2009.00460.x. Epub 2009 Feb 23.

Roa, B.B.; Garcia, C.A.; Suter, U.; Kulpa, D.A.; Wise, C.A.; Mueller, J.; Welcher, A.A.; Snipes, G.J.; Shooter, E.M.; Patel, P.I.; Lupski, J.R.(1993) Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. Association with a spontaneous point mutation in the PMP22 gene. *N Engl J Med.* 1993 Jul 8;329(2):96-101.

Rosso, G.; Cal, K.; Canclini, L.; Damián, J.P.; Ruiz, P.; Rodríguez, H.; Sotelo, J.R.; Vazquez, C.; Kun, A. (2010). Early phototypical diagnoses in Trembler-J mice model. *J Neurosci Methods.* 2010 Jun 30;190(1):14-9. doi: 10.1016/j.jneumeth.2010.04.010. Epub 2010 Apr 21.

Roux, K.J.; Amici, S.A.; Notterpek, L. (2004) The temporospatial expression of the peripheral myelin protein 22 at the developong blood-nerve and blood-brain barriers. *J Comp Neurol*. 2004 Jul 5;474(4):578-88.

Russo, M.; Laura, M.; Polke, J.M.; Davis, M.B.; Blake, J.; Brandner, S.; Hughes, R.A.; Houlden, H.; Bennett, D.L.; Lunn, M.P.; Reilly, M.M. (2011). Variable phenotypes are associated with PMP22 missense mutations. *Neuromuscul Disord*. 2011 Feb;21(2):106-14. doi: 10.1016/j.nmd.2010.11.011. Epub 2010 Dec 30.

Rutkowski, J.L.; Kirk, C.J.; Lerner, M.A.; Tennekoon, G.I. (1995). Purification and expansion of human Schwann cells in vitro. *Nat Med*. 1995 Jan;1(1):80-3.

Ryan, M.C.; Shooter, E.M.; Notterpek, L. (2002) Aggresome formation in neuropathy models base don peripheral myelin protein 22 mutations. *Neurobiol Dis*. 2002 Jul;10(2):109-18.

Sakisaka, T.; Takai, Y. (2004) Biology and pathology of nectins and nectin-like molecules. *Curr Opin Cell Biol*. 2004 Oct;16(5):513-21.

Salzer, J.L. (1997) Clustering sodium channels at the node of Ranvier: Close encounters of the axón-glia kind. *Neuron*. 1997 Jun;18(6):843-6.

Salzer, J.L. (2003) Polarized domains of myelinated axons. *Neuron*. 2003 Oct 9;40(2):297-318.

Salzer, J.L.; Brophy, P.J.; Peles, E. (2008) Molecular domains of myelinated axons in the peripheral nervous system. *Glia*. 2008 Nov 1;56(14):1532-40. doi: 10.1002/glia.20750.

Sakakura, M.; Hadziselimovic, A.; Wang, Z.; Schey, K.L.; Sanders C.R. (2011). Structural Basis for the Trembler-J Phenotype of Charcot-Marie-Tooth Disease. *Strcture*. 2011 Aug 10;19(8):1160-9. doi: 10.1016/j.str.2011.05.009.

Saporta, M.A.; Katona, L.; Lewis, R.A.; Masse, S.; Shy, M.E.; Li, J. (2009). Shortened intermodal length of dermal myelinated nerve fibers in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Brain*. 2009 Dec;132(Pt 12):3263-73. doi: 10.1093/brain/awp274.

Sergey Fedoroff; Arleen Richardson (2001) *Protocols for Neural Cell Culture*, tercera edición, Human Press, página IX

Scherer, S.S.; Arroyo, E.J. (2002) Recent progres son the molecular organization of myelinated axons. *J Peripher Nerv Syst*. 2002 Mar;7(1):1-12.

Schneider, C.; King, R.M.; Philippson, L. (1988) Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell*. 1988 Sep 9;54(6):787-93.

Sherman, D.L.; Brophy, P.J. (2005) Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci.* 2005 Sep;6(9):683-90.

Simons, M.; Trotter, J. (2007). Wrapping it up: the cell biology of myelination. *Curr Opin Neurobiol.* 2007 Oct;17(5):533-40. Epub 2007 Oct 17.

Snipes, G.J.; Suter, U.; Welcher, A.A.; Shooter, E.M. (1992) Characterization of a novel peripheral nervous system myelin protein (PMP-22/SR13). *J Cell Biol.* 1992 Apr;117(1):225-38.

Son, Y.J.; Thompson, W.J. (1995). Nerve sprouting in muscle is induced and guided by processes extended by Schwann cells. *Neuron.* 1995 Jan;14(1):133-41.

Spreyer, P.; Kuhn, G.; Hanemann, C.O.; Gillen, C.; Schaal, H.; Khun, R.; Lemke, G.; Müller, H.W. (1991). Axon-regulated expression of Schwann cell transcript that is homologous to a "growth arrest-specific" gene. *EMBO J.* 1991 Dec;10(12):3661-8.

Stahl, N.; Harry, J.; Popko, B. (1990). Quantitative analysis of myelin protein gene expression during development in the rat sciatic nerve. *Brain Res Mol Brain Res.* 1990 Aug;8(3):209-12.

Susuki, k., Rasband, M.N. (2008) Molecular mechanism of node of Ranvier formation. *Curr Opin Cell Biol.* 2008 Dec;20(6):616-23. doi: 10.1016/j.ceb.2008.09.007. Epub 2008 Nov 1.

Suter, U.; Moskow, J.J.; Welcher, A.A.; Snipes, G.J.; Kosaras, B.; Sidman, R.L.; Buchberg, A.M.; Shooter, E.M. (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 USA.* 1992 May 15;89(10):4382-6.

Suter, U.; Welcher, A.A.; Ozcelik, T.; Snipes, G.J.; Kosaras, B.; Francke, U.; Billings-Gagliardi, S.; Sidman, R.L.; Shooter, E.M. (1992b). Trembler mouse carries a point mutation in a myelin gene. *Nature.* 1992 Mar 19;356(6366):241-4.

Suter, U.; Scherer, S.S. (2003) Disease mechanisms in inherited neuropathies. *Nat Rev Neurosci.* 2003 Sep;4(9):714-26.

Takeda, Y.; Notsu, T.; Kitamura, K.; Uyemura, K. (2001). Functional analysis for peripheral myelin protein PASII/PMP22: is it a member of claudin superfamily?. *Neurochem Res.* 2001 Jun;26(6):599-607.

Taylor, V.; Zraggen, C.; Naef, R.; Suter, U.; (2000) Membrane topology of peripheral myelin protein 22. *J Neurosci Res.* 2000 Oct 1;62(1):15-27.

Tobler, R.A.; Liu, N.; Mueller, L.; Shooter, E.M. (2002) Differential aggregation of the Trembler and Trembler J mutants of peripheral myelin protein 22. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002 Jan 8;99(1):483-8. Epub 2001 Dec 18.

Trapp, B.D. (1990) Myelin-associated glycoprotein. Local and potential functions. *Ann N Y Acad Sci*. 1990;605:29-43.

Trapp, B.D.; Nave, K.A. (2008). Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder?. *Annu Rev Neurosci*. 2008;31:247-69. doi: 10.1146/annurev.neuro.30.051606.094313.

Tricaud, N.; Perrin-Tricaud, C.; Brusés, J.L.; Rutishauser, U. (2005). Adherens junctions in myelinating Schwann cells stabilize SchmidtLanterman incisures via recruitment of p120 catenin to E-cadherin. *J Neurosci*. 2005 Mar 30;25(13):3259-69.

Valentijn, L.J.; Bolhuis, P.A.; Zorn, I., Hoogendijk, J.E.; van den Bosch, N.; Hensels, G.W.; Stanton Jr, V.P. Jr.; Housman, D.E.; Fischbeck, K.H.; Ross, D.A.; Nicholson, G.A.; Meershoek, E.J.; Dauwerse, H.G.; van Ommen, G.J.B.; Baas, F. (1992) The peripheral myelin gene PMP-22/GAS-3 is duplicated in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet*. 1992 Jun;1(3):166-70.

Vallat, J.M.; Tazir, M.; Calvo, J.; Funalot, B. (2009) Hereditary peripheral neuropathies. *Press Med*. 2009 Sep;38(9):1325-34. doi: 10.1016/j.lpm.2009.01.014. Epub 2009 Mar 26.

van de Wetering, R.A.; Gabreëls-Festen, A.A., Kremer, H.; Kalcheuer, V.M.; Gabreëls, F.J.; Mariman, E.C. (1999) Regulation and expression of the murine PMP22 gene. *Mamm Genome*. 1999 Apr;10(4):419-22.

Van Rhijn, I.; Van den Berg, L.H.; Bosboom, W.M.; Otten, H.G.; Logtenberg, T. (2000). Expression of accessory molecules for T-cell activation in peripheral nerve of patients with CIDP and vasculitic neuropathy. *Brain*. 2000 Oct;123 (Pt 10):2020-9

Verheijen, M.H.; Lammens, M.; Ceuterick-de Grooten, C.; Timmerman, V.; De Jonghe, P.; King, R.H.; Smit, A.B., van Minnen, J. (2011). JPeripher Nerv Syst. 2011 Mar;16(1):71-3. doi: 10.1111/j.1529-8027.2011.00322.x.

Verheijen, M.H.; Peviani, M.; Hendricusdottir, R.; Bell, E.M.; Lammens, M.; Smit, A.B.; Bendotti, C.; van Minnen, J. (2014). Increased axonal ribosome numbers is an early event in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS One*. 2014 Jan 30;9(1):e87255. doi: 10.1371/journal.pone.0087255. eCollection 2014.

Vigo, T.; Nobbio, L.; Hummelen, P.V.; Abbruzzese, M.; Mancardi, G.; Verpoorten, N.; Verhoeven, K.; Sereda, M.W.; Nave, K.A.; Timmerman, V.;

Schenone, A. (2005). Experimental Charcot-Marie-Tooth type 1A: a cDNA microarrays analysis. *Mol Cell Neurosci.* 2005 Apr; 28(4):703-14

Vroemen, M.; Weidner, N. (2003). Purification of Schwann cells by selection of p75 low affinity nerve growth factor receptor expressing cells from adult peripheral nerve. *J Neurosci Methods.* 2003 Apr 15;124(2):135-43.

Webster, H.D. (1971). The geometry of peripheral myelin sheaths during their formation and growth in rat sciatic nerves. *J Cell Biol.* 1971 Feb;48(2):348-67.

Webster, H.D. (1993). Development of peripheral nerve fibers. *Peripheral Neuropathy*, 3rd Edn. WBSaunders, Philadelphia, pp. 24366.

Welcher, A.A.; Suter, U.; De Leon, M.; Snipes, G.J.; Shooter, E.M. (1991). A myelin protein is encoded by the homologue of a growth arrest-specific gene. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991 Aug 15;88(16):7195-9.

Welcher, A.A.; De Leon, M.; Suter, U.; Snipes, G.J.; Meakin, S.O.; Shooter, E.M. (1992) Isolation of transcriptionally regulated sequences associated with neuronal and non.neuronal cell interactions. *Prog Brain Res.* 1992;94:163-76.

Wiggins, R.C.; Benjamins, J.A.; Morell, P. (1975) Appearance of myelin proteins in rat sciatic nerve during development. *Brain Res.* 1975 May 16;89(1):99-106.

Wiley, J.S.; Sluyter, R.; Gu, B.J.; Stokes, L.; Fuller, S.J. (2011). The human P2X7 receptor and its role in innate immunity. *Tissue Antigens.* 2011 Nov;78(5):321-32. doi: 10.1111/j.1399-0039.2011.01780.x.

Yamada, K.; Sato, J.; Oku, H.; Katakai, R. (2003). Conformation of the transmembrane domains in peripheral myelin protein 22.Part 1. Solution-phase synthesis and circular dichroism study of protected 17-residue partial peptides in the first putative transmembrane domain. *J Pept Res.* 2003 Aug;62(2):78-87.