



Expresión y organización de la actina y su modulación por AMPc en nervios periféricos de un modelo animal de Charcot-Marie-Tooth 1E

Lic. Karina Cal

Tutor: Dra. Alejandra Kun

Co-Tutor: Dr. Aldo Calliari



INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
CLEMENTE ESTABLE



Resumen

Las neuropatías hereditarias periféricas humanas presentan defectos en la mielinización, siendo la más frecuente la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT). Las alteraciones en el gen que codifica para la Proteína de Mielina Periférica 22 (PMP22) constituyen más del 50% de CMTs. Las mutaciones puntuales en *pmp22* son agrupadas en el subtipo CMT1E. En particular, la que ocasiona en PMP22, una sustitución no conservativa L16P, que afecta el primer dominio transmembrana, está presente en pacientes con CMT1E y en ratones Trembler-J (TrJ), constituyendo éstos últimos, un muy valioso modelo murino para el estudio de CMT1E.

Nuestro grupo de trabajo ha observado en fibras de nervios ciáticos de ratones TrJ (PMP22 (-/+)), un marcado incremento de F-actina en las Incisuras de Schmidt-Lanterman, en los nodos de Ranvier y en regiones internodales libres de núcleos y de otras estructuras, con respecto a las provenientes de ratones PMP22(+ /+) (wt).

Se ha sugerido que RhoA, un miembro de la familia de RhoGTPasas, involucrada en la formación de fibras de estrés, puede estar regulada por PMP22. Además, en varios tipos celulares, se ha observado la modulación del citoesqueleto de actina, a través de cascada de señalización iniciada por AMPc y mediada por RhoA.

Considerando que la correcta mielinización de los axones del Sistema Nervioso Periférico requiere la extensión del citoplasma de la célula de Schwann y la reorganización del citoesqueleto de actina (F-actina) y que los ratones TrJ presentan la expresión de PMP22 alterada así como de F-actina, sugerimos que en el genotipo TrJ, el aumento observado de F-actina responda a cascadas de señalización donde el AMPc esté implicado.

También es posible que dicho incremento se deba a una modulación transcripcional y/o traduccional en la expresión de β -actina, aumentando los niveles de actina monómerica y por tanto del filamento y/o pueda deberse a cambios en el equilibrio de formación de los microfilamentos y la estabilidad de F-actina.

Basados en estas hipótesis, nos propusimos estudiar en el fenotipo neurodegenerativo TrJ, los niveles de expresión de actina, la estabilidad de los microfilamentos y la influencia del AMPc sobre el citoesqueleto de actina.

Para ello se caracterizaron los niveles de actina total, monomérica y filamentosa, así como, los niveles de ARNm de beta-actina, en nervios ciáticos de ratones wt y TrJ. También se evaluó la estabilidad de F-actina induciendo la depolimerización del filamento, en nervios ciáticos de ambos genotipos incubados ex-vivo en presencia o ausencia de citocalasina-D. A su vez, se estudió la modulación de la F-actina en nervios ciáticos de ambos genotipos, incubados ex – vivo en presencia o ausencia de un análogo de AMPc permeable a membranas (di-butiril-AMPc), utilizando como indicador los niveles de OCT6, un factor de transcripción, tejido específico, inducible por AMPc.

Nuestros resultados muestran que los nervios ciáticos de los ratones TrJ presentan mayores niveles de ARNm y de proteína total, monomérica y filamentosa de beta-actina respecto del wt. La estabilidad de F-actina en el TrJ podría encontrarse disminuída, pero el experimento no fue concluyente. Los niveles de OCT6 se encuentran disminuídos en las fibras nerviosas TrJ respecto del wt, pero estos niveles aumentan con el tratamiento de di-butiril-AMPc, con una concomitante disminución de F-actina.

Estos resultados indicarían que en el genotipo TrJ, la reacción de polimerización de microfilamentos a partir de monómeros, se encuentra desplazada hacia la formación de F-actina en las fibras nerviosas periféricas. Y sugerimos que una disminución de AMPc podría ser, en parte, causa de las alteraciones que se observan en el citoesqueleto de actina de este genotipo.

Tabla de Contenido

1- Introducción.....	6
1.1 Sistema nervioso: función y estructura.....	6
1.2 Sistema Nervioso Periférico y células de Schwann: origen y desarrollo	6
1.3 Mielina: formación, función y regulación.....	8
1.4 Polaridad de la fibra nerviosa mielinada.....	11
1.5 Citoesqueleto de actina en la mielinización y en la fibra nerviosa periférica mielinada.....	15
1.6 La neuropatía periférica hereditaria Charcot-Marie-Tooth.....	18
1.7 Modelos animales para CMT1A y CMT1E	21
1.8 Antecedentes específicos.....	22
2 – Hipótesis y Objetivos	25
2.1 – Hipótesis.....	25
2.2 - Objetivo General	25
2.3 – Objetivos Específicos	25
3 - Materiales y Métodos	26
3.1 - Animales	26
3.2 - Extracción, procesamiento y tratamientos ex–vivo de nervios ciáticos. ...	26
3.3 - Extracción de ARN y PCR en Tiempo Real	28
3.4 - Extracción de proteínas y Western Blot	30
3.5 - Inmunohistoquímica	31
3.6 - Microscopía.....	32
3.7 – Métodos de cuantificación y análisis estadísticos	32
3.7.1 – ARNm de β -actina	32
3.7.2 – Niveles de β -actina, monomérica y filamentosa determinados mediante Western blot.	33
3.7.3 – Niveles de F-actina y OCT6 determinados mediante inmunomicroscopía de fluorescencia.	33

4 - Resultados	37
4.1-Niveles de ARNm de beta-actina en nervios ciáticos de ratones wt y TrJ..	37
4.2-Niveles de beta-actina total, monomérica y filamentosa en nervios ciáticos de ratones wt y TrJ.....	39
4.3-Estabilidad de los microfilamentos en nervios ciáticos de ratones wt y TrJ	42
4.4-Niveles de OCT6 en fibras de nervios ciáticos de ratones wt y TrJ	46
4.5-Efecto del db-AMPC en las fibras de nervios ciáticos de ratones wt y TrJ .	48
7-Apéndice	60
8-Referencias Bibliográficas.....	61

1- Introducción

1.1 Sistema nervioso: función y estructura

El Sistema Nervioso (SN) es responsable de monitorear y coordinar la función de los órganos del cuerpo, así como de enviar, recibir, interpretar e integrar la información proveniente de todas partes de nuestro organismo y del ambiente. Esto permite responder a los cambios externos, confiriendo adaptabilidad al organismo a las nuevas condiciones (plasticidad del SN).

La unidad funcional básica del SN es la neurona, una célula que se caracteriza por poseer una región nuclear y perinuclear de la que emergen procesos celulares conocidos como dendritas y axones. Estas neuronas, están interconectadas formando una red que transduce la información del cuerpo y del ambiente mediante impulsos eléctricos, los que se regulan a través de sustancias químicas denominadas neurotransmisores. Esta red neuronal se encuentra en estrecha asociación con distintos tipos de células gliales, las que son fundamentales para el mantenimiento y correcto funcionamiento del SN.

Clásicamente el SN se ha dividido en dos: el encéfalo y la médula espinal constituyen al SN Central (SNC), mientras que los ganglios y los nervios periféricos que comunican el SNC con el resto del organismo constituyen el SN Periférico (SNP).

Los nervios periféricos están formados por grupos de fibras nerviosas. Estas fibras están constituidas por fibras amielínicas y mielínicas. En estas últimas, cada axón está rodeado por un conjunto de células gliales denominadas Células de Schwann (CS) mielinizantes. Un axón y todas las CS mielinizantes que lo acompañan en su trayectoria desde el cono de arranque en el pericarion neuronal, hasta las proximidades de las terminales nerviosas, constituyen la fibra nerviosa periférica, la cual actúa como una unidad estructural y funcional. La organización de la fibra nerviosa es esencial para la correcta conducción del impulso nervioso así como para la integridad funcional del axón (Salzer, 2003; Simons & Trotter, 2007 y Salzer *et al.*, 2008).

1.2 Sistema Nervioso Periférico y células de Schwann: origen y desarrollo

En vertebrados, el SNP deriva de las células de la cresta neural, las cuales dan origen a las neuronas del SNP y a las CS (Jessen & Mirsky, 2005). La

formación de las CS está precedida por la generación de dos tipos celulares: CS precursoras, que conforman la glía embrionaria de los nervios en los días

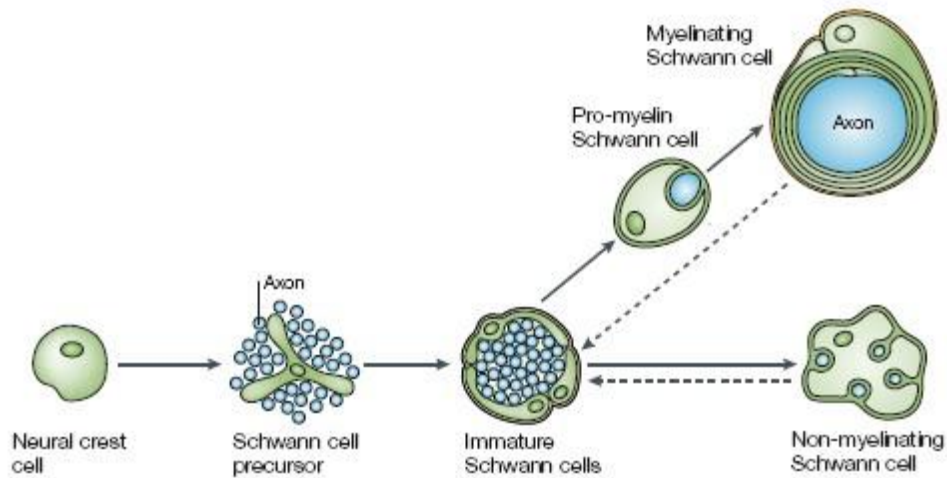


Figura 1. Linaje de las CS. Desde su desarrollo hasta su diferenciación, ocurren una sucesión de eventos celulares que determinan diferentes estadios en las CS: células madre migratorias de la cresta neural se diferencian en CS precursoras, las que posteriormente se diferenciarán a CS inmaduras. Finalmente, estas CS inmaduras se diferenciarán a no mielinizantes mientras que aquellas que participaron del proceso de selección radial (ver texto), se diferenciarán a CS promielinizantes. Estas últimas se diferenciarán a CS maduras mielinizantes, responsables de la formación y mantenimiento de la vaina de mielina de los axones periféricos. Imagen tomada de Jessen & Mirsky, 2005.

12 a 13 (en ratón) y las CS inmaduras que se desarrollan en los días 13 a 15 (en ratón) a partir de las CS precursoras. El destino posnatal de estas CS inmaduras dependen del diámetro del axón con el cual ellas se asocian. Las CS que contactan grandes axones se diferencian a CS promielinizantes y luego a CS mielinizantes, mientras que aquellas que encontraron axones de pequeño calibre, permanecen en un estado no mielinizante. Las CS maduras mielinizantes y no mielinizantes son capaces de revertir su fenotipo hacia CS inmaduras en respuesta al daño, mientras que el proceso por el cual las CS precursoras dan lugar a las CS inmaduras es irreversible (Figura 1) (Jessen & Mirsky, 2005).

A su vez, otros estudios han revelado que el grosor axonal *per se* no es el que define de que forma la CS comienza a mielinizar, sino la cantidad de Neuregulina 1 de tipo III (NRG1-III) expresada en la superficie axonal. La NRG1-III secretada por el axón, actúa como señal de supervivencia y proliferación en las CS precursoras (efecto parácrino), a través de los receptores Erb2/Erb3 (del inglés erythroblastic leukemia viral oncogene homolog-2/3) ubicados en la membrana de la CS (Birchmeier & Nave, 2008;

Taveggia *et al.*, 2005; Michailov *et al.*, 2004). Sin embargo, las CS inmaduras son independientes de señales provenientes del axón, pero responden a una variedad de señales y factores autosecretados (efecto autócrino) tales como el Factor de Crecimiento IGF2 (del inglés Insulin Growth Factor 2), Neurotrofina 3 NT3 (del inglés Neurotrophin3), entre otros (Meier *et al.*, 1999). Este cambio en los mecanismos de respuesta -de parácrino a autócrino- asegura que en el inicio, se establezca la relación numérica entre CS precursoras y axones; mientras que la posterior independencia del axón asegura la supervivencia de la CS en ausencia de axones y por tanto posibilitar la regeneración luego de un daño axonal (Simons *et al.*, 2007).

1.3 Mielina: formación, función y regulación

Todos los axones del SNP de vertebrados están asociados con CS, dando lugar a fibras no mielinadas y fibras mielinadas, como ya hemos señalado. En las fibras no mielinadas, varios axones se encuentran envueltos separadamente por la membrana plasmática de una única CS, mientras que en las fibras mielinadas, una CS madura mielinizante envuelve un segmento discreto de un único axón, estableciendo una relación 1:1 con éste. Así, un axón periférico se encuentra asociado con varias CS, las que se ubican de forma periódica sobre el axón. Cada CS emite una prolongación que se enrolla repetidamente alrededor del segmento axonal al cual se encuentra asociada. Esta estructura espiralada alrededor del axón, se denomina mielina.

La principal función de la mielina es servir como aislante y facilitar la propagación del impulso nervioso a través del axón, conservando la energía y el espacio (Salzer, 1997; Poliak & Peles, 2003). Pero tiene un rol fundamental en el mantenimiento dinámico de la fibra nerviosa y en la integridad axonal (Simons & Trotter, 2007).

La formación de la mielina tiene múltiples reguladores y podría decirse que sus inicios se dan con el proceso de selección radial o “radial sorting”, donde cada CS inmadura selecciona el axón al que envainará y de esta forma se establece la relación 1:1 con el axón, antes mencionada (Pereira *et al.*, 2012). Este proceso se da concomitantemente con la producción de basalamina por parte de la CS, lo que permite establecer una asimetría celular y definir qué región de

la membrana de la CS quedará expuesta al ambiente (abaxonal) y cual adyacente al axón (adaxonal) (Simmons & Trotter, 2007).

El proceso de selección radial culmina en la diferenciación de la CS en promielinizante. En este momento se activan cascadas moleculares que darán inicio al programa transcripcional que dirige la mielinización (Svaren & Meijer, 2008) (Figura 2). Los principales factores de transcripción involucrados son Sox10 (del inglés SRY-related HMGbox-10) que activa a Oct6 (del inglés octamer binding transcription factor-6), los que, sinérgicamente inducen la expresión de un tercer factor, Krox20 (Egr2) (del inglés early growth response-2). Este último activa la expresión de algunos genes de la CS que codifican para proteínas de mielina, suprime inhibidores de la mielinización y mantiene el estado mielinizante (Jagalur *et al.*, 2011; Mirsky *et al.*, 2008).

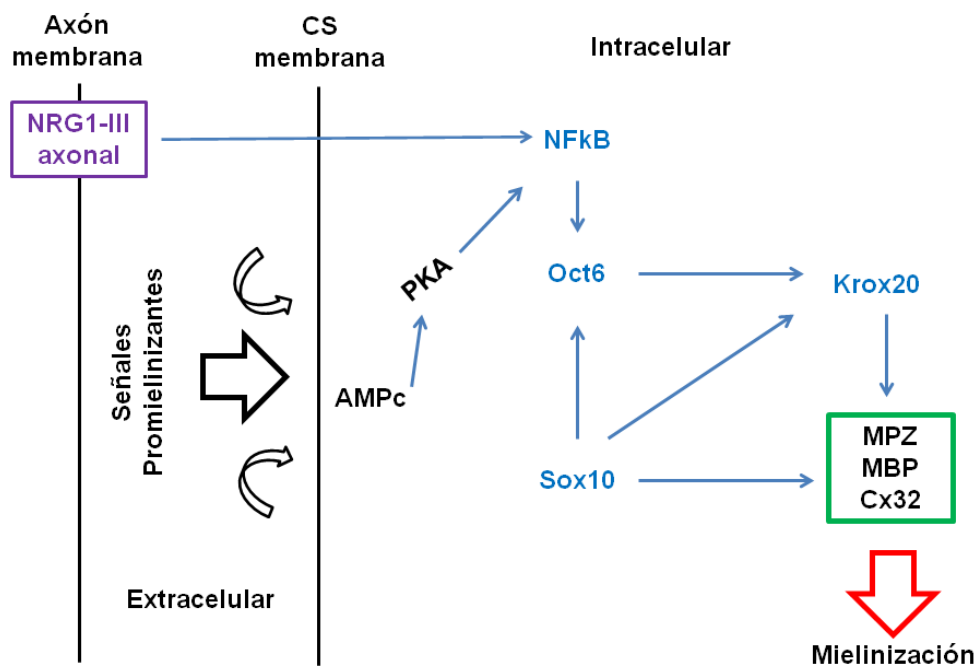


Figura 2. Esquema de señalización implicado en la activación de la mielinización. Principales factores de transcripción (en azul) y moléculas involucradas en la transición de los estadios promielinizante a mielinizante de la CS. Estas vías regulatorias culminan en la inducción de varios genes que codifican para las proteínas de mielina, como ser MPZ (del inglés, Myelin Protein Zero), MBP (del inglés, Myelin Basic Protein) y Cx32 (Conexina 32). Demás moléculas nombradas en detalle en el texto. Flechas azules indican activación.

El circuito regulatorio esquematizado en la Figura 2 recibe múltiples señales, siendo el AMPc (del inglés, cyclic Adenosin Mono Phosphate) una de ellas. Se ha observado en cultivos de CS de rata que el aumento de AMPc intracelular provoca un incremento en la expresión génica de Oct6 sugiriendo que el AMPc

estaría involucrado en la mielinización (Baranek *et al.*, 2005; Monuki *et al.*, 1989).

El principal blanco del AMPc es la activación de PKA (del inglés Protein kinase A). La activación de esta kinasa en cultivos de CS, a través del aumento de AMPc intracelular, resulta en la activación de genes de mielina sugiriendo un rol para la PKA en la mielinización (Morgan *et al.* 1991; Sobue *et al.* 1986). De hecho, para iniciar el proceso de mielinización en co-cultivos de CS con axones periféricos o para iniciar la diferenciación de CS en cultivo a un fenotipo promielinizante, se utiliza como estrategia el agregado al cultivo de sustancias que elevan los niveles intracelulares de AMPc en la CS, tales como forskolina, ácido ascórbico, di butiril-AMPc (Yoon *et al.*, 2008; Bermingham *et al.*, 1996; Eldrige *et al.*, 1989).

Otros estudios que apoyan la regulación de la mielinización a través de cascada de señalización iniciada por AMPc es que la inhibición de PKA en co-cultivos de CS y axones de neuronas de ganglios de la raíz dorsal resulta en una mielinización deficiente (Howe & McCarthy 2000).

El principal blanco de señalización de PKA es el factor de transcripción CREB (del inglés, cAMP response element binding). Luego de la administración de AMPc a CS en cultivo, CREB es fosforilada por PKA, pero su efecto directo sobre la expresión de Oct6 no es clara (Lee *et al.*, 1999).

Otra proteína blanco de PKA es el factor de transcripción NFκB (del inglés nuclear factor of κ light polypeptide gene enhancer in B cells) involucrado en la proliferación y diferenciación de varios tipos celulares (Zhong *et al.*, 1998). Se ha observado que NFκB activa Oct6 en CS y es requerido en la mielinización (Nickols *et al.*, 2003). La activación de NFκB por fosforilación en su subunidad p65 mediada por PKA, incrementa los niveles proteicos de Oct6 en CS en cultivos, sin cambiar los niveles de ARNm de Oct6 (Yoon *et al.*, 2008). Esto sugiere que NFκB regula la expresión de Oct6 en CS a un nivel postranscripcional.

Es importante destacar que muchas moléculas de señalización extracelular ejercen su efecto, a través del aumento de AMPc intracelular en la célula blanco. Este mecanismo es posible por la presencia de receptores acoplados a proteínas G triméricas (GPRs) en la membrana celular. Cuando el GPR se

une a su agonista, se activa y cambia su conformación, permitiendo la activación de la enzima adenilil ciclasa anclada en la membrana celular de la célula blanco provocando el incremento de AMPc intracelular (Alberts *et al.*, 2008).

Monk *et al.* (2009) encontraron en CS de zebrafish un GPR, *Gpr126*, el cual es capaz de dirigir la diferenciación de la CS promielinizante a mielinizante mediante el aumento de los niveles intracelulares de AMPc, lo que dispara la expresión de *Oct6* y el proceso de mielinización. Este mismo grupo de investigación ha reportado en ratones que *Gpr126* es requerido por la CS para la mielinización de nervios periféricos y que GPR126 incrementa directamente los niveles de AMPc intracelular en CS, mediante su acomplamiento a proteínas G triméricas (Mogha *et al.*, 2013; Monk *et al.*, 2011). A su vez, en co-cultivos de CS y axones de neuronas de ganglios de la raíz dorsal de ratas, existe evidencia de que la activación de NFκB en la CS, se encuentra mediada por NRG1-III axonal, lo que es esencial para la mielinización (Limpert & Carter, 2010).

Lo hasta aquí mencionado, muestra solo un sector de la compleja red de señalización que regula el proceso de mielinización, donde el AMPc juega un rol crítico.

1.4 Polaridad de la fibra nerviosa mielinada

A medida que se da el proceso de mielinización y las CS van rodeando al axón y formando la vaina de mielina, se genera la estructura de la fibra nerviosa mielinada la cual posee una polaridad longitudinal y transversal (Figura 3).

El enrollamiento de la CS sobre el axón, conduce a la formación de cuatro dominios anatómica y funcionalmente diferentes a lo largo del axón: los nodos, paranodos, yuxtaparanodos e internodos.

La formación de la vaina de mielina conduce a una polaridad transversal en las moléculas que la componen y posee regiones de mielina compacta correspondiente a zonas de la CS mielinizante desprovistas de citoplasma aparente y regiones de mielina laxa correspondiente a zonas de la CS que contienen citoplasma aparente (Oquievetskaia *et al.*, 2005).

Con respecto a la polaridad longitudinal, la misma se encuentra centrada en los nodos de Ranvier, los cuales son regiones de la fibra nerviosa mielinada determinada por dos CS adyacentes. En esta región, el axón se encuentra cubierto por interdigitaciones (o microvillis) del citoplasma abaxonal de las CS, mientras que la membrana axoplasmática está enriquecida en canales de sodio, voltaje dependientes (principalmente Nav1.6), participando en la regeneración del potencial de acción mediante la depolarización de la membrana axonal. El dominio extracelular de Nav1.6, actúa en trans con proteínas de la matriz extracelular (MEC) y en cis con varias moléculas de la membrana axonal: Neurofascina 186, Contactina y Nr-CAM, quienes contribuyen a la organización del complejo nodal (Isom, 2002; Ratcliffe *et al.*, 2001).

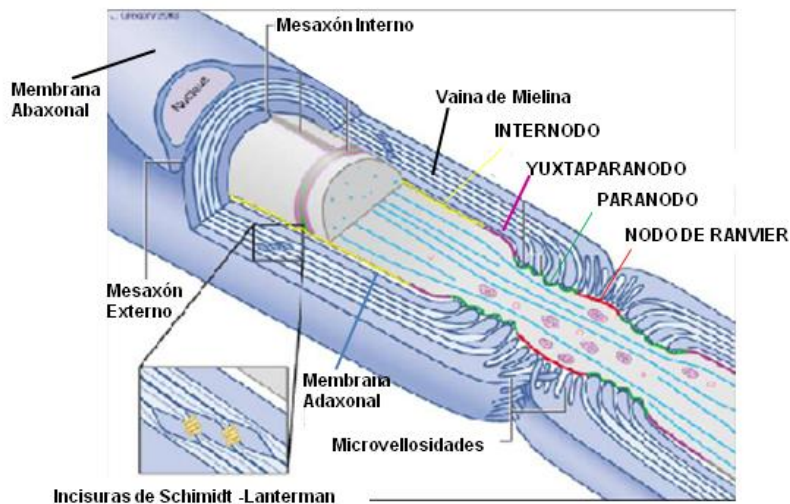


Figura 3. Polaridad de la fibra nerviosa periférica mielinada. La imagen representa un axón (gris) asociado con CS mielinizantes (azul), donde se muestra la polaridad longitudinal centrada en los nodos de Ranvier (rojo). A ambos lados de éste se encuentra la región paranodal (verde) seguida de la yuxtaparanodal (violeta). En amarillo se muestra la región internodal. En esta última región, se aprecia en el esquema, la región de membrana de la CS en estrecha asociación con el axón (membrana adaxonal) y la expuesta a la matriz extracelular (membrana abaxonal). Entre estas dos membranas se sitúa la vaina de mielina, de estructura laminar, interrumpida por regiones de mielina laxa denominadas Incisuras de Schmidt-Lanterman. Imagen modificada de Salzer, 2003.

Flanqueando los nodos de Ranvier, se encuentran los paranodos, una serie de bucles de mielina laxa, donde se hallan una serie de uniones axo-gliales especializadas que promueven la adhesión entre el axón y las CS. Los componentes proteicos principales de este dominio son los heterodímeros de

Contactina-Caspr que se unen de manera específica con Neurofascina 155, contenida en la membrana de CS de los bucles paranodales (Scherer & Arroyo, 2002).

El dominio yuxtaparanodal se encuentra adyacente a los bucles paranodales. La membrana axoplasmática de esta región se caracteriza por estar enriquecida en Caspr2 (homóloga a Caspr) y canales de potasio dependientes de voltaje K1.1 y 1.2, los que participan en la regeneración del potencial de acción mediante la repolarización de la membrana axonal. En la membrana de la CS de la región yuxtaparanodal se encuentra la glicoproteína transitoria axonal (Tag1). Esta proteína forma heterodímeros con Caspr2, los cuales son esenciales para la acumulación de canales de potasio en la región yuxtaparanodal (Poliak & Peles, 2003).

Por último se encuentra la región intermodal la cual está comprendida entre dos yuxtaparanodos de una misma CS. El internodo es la región más extensa de interacción entre el axón y la CS mielinizante. Se caracteriza por estar compuesto de mielina compacta, la cual se ve interrumpida a intervalos periódicos por una serie de hendiduras o incisuras con forma de embudo de mielina laxa, denominadas incisuras de Schmidt-Lanterman (ISL). Las ISL comunican la región abaxonal de la CS mielinizantes con la región adaxonal. Se caracterizan por la presencia de microtúbulos, filamentos de actina, conexina32 y también presentan uniones autotípicas comunicantes. Además contiene proteínas tales como MAG, fosfatasa alcalina y P2. Se ha postulado que el rol de las ISL estaría implicado en el mantenimiento y metabolismo de la mielina (Berger & Giupta, 2006). Otras hipótesis, sugieren que actuarían como un atajo citoplasmático para sustancias que atraviesan la mielina desde regiones más externas hacia las más internas incluyendo maquinaria de síntesis (ribosomas, ácidos nucleicos) para sustentar el mantenimiento de la propia CS, la mielina y quizás también del axón (Kun *et al.*, 2007, Kun *et al.*, 2012).

Con respecto a la polaridad transversal de la fibra nerviosa mielinada, la misma se describirá con detalle en la región del intermodal. En esta región, una molécula clave que participa en el ensamblaje de la membrana axonal con la membrana adaxonal de la CS, es MAG (Glicoproteína Asociada a Mielina). Actúa sobre todo al inicio de la mielinización donde une la primera capa de

mielina alrededor de los axones (mesaxón interno), además de estar involucrada en la regulación del calibre axonal (Salzer *et al.*, 2008; Abe *et al.*, 2004). También se ha descrito la familia Necl (de inglés Nectin like) de moléculas de adhesión, 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).

Siguiendo en sentido radial, se encuentra la región mielínica, comprendida entre las membranas adaxonales y abaxonales de la CS. Esta vaina de mielina está compuesta por los lípidos y proteínas de membrana de la CS (Figura 4).

La composición proteica viene dada principalmente por: 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. Las MBPs, se ubican en la cara citosólica de la membrana glial participando en la formación de la mielina y en las propiedades de la mielina en la región del internodo como aislante (Sherman & Brophy, 2003, Arroyo & Scherer, 2002). Por último, PMP22 es una pequeña glicoproteína integral de membrana, altamente hidrofóbica compuesta de 160 aminoácidos, con una masa molecular de 22 kDa (Myers *et al.*, 2008; Mobley *et al.*, 2007). Posee un único sitio de N-glicosilación en el aminoácido Asn 41 (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). Su presencia en la membrana de la CS se corresponde con funciones de estabilización de la mielina (Itou *et al.*, 2009).

Saliendo de la mielina y continuando en sentido radial, se encuentra la región abaxonal la cual contiene el núcleo de la CS rodeado de citoplasma. Es en esta región, donde la membrana abaxonal de la CS presenta receptores para la MEC. Si bien Oct6 es un factor de transcripción, específico del sistema nervioso, que se expresa principalmente en el estadio promielinizante de la CS, se ha observado su expresión en fibras de nervios mielinados, en la región

abaxonal de la mielina (núcleo y citoplasma de la CS) (Liu et al., 2015; Kawasaki et al., 2003). Envolviendo la CS y la fibra nerviosa, se encuentra la MEC.

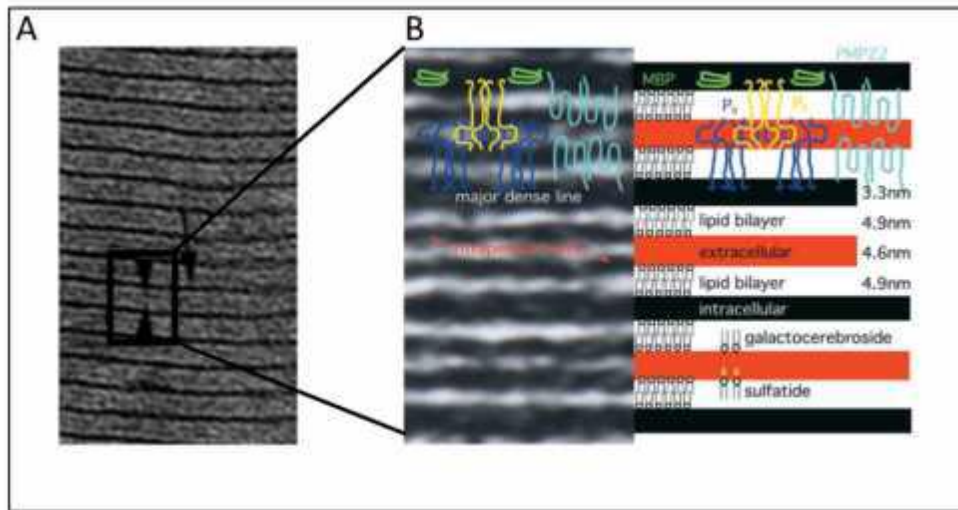


Figura 4. Estructura de la mielina compacta. **A)** Micrografía electrónica de la vaina de mielina. Se observa la típica alternancia entre las zonas electrondensas (señaladas con flechas) y translúcidas (cabezas de flechas) de la mielina compacta. Imagen tomada de King R, 2013. En **B)** (panel izquierdo) se observa una microscopia electrónica de la mielina compacta a mayor aumento que en A, donde se observan las laminas alternadas conocidas como intraperiodo y la línea densa principal. En el panel derecho, 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 sulfátido. Se indica además el grosor de las bicapas lipídicas, así como los espacios intra y extracelulares. Imagen tomada de Scherer & Arroyo, 2002.

Esta última consiste en una malla tridimensional, que rodea externamente a las fibras nerviosas (Bryan et al., 2012), compuesta principalmente por proteínas y carbohidratos. En la fibra periférica, la lámina basal (capa de 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.

1.5 Citoesqueleto de actina en la mielinización y en la fibra nerviosa periférica mielinada

El citoesqueleto constituye una compleja red tridimensional de filamentos proteicos encargados de proveer estructura, determinar la morfología celular y ubicar los distintos organelos celulares. También es responsable de organizar y realizar el movimiento celular y sus filamentos sirven de “caminos” a

proteínas motoras involucradas en el transporte celular. A pesar de que su nombre sugiera cierta rigidez, el citoesqueleto es sumamente dinámico. A través de los procesos de polimerización/depimerización, el citoesqueleto es capaz de ser el efector de señales intra y extracelulares, modificando su red, en función de las necesidades celulares.

El proceso de mielinización requiere la extensión del citoplasma de la CS, lo que ha sido comparado con un lamelipodio gigante; sugiriendo que los mecanismos implicados en la reorganización del citoesqueleto de actina en la formación del mesaxón interno, podrían ser los mismos que regulan la maquinaria molecular de la polimerización de actina en el frente de avance de los lamelipodios de células en cultivo (Feltri *et al.*, 2008). De hecho, desde hace ya mucho tiempo se ha propuesto que la actina es una molécula dinámica, que a través de asociaciones con ella misma y otras proteínas, media la respuesta en la CS a señales provenientes de receptores de membrana durante la mielinización (Fernandez-Valle *et al.*, 1997).

El citoesqueleto de actina se polimeriza a partir de actina monomérica y este proceso es dependiente de ATP. La actina monomérica es una proteína globular de 42 KD cuya secuencia aminoacídica se encuentra muy conservada a lo largo de la evolución. Existen varias isoformas las cuales son específicas de tejido, donde las células no musculares presentan mayoritariamente las isoformas beta y gama (Alberts *et al.*, 2008).

Varios estudios han mostrado que el citoesqueleto de actina (también denominado F-actina o microfilamentos) juega un rol clave en la mielinización. La disrupción de los microfilamentos, inducida por citocalasina D, un depolimerizador de F-actina, inhibe la mielinización en co-cultivos de CS y axones provenientes de ganglios de la raíz dorsal (GRD) de ratas; sugiriendo que la F-actina forma parte de una cascada de señalización involucrada en la mielinización (Fernandez-Valle *et al.*, 1997). Las proteínas α II y β II-espectrina presentes en el citoesqueleto subcortical de la CS, colocalizan con Necl4, una proteína transmembrana presente en la CS e involucrada en la regulación de la mielinización *in vitro*. La pérdida de espectrina, inhibe la mielinización y reduce la señal de F-actina y de Necl4 en el sitio de contacto de la CS con el axón. Esto podría indicar que estas espectrinas en la CS, median señales de

interacción axón-glia, que generan rearrreglos en el citoesqueleto de actina necesario para la mielinización (Susuki *et al.*, 2011). La cofilina-1, un depolimerizador de actina y otras proteínas, presente en la CS, es activada a través de la cascada de señalización de NRG1-III. Este cambio se pone de manifiesto por la rápida expansión de la membrana de la CS, incrementando entre un 35% a 50% su tamaño. Sin embargo, CS deficientes en cofilina-1 en co-cultivos con neuronas sensoriales, no son capaces de alinearse o elongarse sobre los axones, no pudiendo mielinizarlos. Esto demuestra que la cofilina-1 es necesaria en el proceso de mielinización interviniendo en los cambios dinámicos de los microfilamentos en este proceso (Sparrow *et al.*, 2012).

Otros estudios muestran que la reorganización de la F-actina en la CS, durante la mielinización, está regulada por las GTPasas monoméricas Cdc42, Rac1 y RhoA, pertenecientes a la familia Rho (RhoGTPases, del inglés, Rho-family of small Guanosine TriPhosphatases). Las proteínas RhoGTPasas son adaptadores moleculares que responden a estímulos extracelulares alternando entre un estado activo unido a GTP y uno inactivo unido a GDP. De esta forma son capaces de regular múltiples efectores en pro de una respuesta celular (Feltri *et al.*, 2008).

Rac1 (del inglés, Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1), es activada en CS por la proteína transmembrana β 1-integrina, quien está involucrada en la transducción de señales provenientes de la matriz extracelular (Feltri *et al.*, 2008; Feltri & Wrabetz, 2005). Rac1 media estas señales y promueve la extensión del citoplasma y la formación de la lamela, procesos esenciales en la CS para el establecimiento de la relación 1:1 con el axón (Benninger *et al.*, 2007; Nodari *et al.*, 2007).

CDC42 (del inglés cell division cycle 42) regula N-WASP (del inglés Wiskott–Aldrich syndrome protein) expresada en la CS. Esta proteína incrementa la nucleación de F-actina, proceso fundamental previo a la polimerización del filamento (Jin *et al.*, 2011).

RhoA (del inglés Ras homologous member A), otra RhoGTPasa, regula la morfología de la CS y a través de cascada de señalización, incrementa la contracción de la red de actina-miosina al inicio del proceso de la mielinización (Amano *et al.*, 2000; Brancolini *et al.*, 1999).

Los antecedentes hasta ahora mencionados sugieren que la correcta mielinización requiere una organización específica de la F-actina en la CS.

La funcionalidad de este sistema es crítica y su alteración está vinculada con neuropatías periféricas (Lee *et al.*, 2014; Mathis *et al.*, 2014; Kun *et al.*, 2012).

1.6 La neuropatía periférica hereditaria Charcot-Marie-Tooth

La contribución individual de la CS y el axón, en el mantenimiento de la fibra nerviosa mielinada, se aprecia cuando el equilibrio funcional y estructural axón-glia se ve alterado. La importancia de esta relación se manifiesta claramente en las neuropatías periféricas hereditarias con mayor predominio, Charcot-Marie-Tooth (CMT) (Sahenk, 1999). CMT, fue descrita por primera vez en 1886 (Charcot & Marie, 1886; Tooth, 1886) y constituye la neuropatía periférica humana que reúne los desórdenes hereditarios más frecuentes del SNP. Se hereda de forma autosómica dominante, pero también existen formas recesivas y ligadas al cromosoma X (Giambonini-Brugnoli *et al.*, 2005; Russo *et al.*, 2011).

Las causas genéticas que determinan las CMT son heterogéneas y afectan tanto a proteínas de la CS, como a neuronas cuyos axones constituyen la fibra nerviosa. Sin embargo, la mayoría de las formas de CMT, independientemente de su origen genético, presentan manifestaciones clínicas que resultan en la degeneración y pérdida de axones distales, lo que generalmente confluye en axonopatías funcionales. Este hecho evidencia una relación axón-glia, también en la patología.

CMT produce degeneración progresiva de los nervios periféricos, lo que resulta en afecciones motoras y sensoriales, cuyas manifestaciones clínicas principales son amiotrofia, debilidad muscular, déficit motor progresivo en miembros inferiores y posteriormente superiores. Además puede generar deformidades en pies y manos, lo cual se conoce clínicamente como pie cavo y mano en garra. (Shy *et al.*, 2005; Nave *et al.*, 2007). La edad en la cual aparecen las manifestaciones clínicas es variable dependiendo de las distintas formas, pero suele ser entre la primera y la tercera década de vida. La evolución clínica es crónica y lentamente progresiva (Banchs *et al.*, 2009). En cuanto a su epidemiología, la prevalencia de CMT en la población, se estima

en 1/3300 (Bird, 2013). Actualmente no hay medicación para el tratamiento de CMT (Siskind *et al.*, 2013), por lo que comprender las vías de señalización y los mecanismos que subyacen en las distintas formas de esta neuropatía, resultan fundamentales.

Clásicamente CMT se ha dividido en 2 grandes grupos distinguiéndose las CMTs primariamente desmielinizantes o Schwannopatias (CMT1), definidas por una reducción en la velocidad de conducción nerviosa (VCN) y las primariamente axonales o axonopatías (CMT2), con VCN normales y potenciales evocados sensoriales y motores de reducida amplitud (Nave *et al.*, 2007). El conocimiento genético en los últimos años, ha permitido identificar 53 loci y 36 genes específicos relacionados con diferentes tipos de CMTs, surgiendo así una clasificación más amplia de estas afecciones (Bird, 2013).

Las CMT1 presentan mutaciones que alteran la integridad estructural de la mielina, representando del 40-50% de las CMTs. Dentro del grupo CMT1, las alteraciones en el gen de PMP22 constituyen el 85% (Bird, 2013).

El subtipo CMT1A está causado por una duplicación de un segmento de ADN que contiene al gen de PMP22, en el cromosoma 17p11.2-12. Este grupo incluía además, los casos de CMT1 ocasionados por mutaciones puntuales en *pmp22*. Esto sucedía porque los pacientes portadores de mutaciones puntuales en dicho gen, presentan fenotipos clínicos que no se distinguen de los pacientes con otros subtipos de CMT1 (Li *et al.*, 2013; Russo *et al.*, 2011). Sin embargo, actualmente los casos de CMT1 generados por mutaciones puntuales en *pmp22*, se los ha clasificado dentro de un nuevo subtipo, CMT1E (Bird, 2013; Li *et al.*, 2013). Las mutaciones puntuales 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 (Li *et al.*, 2013)(Figura 5).

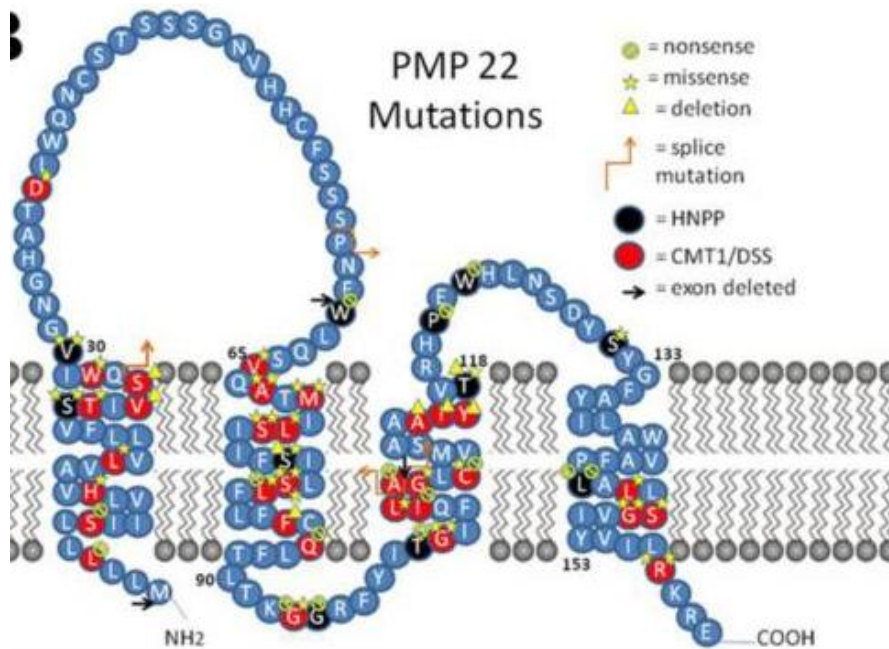


Figura 5. Alteraciones génicas en PMP22. Se muestra una representación esquemática de la estructura de PMP22, una proteína integral de membrana de la CS. Se observan los dominios amino y carboxilo terminal intracelulares así como los bucles extracelulares. Las letras indican la secuencia aminoacídica original. Se señalan varias mutaciones, sobre todo en los dominios transmembrana, que generan cambios en el aminoácido nativo provocando CMT1, entre otras neuropatías causadas por alteraciones en PMP22 (Modificado de Li *et al.*, 2013)

Es importante destacar, que mas allá de las alteraciones génicas en *pmp22* que ocasionan modificaciones aminoacídicas en PMP22, esta proteína en condiciones nativas tiene un comportamiento particular. 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). Se postula que el aumento en la dosis génica de PMP22 en CMT1A, así como las PMP22 modificadas debido a mutaciones puntuales en *pmp22*, ocasionan un aumento en la cantidad de PMP22 mal plegada, lo que provoca la saturación del proteosoma y la acumulación de PMP22 en forma de agregados en regiones perinucleares/centrosómico-proximales (Notterpek *et al.*, 1999; Ryan *et al.*, 2002; Rangaraju *et al.*, 2008). Así, estos procesos celulares contribuyen al proceso desmielinizante patológico.

Sin embargo, en los modelos animales donde se estudian estas patologías (CMT1A y E), se han observado otras alteraciones, las que también podrían contribuir al proceso demielinizante.

1.7 Modelos animales para CMT1A y CMT1E

La disponibilidad de un modelo animal confiable y capaz de reproducir el fenotipo clínico de la enfermedad, es fundamental para el desarrollo de estrategias de tratamiento efectivos (Sereda & Nave, 2006). En este sentido, existen modelos animales específicos para cada una de las causantes genéticas, vinculadas con alteraciones en *pmp22* y que generan diversas neuropatías, incluyendo duplicaciones, deleciones y mutaciones puntuales (Russo *et al.*, 2011).

Mucho de lo que se conoce de la patogénesis de CMT1E ha provenido del estudio de dos modelos murinos: Trembler (Tr) y Trembler Jackson (TrJ). Los ratones Tr fueron descritos por primera vez el año 1951 (Falconer, 1951) mientras que los TrJ fueron descritos recién en el año 1979 (Sidman *et al.*, 1979). Pero no fue hasta 1992 que Suter y colaboradores, en dos publicaciones distintas, identificaron las mutaciones que sufrían estos ratones. Los ratones Tr son portadores de una mutación puntual en el gen *pmp22*, de carácter autosómico dominante, que afecta el cuarto dominio transmembrana de PMP22 ocasionando una sustitución no conservativa G160D (Suter *et al.*, 1992 a). En cambio, los ratones TrJ son portadores de una mutación puntual también en *pmp22*, de carácter autosómico dominante, que afecta el primer dominio transmembrana de PMP22 ocasionando una sustitución no conservativa L16P (Suter *et al.*, 1992 b). Los estudios de mapeo cromosómico en ambas cepas de ratones determinaron que *pmp22* se encuentra en el cromosoma 11, cuya mitad distal es sinténica al cromosoma 17 humano (Suter *et al.*, 1992 a y b).

El fenotipo histológico de los ratones Tr sumado a la presencia de una mutación idéntica a la Tr, en pacientes con diagnóstico clínico Dejerine-Sottas (DS - una forma de CMT autosómica recesiva) condujeron a la utilización de los ratones Tr como modelo para formas particulares de DS que se basan en alteraciones en PMP22 (Ionasescu *et al.*, 1997).

Con respecto al fenotipo TrJ, también en el año 1992, Valentijn y colaboradores, presentan un trabajo donde informan la presencia de una mutación puntual en *pmp22* idéntica a la encontrada en los ratones TrJ, en una familia humana con diagnóstico clínico CMT1A y sin la duplicación característica. Además, se observó que los ratones TrJ homocigotos para la

mutación, mueren a los 17 o 18 días de vida, en contraste con la larga vida de los heterocigotos para la mutación. Esto sugirió que estos ratones son sensibles a la dosis génica al igual que los humanos (Roa *et al.*, 1993; Henry *et al.*, 1983). A su vez, estudios posteriores confirmaron la presencia de agregados de PMP22 en el citoplasma de las CS presentes en los nervios ciáticos de ratones TrJ (Notterpek & Tolwani; 1999). Estos hallazgos, hicieron de los ratones TrJ, una herramienta muy poderosa como modelo animal para el estudio de CMT1A.

Sin embargo los ratones TrJ no deberían usarse como modelo de animal de CMT1A, dado que se ha postulado que los mecanismos patogénicos son distintos en los ratones con mutaciones puntuales en *pmp22* respecto de los que sobreexpresan *pmp22* (Giambonini-Brugnoli *et al.*, 2005).

En la actual clasificación de CMT, donde los casos generados por mutaciones puntuales en *pmp22*, se los ha clasificado como CMT1E, los ratones TrJ son un modelo animal ideal para dicha enfermedad (Li *et al.*, 2013). Por lo tanto, existe mucho conocimiento generado en base a esta cepa de ratones, vinculado a CMT1A, que será considerado en este trabajo, como antecedentes específicos para CMT1E.

1.8 Antecedentes específicos

Estudios independientes en distintos tipos celulares que presentan subexpresión o sobreexpresión de PMP22 funcional, han reportado profundos efectos sobre la forma y motilidad celular así como en la dinámica de la membrana de la célula. Todos estas funciones se encuentran sumamente vinculadas con el citoesqueleto de actina .

La sobreexpresión de PMP22 en cultivos de células: MDCK (línea celular de riñón canino), NIH3T3 (línea celular de fibroblastos murinos) así como en CS (cultivos primarios de CS de rata), provocan cambios morfológicos en las células, reduciendo su tamaño (Zoltewicz *et al.*, 2012; Roux *et al.*, 2005; Brancolini *et al.*, 1999). Sin embargo, esta reducción de tamaño no es observada en fibroblastos en cultivo que sobreexpresan PMP22 y co-expresan la RhoGTPasa RhoA, la cual está involucrada en la modulación de F-actina en

diversos tipos celulares (Sohail *et al.*, 2009; Brancolini *et al.*, 1999; Ramakers & Moolenaar, 1998).

En particular, RhoA está involucrada en la formación de fibras de estrés, las cuales son haces contráctiles de filamentos de actina y miosina II que se encuentran en células no musculares. Estas fibras de estrés están unidas mecánicamente a la MEC a través de integrinas en la membrana plasmática permitiendo a la célula aplicar fuerza contráctil al sustrato, la cual se utiliza para impulsar la retracción celular durante la migración celular (Alberts *et al.*, 2008).

Tanto en fibroblastos como en astrocitos (células gliales del SN Central) en cultivos, se ha observado que la activación de RhoA a través de LPA (del inglés Lysophosphatidic Acid), induce el ensamblaje de fibras de estrés (Brancolini *et al.*, 1999; Ramakers *et al.*, 1998). Sin embargo, en fibroblastos en cultivo que sobreexpresan PMP22, se observó la inhibición del ensamblaje de fibras de estrés en respuesta al tratamiento con LPA. Estos resultados junto a los obtenidos en fibroblastos que sobreexpresan PMP22 y co-expresan RhoA (mencionado en párrafos anteriores), sugieren que PMP22 puede ser un regulador de RhoA y de esta forma intervenir en los cambios morfológicos que sufre la célula (Brancolini *et al.*, 1999).

Estudios posteriores, en cultivos de células hepáticas estrelladas (del inglés Hepatic Stellated Cells, HSC), determinaron que el aumento intracelular de AMPc resulta en la activación de PKA y provoca la inhibición de RhoA, ocasionando la pérdida de fibras de estrés (Sohail *et al.*, 2009).

Por otra parte, estudios en cultivos de CS deficientes en PMP22 (-/-), mostraron que estas células poseen una menor movilidad y un fenotipo acortado, respecto de la movilidad y morfología elongada que presentan las CS PMP22 (+/+). Esto sugirió que PMP22 regula la elongación y extensión de la membrana de la CS, proceso en los cuales el citoesqueleto de actina tiene grandes implicaciones (Lee *et al.*, 2014).

A su vez, Kun y colaboradores (2012) observaron en fibras de nervios ciáticos de ratones TrJ (PMP22 (-/+)), un marcado incremento de F-actina en las Incisuras de Schmidt-Lanterman y en los nodos de Ranvier, respecto de ratones PMP22(+/+) (wt). Además nuestro grupo de trabajo, también observó en nervios ciáticos de ratones TrJ, un aumento en los niveles de F-actina en

regiones internodales de la fibra nerviosa, respecto del wt (Tesis Maestría Bresque, 2014).

El genotipo TrJ exhibe también en los nervios ciáticos mayores niveles de PMP22, no encontrándose diferencias significativas en los niveles transcripcionales de *pmp22* respecto del wt (Tesis Maestría Romeo, 2016; Notterpek *et al.* 1999). Estos resultados sugieren que el incremento de PMP22 observado en los nervios ciáticos de ratones TrJ estaría regulado a nivel post-transcripcional (Tesis Maestría Romeo). Sin embargo, mediante estos estudios no es posible determinar cuanta de esa proteína es funcional.

Considerando que la sobreexpresión en fibroblastos de una PMP22 mutante idéntica a la que portan los ratones TrJ (L16P), no provoca cambios morfológicos en la célula, los cuales si son generados por la sobreexpresión de una PMP22 salvaje (Brancolini *et al.*, 1999). Y asumiendo como válida la mencionada hipótesis sobre la regulación de RhoA por parte de PMP22, los resultados de nuestro grupo sugieren, que en el genotipo TrJ, el aumento observado de la F-actina sería consecuencia de la actividad aumentada de la vía dependiente de RhoA ocasionada por la expresión alterada de PMP22 funcional.

Por último, cabe destacar que estudios en nervios surales humanos de pacientes con diagnóstico CMT1A (duplicación *pmp22* en el cromosoma 17p11.2-12), mostraron niveles muy disminuídos de OCT6 (factor de transcripción inducible por AMPc – ver Sección 1.3), respecto de pacientes normales (Kawasaki *et al.*, 2003). Esto podría sugerir que en esta patología, la fibra nerviosa periférica posee niveles alterados de AMPc respecto del control.

En conjunto, estos hallazgos parecen proveer elementos para proponer que:

- 1)** PMP22 podría tener un rol en la regulación del citoesqueleto de actina en la fibra mielinada.
- 2)** el aumento de F-actina que se observa en los nervios ciáticos de ratones TrJ responda a cascadas de señalización donde el AMPc esté implicado.

Sin perjuicio de lo anterior, también es posible plantear que el incremento observado de F-actina, se deba a una modulación transcripcional y/o

traduccional en la expresión de β -actina, aumentando los niveles de actina monómerica y por tanto del filamento y/o pueda deberse a cambios en el equilibrio de formación de los microfilamentos y la estabilidad del filamento.

2 – Hipótesis y Objetivos

2.1 – Hipótesis

El incremento de F-actina observado en las fibras periféricas de nervios ciáticos de ratones TrJ, está asociado a una disminución de los niveles de AMPc, a un aumento en los niveles de actina monomérica que finalmente se ensambla y/o a cambios en la estabilidad de F-actina, que impide su desensamblaje.

2.2 - Objetivo General

Estudiar en el fenotipo neurodegenerativo TrJ los niveles de expresión de actina, la estabilidad de los microfilamentos y la influencia del AMPc sobre el citoesqueleto de actina.

2.3 – Objetivos Específicos

2.3.1 – Determinar niveles de ARNm de β -actina en la fibra nerviosa periférica wt y TrJ.

2.3.2 - Determinar niveles proteicos de β -actina total, monomérica y filamentosa en la fibra nerviosa periférica de ambos genotipos.

2.3.3 - Evaluar la estabilidad del citoesqueleto de actina en la fibra nerviosa periférica de ambos genotipos.

2.3.4 - Determinar los niveles de OCT6 y de F-actina en presencia y ausencia de una fuente de AMPc exógena, en la fibra nerviosa periférica wt y TrJ.

3 - Materiales y Métodos

3.1 - Animales

Para realizar este trabajo se utilizaron ratones Trembler J (B6.D2-Pmp22^{<TrJ>/J}) (Jackson Lab., USA) adultos, de 4 a 7 meses de edad, de genotipo salvaje (wt) y heterocigota para la mutación puntual en el gen que codifica para PMP22 (TrJ). El reconocimiento y la diferenciación de los ratones portadores o no de la mutación fue realizada mediante el test modificado de elevación por la cola del animal (Modified Tail Suspension Test - MTST, Rosso *et al.* 2010). Este diagnóstico es posible, debido a que existe una correlación del 100% entre el genotipo del ratón y el MTST (Figura 6). Este test rápido permite diferenciar los ratones de genotipo salvaje (wt – Figura 6-A) de los portadores de la mutación (TrJ – Figura 6-B). El mantenimiento de la colonia así como el sacrificio de los ratones, fue realizado en acuerdo estricto 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.

3.2 - Extracción, procesamiento y tratamientos ex-vivo de nervios ciáticos.

Ratones de genotipo wt y TrJ fueron sacrificados mediante dislocación cervical y los nervios ciáticos fueron extraídos (Figura 7) y procesados para distintos fines: análisis de ARNm de β -actina (wt n=3; TrJ n=3), análisis de proteínas (wt n=3; TrJ n=3) y tratamientos ex-vivo con citocalasina-D (CD) (wt n=4; TrJ n=4) o dibutilil-AMPc (DB) (wt n=4; TrJ n=4).

Para llevar adelante los tratamientos ex-vivo y de forma previa, se retiró el epineuro de cada nervio ciático, el cual fue peinado y seccionado en tres partes. Una de las partes (Control Tiempo=0; C0) fue fijada inmediatamente en paraformaldehído 3% en PHEM (2mM Hepes, 60mM Pipes, 10mM EGTA, 2mM MgCl₂, pH 7,4) durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente (TA). El exceso de fijador de C0 fue lavado con PHEM e incubado en sacarosa 30% (en PHEM) a 4°C hasta que el tejido igualara la densidad del medio. Las otras dos partes de nervio ciático, fueron incubadas durante 1 hora a 37°C, 5% CO₂, en medio Neurobasal (Invitrogen) en ausencia (Control 1 hora; C1) o presencia de 2 μ M CD (Sigma) o 1,5 mM DB (Sigma).

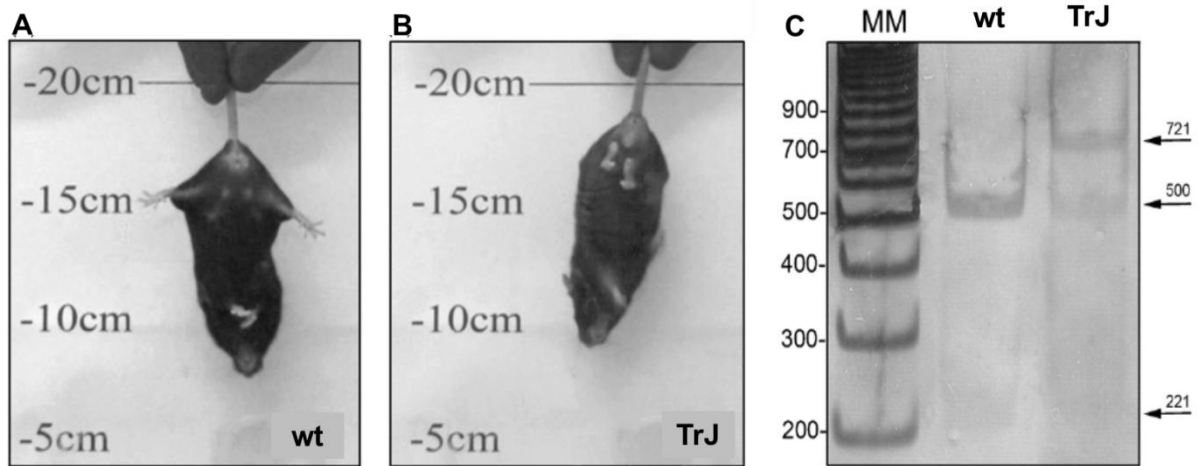


Figura 6. Reconocimiento y diferenciación de ratones wt y TrJ mediante MTST. A) y B) Las imágenes representan las posturas adoptadas por los ratones wt y TrJ respectivamente al ser sujetados por la cola en el MTST. La discriminación fenotípica se realiza observando la organización espacial que adopta el tren posterior del animal. Los ratones wt presentan una extensión completa de los miembros posteriores mientras que los TrJ presentan una retracción de los mismos sin poder extenderlos. **C)** La figura muestra una PAGE al 6% del producto de PCR para un fragmento de 721 pb (1484-2204) del gen de *pmp22*, incubado con la enzima *BfaI*. La digestión con esta enzima del fragmento de PCR proveniente de la amplificación del alelo salvaje produce dos fragmentos: uno de 221 pb (1484-1703) y otro de 500 pb (1704-2204). En presencia de la mutación se pierde el sitio de restricción de la enzima *BfaI*, no obteniéndose digestión del fragmento de 721 pb proveniente de la amplificación del alelo mutante. Por lo tanto, luego de la digestión con *BfaI*, los ratones wt muestran dos bandas: 221 y 500 pb, mientras que los ratones TrJ muestran tres bandas: 221, 500 y 721 pb. Se indica el tamaño de las bandas del marcador de masa molecular (MM) en pb.. Figura modificada de Rosso *et al.*(2010).

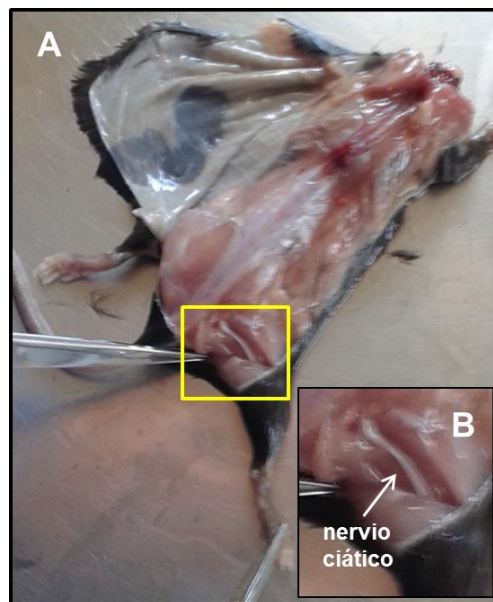


Figura 7. Disección de ratones y extracción de nervios ciáticos. A) La figura muestra una vista dorsal de un ratón wt, al cual se le retiró la piel y se le realizó en la extremidad posterior derecha una incisión roma longitudinal en dirección a la rodilla, a la altura del fémur, para separar los músculos debajo de los cuales se ubica el nervio ciático. **B)** Magnificación del recuadro amarillo de A). Allí se puede observar claramente el nervio ciático.

Finalizado el tiempo de incubación las secciones de nervio ciático tratadas y sin tratar fueron fijadas en paraformaldehído 3% en PHEM y procesadas de idéntica forma que C0. Posterior a la incubación en sacarosa de todos los tejidos fijados, los mismos fueron procesados para inmunohistoquímica (ver Sección 3.5).

3.3 - Extracción de ARN y PCR en Tiempo Real

La extracción de ARN total a partir de nervios ciáticos de ratones wt y TrJ se realizó con Trizol (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este reactivo es una solución que facilita el aislamiento de ARN dado que tiene una gran eficiencia en la inhibición de la actividad ARNasa mientras disrumpe las células y solubiliza sus componentes en el proceso de homogenización. 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). Los niveles de ARN total extraídos para cada genotipo fueron cuantificados mediante Quibit (Invitrogen). Posteriormente se realizó una retrotranscripción para cada muestra, con la enzima Superscript III (Invitrogen) y como cebador oligo-dT, siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando idénticas cantidades de ARN total (50 ng) para cada genotipo. Esto permitió obtener en copia de ADN, la población normalizada de ARNm presentes en muestras wt y TrJ. Posteriormente, se realizó una PCR en tiempo real con el objetivo de evaluar los niveles de ARNm de β -actina presentes en muestras wt y TrJ.

Esta técnica se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y permite amplificar y al mismo tiempo cuantificar un fragmento de ADN de interés, utilizando en la mezcla de reacción un fluoróforo capaz de intercalarse a una doble hebra de ADN. Este marcador, incorporado al fragmento neosintetizado, emite una señal fluorescente proporcional a la cantidad de ADN formado la cual es detectada y procesada en tiempo real. Para llevar adelante este ensayo, se utilizaron los cebadores específicos:

Directo - 5'TATGTTGCCCTAGACTTCGAGC3',

Reverso - 5'CAGCTCATAGCTCTTCTCCAGG3'

Éstos amplifican un fragmento de 75 pb ubicado en el 3' UTR del ARNm de β -actina. La amplificación del fragmento de interés se llevó a cabo utilizando el kit

Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG w/ROX (Invitrogen), en un volumen total de reacción de 25 µl, utilizando 2 µl de producto de retrotranscripción y una concentración final de los cebadores específicos ya descritos de 0,2 mM. La PCR en tiempo real fue llevada a cabo en la plataforma Corbett Rotor Gene 6000 (QIAGEN), bajo las siguientes condiciones: 5 min a 94°C y 40 ciclos de 30 s a 94°C y 30 s a 58°C. La especificidad del amplicón fue confirmada por análisis de la curva de desnaturalización (50°C – 95°C), por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% en buffer TAE teñidos con nitrato de plata y por secuenciación en el Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo. Esta secuencia fue comparada contra las bases de datos presentes en NCBI utilizando la herramienta BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La eficiencia de la reacción para los cebadores utilizados se determinó mediante diluciones seriadas en base 2 (rango: 1 - 1/16) del producto de retrotranscripción para una muestra dada, por triplicado y su posterior análisis a través del software Rotor Gene 6000 Series v.1.7 (QIAGEN). Este software considera el promedio de la intensidad de fluorescencia para los primeros 5 ciclos de PCR de cada reacción, como umbral de ruido de fondo (Background). 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. A su vez, el C_T es inversamente proporcional a la cantidad de ADN blanco presente en la reacción (Pfaffl, 2004). 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 estándar 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, en la fase exponencial de la reacción, para determinar los C_{Ts} , optimizando el coeficiente de correlación de la Ec. 1, ajustando los datos de la curva estándar a una regresión lineal (Figura 8). 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 wt y TrJ. Los C_{Ts} obtenidos para cada genotipo fueron analizados estadísticamente.

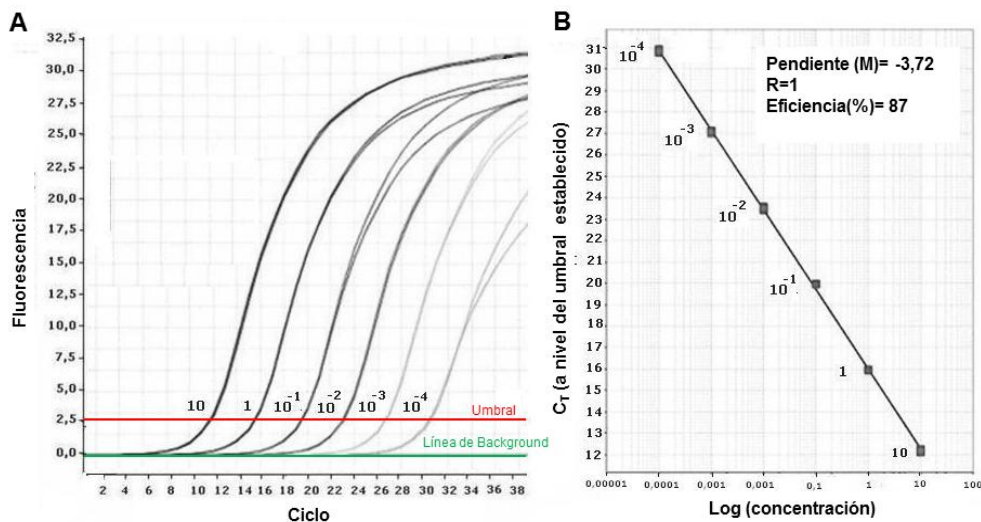


Figura 8: Obtención de curva estándar mediante PCR en tiempo real. A) Curvas de amplificación con cebadores específicos para un blanco dado, utilizando concentraciones seriadas en base 10 de la muestra (valor mostrado al costado de cada curva). Se observa la línea de ruido de fondo para los niveles de fluorescencia (verde) determinado por el software, así como el umbral establecido (rojo) que optimiza el coeficiente de correlación (R) de la curva mostrada en B). **B)** Curva estándar elaborada con los resultados de amplificación obtenidos en A), que correlaciona el C_T (Cycle Threshold) obtenido a nivel del umbral determinado con la concentración inicial de blanco presente en la muestra (valor mostrado al costado de cada punto de la curva), según la Ec. 1 indicada en el texto. La eficiencia de la reacción fue calculada según la Ec. 2 indicada en el texto. Figura modificada de Flores *et al.*, 2015.

3.4 - Extracción de proteínas y Western Blot

La evaluación de los niveles actina total, G-actina y F-actina fueron determinados mediante la extracción de proteínas totales a partir de nervio ciático de ratones wt y TrJ (Searles *et al.*, 2004). Brevemente, se procedió a la homogenización de nervios ciáticos en 1mL de buffer de lisis: PIPES-pH 6.9-50 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂, 5 mM, EGTA 5 mM, glicerol 5%, 0.1% Nonidet P40, 0.1% Triton X-100, 0.1%, Tween 20, ATP 1 mM e inhibidores de proteasas (AEBSF 2 mM, Phosphoramidon 1 mM, Bestatin 130 mM, E-64 14 mM, Leupeptin 1 mM, Aprotinin 0.2 mM, Pepstatin A 10 mM). El homogenado fue incubado durante 10 min a 37°C, para permitir la estabilización de los polímeros proteicos insolubles en esta mezcla de detergentes. Luego el

homogenado fue centrifugado a 400 xg, 5 min, TA. El sobrenadante colectado se denominó fracción total (FT). Se extrajo una alícuota de FT para su posterior análisis y el volumen restante fue llevado a 10 mL con buffer de lisis y ultracentrifugado a 100.000 xg, 60 minutos, 37°C. Mediante este procedimiento se obtuvo una fracción soluble enriquecida en actina monomérica (G-actina; FS) y una fracción insoluble enriquecida en actina filamentosa (F-actina; FIn). La FS fue concentrada hasta su volumen original (1 mL aprox.) mediante filtrado por centrifugación con Centricon - 10KD (Millipore) a 4°C, 5000 xg. Todas las fracciones obtenidas (FT, FS y FIn) fueron tratadas con urea 8M, previo a su cuantificación (Quibit-Invitrogen), con el fin de desensamblar cualquier complejo proteico (por ejemplo F-actina en la FIn) presente en cualquiera de las fracciones. Posteriormente, los niveles proteicos de cada fracción fueron analizados mediante SDS-PAGE (acrilamida 12%) y WB (membrana PVDF) utilizando un anticuerpo anti- β -actina hecho en ratón (A1978-Sigma, dilución de trabajo: 1/4000), revelado mediante quimioluminiscencia o utilizando un anti-anticuerpo anti-ratón hecho en cabra, conjugado al fluoróforo Alexa-488 (A11029-Invitrogen, dilución de trabajo: 1/1000) y visualizado mediante el sistema Fujifilm FLA-9000.

3.5 - Inmunohistoquímica

Posterior a los tratamientos ex-vivo de los nervios ciáticos provenientes de ratones wt y TrJ (ver Sección 3.2), éstos fueron procesados para inmunohistoquímica. Para ello, el tejido fue permeabilizado con Triton X-100 (Sigma) al 0,1% en PHEM durante 10 minutos a TA. El exceso de detergente fue lavado 3 veces con PHEM y se bloqueó los grupos aldehídos y cetonas libre con borohidruro de sodio al 0,1% en agua (Sigma) durante 10 minutos a TA. El exceso de reductor fue lavado 3 veces con PHEM y se bloqueó 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.

Los nervios tratados con db-AMPC y sus controles (ver Sección 3.2) fueron incubados 16 hr a 4°C con anticuerpo contra OCT6 (anti-ratón hecho en conejo, dilución de trabajo 1/100 en BI- ab31766 Abcam). El exceso de anticuerpo específico fue lavado 3 veces con BI posteriormente incubados 1 hora a 37°C, con Faloidina conjugada a Alexa-543 (dilución de trabajo 1/100

en BI - A22283 Invitrogen) para evidenciar la presencia de F-actina, DAPI (dilución de trabajo 1/1000 en BI – D1306 Invitrogen) para evidenciar la presencia de núcleos y con un anti-anticuerpo conjugado a un fluorocromo excitable a una longitud de onda de 488 nm (anti-conejo hecho en cabra, dilución de trabajo 1/1000 en BI - A11008 Invitrogen), para evidenciar la presencia de OCT6.

El exceso de anti-anticuerpo fue lavado 3 veces con BI y 3 veces con PHEM. Por último, el tejido fue peinado sobre porta-objetos y montado con ProLong Antifade (Invitrogen). Como control negativo de la inmunohistoquímica se realizaron incubaciones de tejido con anti-anticuerpo y las sondas Faloidina y DAPI, pero en ausencia de anticuerpo específico como control de señal inespecífica para OCT6.

Los nervios tratados con citocalasina-D y sus controles (ver Sección 3.2) fueron procesados únicamente con las sondas Faloidina y DAPI según lo descrito en el párrafo anterior.

3.6 - Microscopía

Los nervios ciáticos provenientes de ratones wt y TrJ procesados para inmunohistoquímica de fluorescencia, fueron visualizadas y registradas en el microscopio confocal FV300 (Olympus). Las condiciones de confocalidad y ajuste de parámetros (fotomultiplicador, intensidad de láser, profundidad de imagen, etc), fueron las mismas para todos los registros. Las imágenes de un mismo experimento fueron obtenidas y procesadas en la misma sesión confocal.

3.7 – Métodos de cuantificación y análisis estadísticos

3.7.1 – ARNm de β -actina

Las reacciones de PCR para amplificar un fragmento específico del ARNm de beta actina, realizadas con las muestras extraídas de nervios ciáticos de ratones wt y TrJ, fueron analizadas con el valor umbral obtenido en la curva estándar (ver Sección 3.1). A partir del número de C_{T_s} obtenido en dos réplicas técnicas para cada genotipo (n=3), se calculó la variable definida como “Cambio en los niveles de ARNm”= $2^{-\Delta C_T}$, donde $\Delta C_T = C_T(\text{wt ó TrJ}) - \text{promedio}$

(C_T wt). Esta variable pretende ilustrar la cantidad de veces que varía la expresión del ARNm de β -actina respecto del genotipo wt al que se considera como la condición control. Los valores obtenidos de “Cambio en los niveles de ARNm” para cada genotipo fueron comparados mediante la prueba U de Mann-Whitney, considerando como hipótesis nula que la mediana $2^{-\Delta C_T (wt)} \leq 2^{-\Delta C_T (TrJ)}$ (hipótesis de una cola). Si el estadístico U calculado es mayor al U tabulado, se rechaza la hipótesis nula (Badii *et al.*, 2012). Los resultados se expresan como la mediana y su rango intercuartílico como medida de la dispersión: (Mediana (cuartil 1 – cuartil 3))

3.7.2 – Niveles de β -actina, monomérica y filamentosa determinados mediante Western blot.

Las señales obtenida para β -actina en los western blot realizados fueron analizadas mediante densitometría utilizando el software ImageJ (Rasband, 1997) y cuantificadas mediante la herramienta Geles del programa mencionado. Los valores obtenidos de 2 réplicas técnicas para cada genotipo (wt n=3; TrJ n=3)) en las fracciones total (FT), soluble (FS) e insoluble (FIn) y la relación FIn/FS, fueron comparados mediante la prueba U de Mann-Whitney considerando como hipótesis nula que la mediana de los valores densitométricos obtenidos para el genotipo wt es mayor o igual a la mediana de los obtenidos para el genotipo TrJ (hipótesis de una cola). Si el estadístico U calculado es mayor al U tabulado, se rechaza la hipótesis nula (Badii *et al.*, 2012). Los resultados se expresan como la mediana y su rango intercuartílico como medida de la dispersión: (Mediana (cuartil 1 – cuartil 3))

3.7.3 – Niveles de F-actina y OCT6 determinados mediante inmunomicroscopía de fluorescencia.

Las micrografías obtenidas de nervios ciáticos wt y TrJ, peinados e inmunoteñidos con anticuerpos y sondas fluorescentes, fueron utilizadas para determinar los niveles de F-actina y OCT6, en la fibra nerviosa. Como ya fue descrito, la fibra nerviosa está constituida por varios dominios. Los niveles de F-actina (wt y TrJ) fueron estudiados por nuestro grupo en dos de estos dominios: nodos de Ranvier e Incisuras de Schimdt-Lantermann (Kun *et al.*,

2012). Nuestro grupo (Tesis Maestría Bresque, 2014), estudió la modulación de la F-actina en regiones internodales de fibras de nervios ciáticos wt y TrJ a través de un enfoque nutricional. En base a estos antecedentes es que se ha planteado la evaluación de los niveles de F-actina en regiones internodales de la fibra nerviosa, para cada genotipo. Además, estas regiones son fácilmente identificables, abundantes, y presentan una gran regularidad estructural.

Con respecto al factor de transcripción OCT6, además de evaluar sus niveles en las regiones nucleares y perinucleares de CS presentes en la fibra nerviosa, se planteó su evaluación en regiones internodales de la fibra nerviosa, dado que se postula que OCT6 también tiene localización citoplasmática (Baranek *et al.*, 2005). De esta manera y para las regiones internodales, se analizó en función del ancho de la fibra nerviosa, la distribución e intensidad de la señal de Faloidina y del anti-anticuerpo conjugado a fluorocromo utilizado para reconocer el inmunocomplejo formado por OCT6 y su anticuerpo específico (icOCT6). La cuantificación de la señal de Faloidina y 488-anti-icOCT6 se realizó con el software ImageJ (Rasband, 1997), sobre planos focales únicos de las micrografías obtenidas. En cada plano focal, se diseñaron distintas áreas de interés rectangulares sobre las fibras de nervio ciático, en regiones libres de ISL y de núcleos (Figura 9-B C y D). El ancho del rectángulo permaneció constante en todas las medidas, para todas las fibras examinadas; mientras que el largo del rectángulo coincidió con el ancho de la fibra, perpendicular al eje mayor de la fibra. Mediante la herramienta Plot Profile del software mencionado, se obtiene la intensidad de señal promedio, la cual se normaliza por el ancho de la fibra estudiada. 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%) (Figura 9-E). Estos rangos han sido determinados por nuestro grupo de trabajo y a partir de los valores obtenidos para cada uno de ellos, se calculó la media de intensidad de señal de fluorescencia en cada dominio (Tesis Maestría Bresque, 2014), para 100 observaciones, en cada genotipo y tratamiento.

Para las regiones nucleares y perinucleares se analizó la distribución e intensidad de la señal 488-anti-OCT6 en función de la distancia desde el centro del núcleo hacia la región perinuclear. Sobre planos focales únicos de las micrografías obtenidas, se diseñaron distintas áreas de interés rectangulares

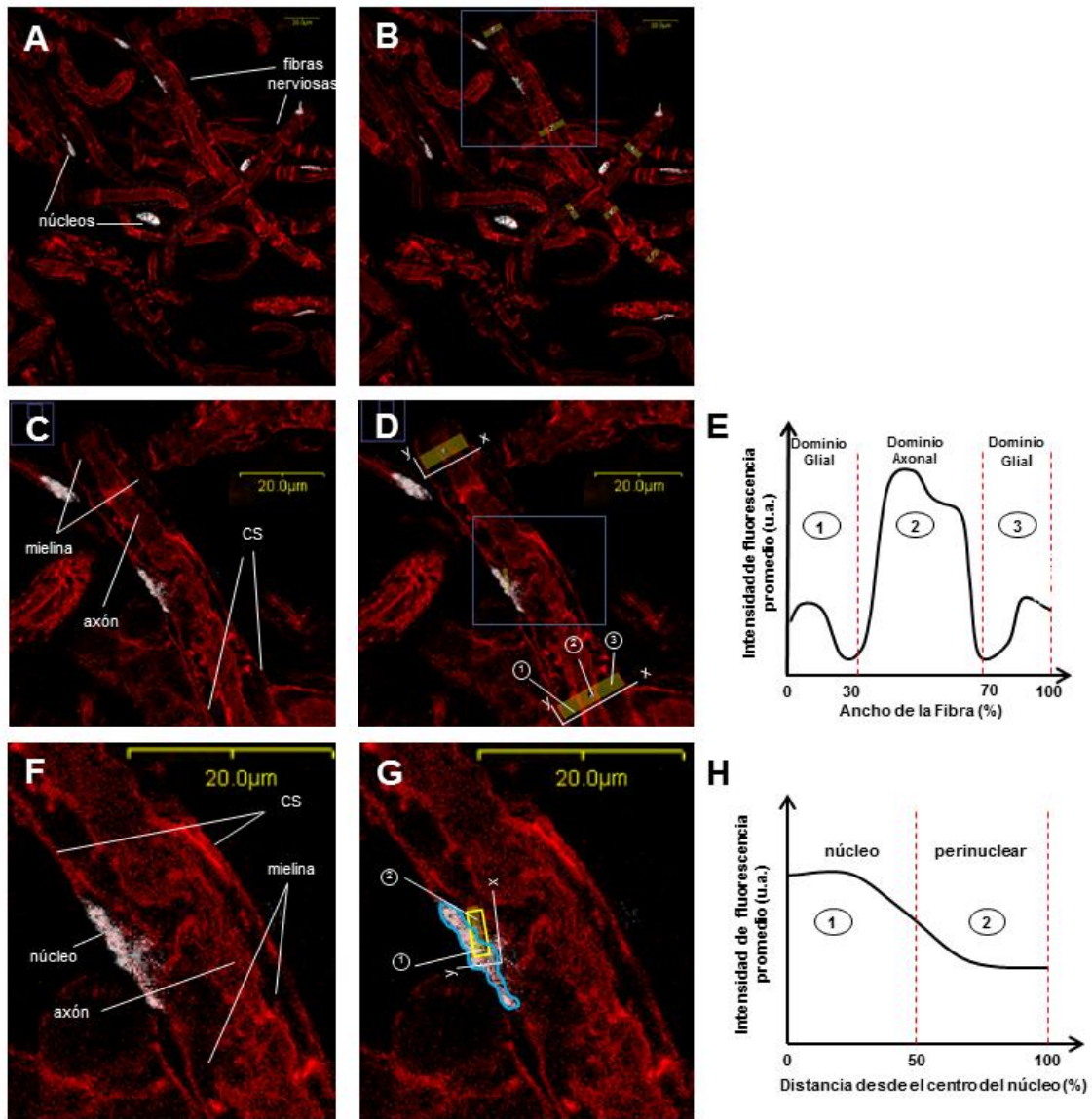


Figura 9. Metodología para la cuantificación de fluorescencia en micrografías de fibras de nervios ciáticos de ratones wt y TrJ. **A)** micrografía confocal de fluorescencia de un plano único (60X) de fibras de nervio ciático teñidas con faloidina (rojo) para evidenciar las fibras nerviosas y dapi (blanco) para evidenciar los núcleos. **B)** Áreas de interés (rectángulos amarillos) sobre las fibras nerviosas mostradas en A). **C)** Magnificación del recuadro azul presente en B), donde se quitaron las áreas de interés (rectángulos amarillos) para una mejor apreciación de los dominios axonales (axón) y gliales (CS y mielina) de la fibra nerviosa. **D)** Áreas de interés diseñadas sobre regiones internodales libres de núcleos y otras estructuras en la fibra nerviosa mostrada en C). Estas mismas áreas se observan a menor menor aumento en B). Sobre cada área seleccionada se registra el promedio de las intensidades de fluorescencia de todos los puntos en el eje y para cada valor de x. El ancho de la fibra, que coincide con el largo del rectángulo, se considera como 100% para normalizar las medidas obtenidas de todas las fibras evaluadas. **E)** Distribución típica de la intensidad de fluorescencia promedio de faloidina en función del ancho de la fibra nerviosa. El pico central corresponde a los microfilamentos axonales. Los picos laterales corresponden a los microfilamentos de la CS. Los valles entre los picos corresponden con la mielina compacta la cual carece de microfilamentos. **F)** Magnificación del recuadro azul presente en D). Dominios glial, axonal y núcleo de una fibra nerviosa en mayor detalle. **G)** Área de interés (rectángulo amarillo) sobre el núcleo (delimitado con una línea azul) y región perinuclear, en la fibra mostrada en F). El rectángulo se traza desde el centro del núcleo y hacia la zona perinuclear de forma tal que el centro del rectángulo coincida con el borde del núcleo, mientras que el ancho se mantuvo constante en todas las medidas efectuadas. De esta forma, la mitad del área del rectángulo se encuentra sobre el núcleo y la otra mitad en la región perinuclear. Sobre estas áreas se registran el promedio de las intensidades de fluorescencia de todos los puntos en el eje y para cada valor de x. Para normalizar las medidas obtenidas se considera el largo del rectángulo como 100%. **H)** Distribución típica de la intensidad de fluorescencia promedio de OCT6 a medida que nos alejamos del centro del núcleo. En todas las micrografías, la regla amarilla indica 20 micras.

de idéntico ancho, desde el centro del núcleo y hacia la región perinuclear de forma tal que el centro del rectángulo coincide con el borde del núcleo (Figura 9-F y G). Para normalizar todas las medidas obtenidas, el largo del rectángulo se consideró como 100%. De esta forma, la mitad del área del rectángulo se encuentra sobre el núcleo y la otra mitad sobre la zona perinuclear. Mediante la herramienta Plot Profile del software ImageJ, se obtiene la intensidad de fluorescencia promedio en función de la distancia desde el centro del núcleo (Rosso et al., 2011). Esto nos permitió obtener los patrones de distribución y la media de la intensidad de señal de OCT6 en las regiones nucleares (0-50%) y perinucleares (50-100%) (Figura 9-H), para 100 observaciones, en cada genotipo y tratamiento.

La media de intensidad de fluorescencia de faloidina en los dominios axonales y gliales, así como, la media de intensidad de fluorescencia para OCT6 en regiones nucleares, perinucleares, gliales y axonales, fueron estudiadas mediante análisis de varianza (ANOVA), considerándose el genotipo, el tratamiento y su interacción como efectos fijos y como efecto aleatorio el animal dentro de cada genotipo. Las comparaciones múltiples post Hoc se realizaron mediante el test LSD. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar (ES).

4 - Resultados

4.1-Niveles de ARNm de beta-actina en nervios ciáticos de ratones wt y TrJ

Para llevar adelante el primer objetivo específico, se realizaron extracciones de ARN total de nervios ciáticos de ratones wt y TrJ. La figura 10-A muestra una corrida electroforética en gel de agarosa de ARN total extraído para cada genotipo. Allí se observa un chorrete de bandas (en inglés, smear) característico y las bandas de peso molecular 2000 pb y 5000 pb correspondientes a las subunidades de ARN ribosomal 18S y 28S respectivamente. Todo esto indica que el ARN total obtenido es de buena calidad.

A continuación se realizó la curva estándar para el cálculo de la eficiencia de la reacción de PCR en tiempo real, con los cebadores específicos seleccionados que amplifican un fragmento de 75 pb del ARNm de β actina (ver Sección 3.3). La ecuación obtenida para dicha curva fue:

$$C_T = -3,394 \times \log(\text{concentración}) + 13,981 \quad (\text{ver Ec.1 en Sección 3.3})$$

El coeficiente de correlación de esta curva R y su cuadrado (R^2) fue de 0,99885 y 0,99770, indicando que los datos se ajustan en un 99%, a una regresión lineal. El valor de la pendiente de esta curva permitió calcular la Eficiencia según la Ec.2 de la Sección 3.3, resultando en 97%. La Eficiencia es la capacidad de la reacción de duplicar el número de copias del fragmento amplificado, en cada ciclo durante la fase exponencial (Bustin & Nolan, 2004). Teniendo en cuenta que la Eficiencia obtenida se encuentra en el rango aceptado para ensayos de PCR en tiempo real (Eficiencia \pm 20%)(Yun *et al.*, 2006) y que el valor es muy cercano al 100%, en este ensayo se asume que la reacción duplica el número de copias del fragmento amplificado de 75 pb, en cada ciclo de la fase exponencial. Con estas condiciones de PCR establecidas y partiendo de iguales cantidades de ARN total, para cada genotipo, se realizó la reacción en tiempo real. La figura 10-B muestra el gráfico de amplificación de la secuencia blanco, donde se observa que las muestras de genotipo TrJ amplifican antes que las wt. Los C_{Ts} determinados para cada muestra, mediante el umbral definido a través de la optimización de la curva estándar,

fueron utilizados para calcular el cambio en los niveles de expresión del ARNm de β actina en nervios ciáticos TrJ respecto del wt, donde éste último fue considerado como control (ver Sección 3.7.1). Los resultados muestran que los niveles de ARNm de β actina en los nervios ciáticos de ratones TrJ es 3 veces mayor que en los wt (Figura 10-C; Apéndice-Tabla 1).

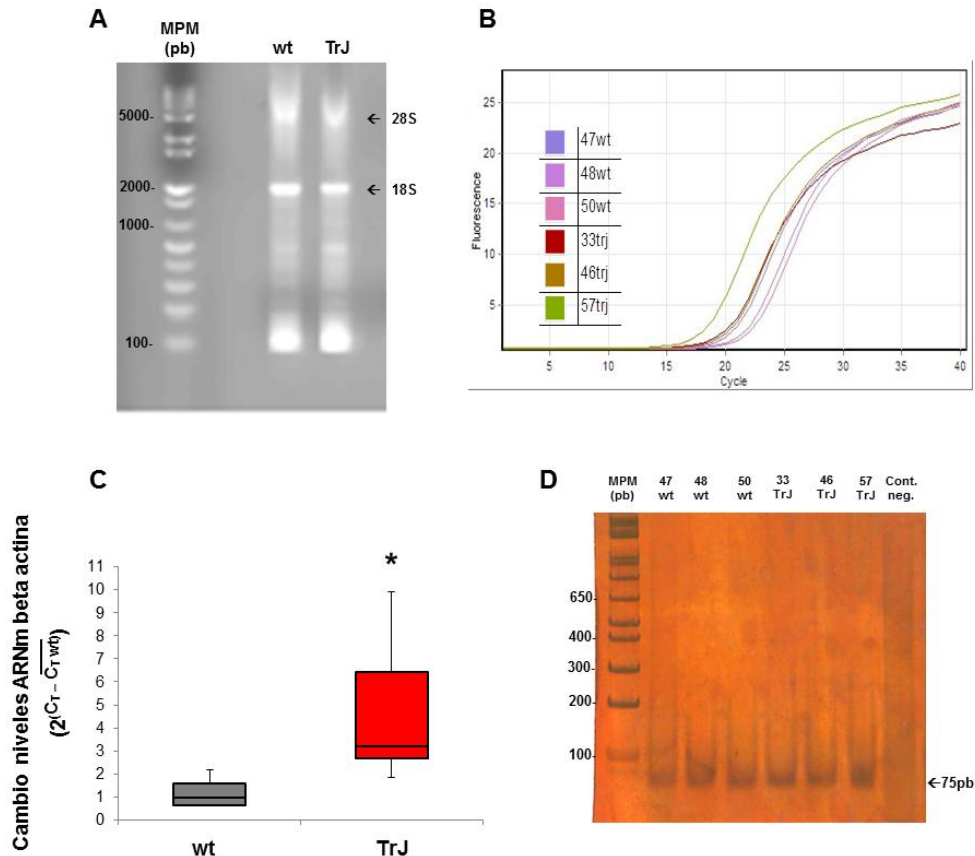


Figura 10. Evaluación de los niveles de ARNm de beta actina en nervios ciáticos de ratones wt y TrJ. **A)** Electroforesis en agarosa al 2% de extracciones de ARN total de nervios ciáticos de ratones wt y TrJ, teñido con SYBR® Green. Se observa un chorrote de bandas (en inglés, smear) característico y las bandas de peso molecular 2000 pb y 5000 pb correspondientes a las subunidades de ARN ribosomal 18S y 28S (flechas negras) respectivamente. MPM: marcador de peso molecular en pares de bases (pb). **B)** Curva de amplificación de la secuencia blanco de 75 pb en el ARNm de beta actina. Se observan en colores distintos las curvas de las reacciones obtenidas para las distintas muestras. **C)** Grafico de caja (box plot) que muestra la cantidad de veces que varía la expresión del ARNm de beta actina respecto del genotipo wt al que se considera como la condición control. La línea negra horizontal dentro de la caja representa la mediana. El largo de la caja (rango: cuartil 1 – cuartil 3) más las barras, representan el rango en el que se encuentran los datos. El asterisco (*) indica diferencias significativas con $p < 0,01$. **D)** Electroforesis en acrilamida al 6%, teñida con AgNO_3 de los productos de PCR obtenidos para cada muestra. Se observa en todos los carriles una única banda del tamaño esperado (75 pb, flecha negra); excepto para el control negativo (Cont.Neg.), donde no se observa ninguna banda. MPM: marcador de peso molecular en pares de bases (pb).

Cabe destacar que tanto la corrida electroforética de los productos de PCR obtenido para cada animal en cada genotipo (Figura 10-D), así como el análisis

de la curva de disociación para todas las reacciones (Apendice-Figura 1), confirmaron la amplificación de un único producto de PCR. A su vez, la identidad del fragmento de 75 pb amplificado, fue confirmada mediante secuenciación (no mostrado), con una coincidencia del 100% con la secuencia blanco en el ARNm de β actina.

4.2-Niveles de beta-actina total, monomérica y filamentosa en nervios ciáticos de ratones wt y TrJ

Para llevar adelante el segundo objetivo específico se procedió a la evaluación de los niveles actina total, G-actina y F-actina en nervios ciáticos de ratones wt y TrJ, a partir de la extracción de proteínas totales y su separación mediante ultracentrifugación (ver Sección 3.4). El uso de esta metodología permitió obtener una fracción total (FT) previo a la ultracentrifugación y posterior a ésta, una fracción soluble enriquecida en actina monomérica (G-actina; FS) y una fracción insoluble enriquecida en actina filamentosa (F-actina; FIn). Las fracciones obtenidas para cada genotipo fueron analizadas mediante SDS-PAGE y WB utilizando un anticuerpo anti- β actina (Figura 11-A y 11-B respectivamente). Con cada fracción obtenida para los genotipos wt y TrJ se realizó una SDS-PAGE. La cantidad de proteína sembrada en cada carril (wt y TrJ) para una fracción dada, fue la misma. En la Figura 11-A, se puede observar que en todas las fracciones, las muestras TrJ presentan un patrón de intensidad de bandas diferente con respecto al wt. El SDS-PAGE para la FT y FS evidenció la presencia de una banda de peso molecular aparente de 67 KD, la cual presenta mayor intensidad en el genotipo TrJ que en el wt. Dicha banda no se observa en el SDS-PAGE para la FIn. A su vez, en estos mismos geles y en todas las fracciones, se observa la presencia de una banda de peso molecular aparente de 27 KD, la cual posee mayor intensidad en el genotipo wt respecto del TrJ (Figura 11 A). El WB realizado mediante la transferencia a membrana de PVDF de geles gemelos a los mostrados en la Figura 11-A, evidenció para FT y FS bandas de peso molecular aparente, mayores o iguales a 50 KD. Estas bandas también aparecen en el control negativo realizado para el mismo WB, donde se incubó con anti-anticuerpo en ausencia del anticuerpo específico utilizado para reconocer a la β -actina (Figura 11-B). Esto indica que dichas bandas corresponden al reconocimiento de proteínas de manera inespecífica, por parte del anti-anticuerpo. A su vez, los WB para las 3 fracciones, FT, FS y FIn, muestran una banda de peso molecular aparente de 45 KD, la cual no se observa en el control negativo para ninguno de los WB.

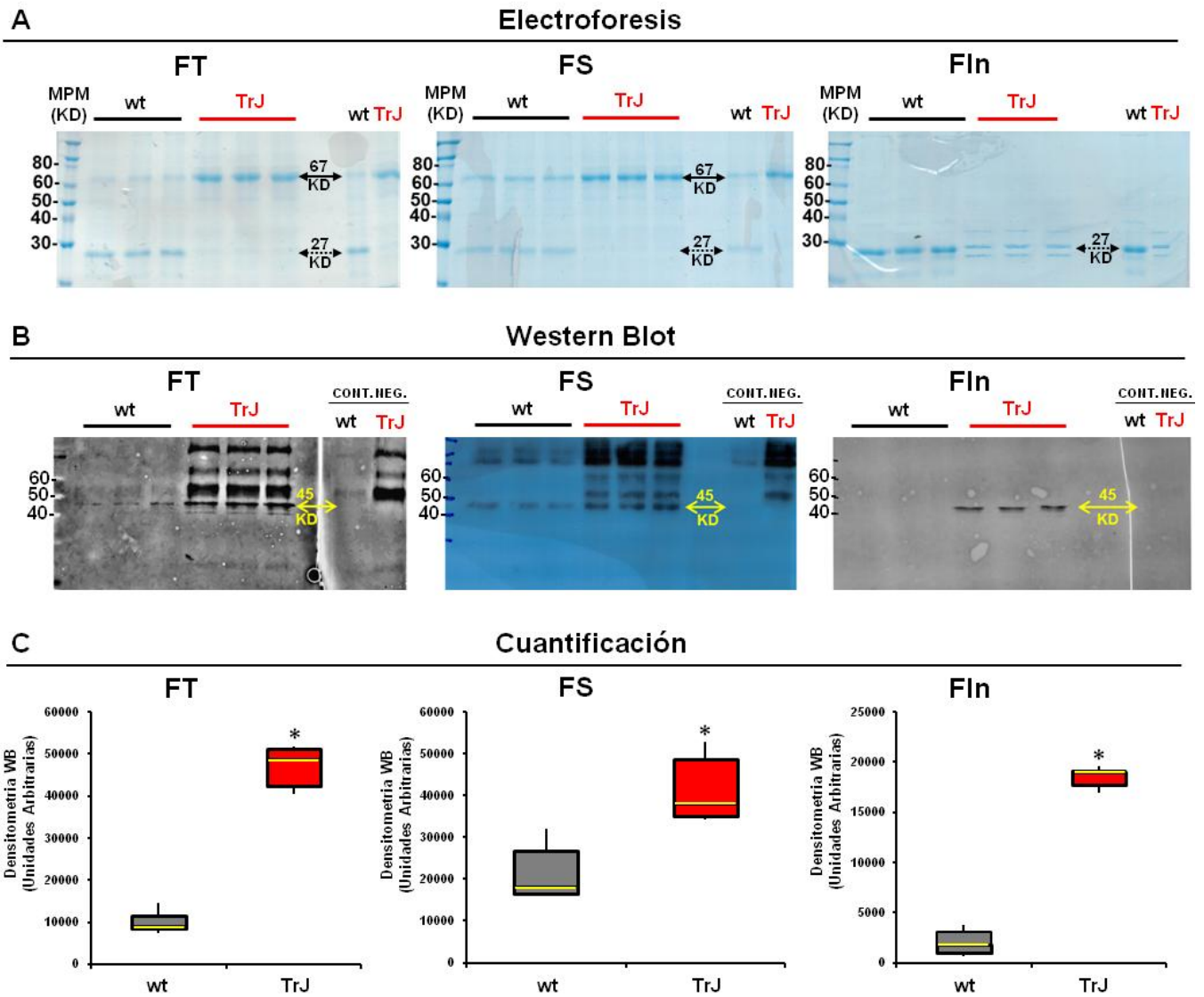


Figura 11. Niveles de actina total, G-actina y F-actina en nervios ciáticos de ratones wt y TrJ. A) SDS-PAGE en acrilamida al 12%, teñidas con azul de coomasie, para las fracciones total (FT), soluble (FS) e insoluble (Fln) obtenidas para cada genotipo (wt y TrJ). Se sembraron 12 μ g de proteína total en cada carril de la FT, 5 μ g de proteína total en cada carril de FS y 2 μ g de proteína total en cada carril de Fln. Las flechas negras continuas señalan una banda (67 KD) de mayor intensidad en el genotipo TrJ, presente en la FT y FS. Las flechas negras punteadas señalan una banda (27 KD) de mayor intensidad en el genotipo wt, presente en todas las fracciones. MPM: marcador de peso molecular en kilo Daltons (KD). **B)** Western Blot (WB) para β actina de geles gemelos a los presentados en A) para cada fracción obtenida. FT y Fln revelados mediante fluorescencia, FS revelado mediante quimioluminiscencia. Los números a la izquierda de cada WB indican el peso molecular en KD. Los últimos dos carriles de cada WB se utilizaron para realizar el control negativo de la inmunoreacción, donde ese trozo de membrana fue incubada únicamente con el anti-anticuerpo utilizado para revelar el WB. La flecha amarilla indica una banda de 45 KD presente en el WB pero no en el control negativo. **C)** Gráfico de caja (box plot) donde se cuantifica mediante densitometría (unidades arbitrarias) la intensidad de la banda de 45KD mostrada en B) en función del genotipo (wt, TrJ), en cada fracción obtenida. La línea amarilla horizontal dentro de la caja representa la mediana. El largo de la caja (rango: cuartil 1 – cuartil 3) más las barras, representan el rango en el que se encuentran los datos. El asterisco (*) indica diferencias significativas con $p < 0,01$.

El peso molecular de la beta-actina es 42 KD, sin embargo el reconocimiento de dicha proteína en nervios ciáticos de ratones o de CS en cultivo mediante SDS-PAGE y WB, utilizando el mismo anticuerpo específico que se ensayó en este trabajo, puede dar pesos moleculares aparentes de hasta 48 KD (Ruani *et al.*, 2016). Considerando además que en la FIn (F-actina) se observa que la banda de 45 KD es mas abundante en el genotipo TrJ, lo que coincide con los resultados de nuestro grupo de trabajo (Tesis de Maestría Bresque, 2014; Kun *et al.*, 2012), se resolvió considerar dicha banda como señal específica para nuestra proteína problema. La cuantificación de la intensidad de la banda de 45 KD (en unidades arbitrarias-UA) obtenida en los WB de todas las fracciones en función del genotipo, evidenció que los niveles de actina total, G-actina y F-actina son mayores en el genotipo TrJ respecto del wt (Figura 11-C; Apéndice-Tabla 2).

Cabe destacar que la cuantificación de la señal en los WB, se realizó únicamente considerando que en cada carril, para una fracción dada, se había sembrado la misma cantidad de proteína total pero en ausencia de un control de carga. En nuestro caso, debíamos buscar una proteína que se expresara constitutivamente en el nervio ciático, en niveles similares en ambos genotipos. Con este objetivo, las proteínas usualmente utilizadas son las de citoesqueleto actina y tubulina o proteínas solubles tal como el enzima GADPH. La metodología empleada utiliza detergentes en la solución de homogenización de tejido con una posterior centrifugación de 100.000xg (Ver Sección 3.4). Esta combinación permite obtener un sobrenadante enriquecido en proteínas solubles y un precipitado enriquecido en núcleos, mitocondrias, vesículas y citoesqueleto no desensamblado (Alberts *et al.*, 2008). Por esto, es que se consideró ensayar como control de carga una proteína que estuviera presente tanto en la fracción soluble como en la precipitada. Los ensayos realizados para β tubulina, mostraron diferencias en la intensidad de señal de WB en todas las fracciones para cada genotipo (Apéndice-Figura 2). Este resultado sumado a la diferencia en la intensidad de las bandas de muestras wt y TrJ para todas las fracciones (Figura 11-A), sugiere que la presencia de un candidato proteico con expresión constitutiva y constante en ambos genotipos pueda ser difícil de encontrar.

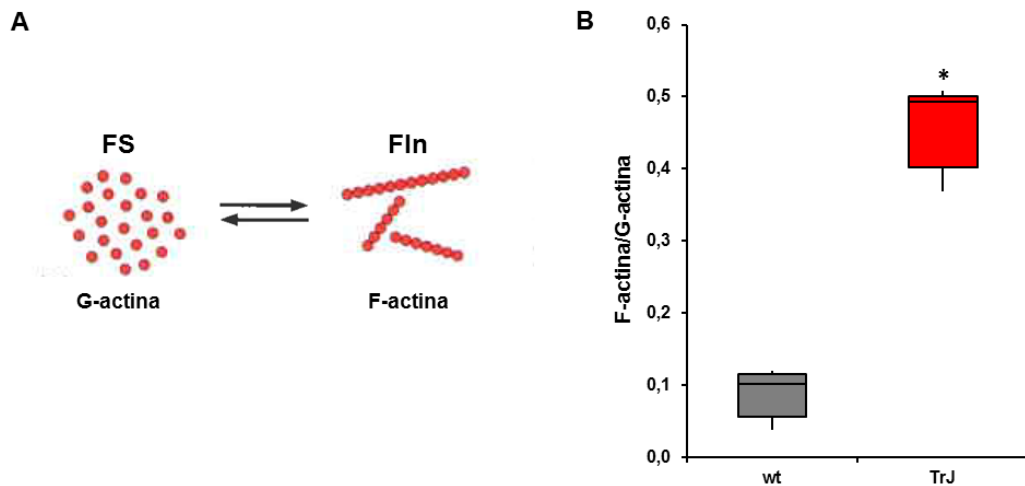


Figura 12. Relación F-actina/G-actina en nervios ciáticos de ratones wt y TrJ. **A)** El esquema representa la reacción de formación de microfilamentos (F-actina) a partir de actina soluble (G-actina). La fracción insoluble (FIn) se encuentra enriquecida en F-actina mientras que la fracción soluble (FS) se encuentra enriquecida en G-actina. **B)** Gráfico de caja (box plot) donde se cuantifica la relación F-actina/G-actina en función del genotipo (wt, TrJ). Se calculó para cada genotipo, el cociente de los valores densitométricos obtenidos para la banda de 45KD en la FIn y la FS (ver Figura xxx. B y C). El largo de la caja (rango cuartil 1 – cuartil 3) más las barras, representan el rango en el que se encuentran los datos. La línea negra dentro de la caja representa la mediana. El asterisco (*) indica diferencias significativas con $p < 0,01$.

Si bien los resultados del WB evidenciaron mayores niveles de G-actina y F-actina y por ende, de actina total, esto no necesariamente implica que la relación entre G-actina y F-actina, en cada genotipo sea distinta. Para ello, a partir de los datos densitométricos extraídos de los WB para β -actina de la FS y FIn, se analizó el cociente F-actina/G-actina (Figura 12 A y B), a modo de representar la reacción de formación de microfilamentos a partir de sus monómeros solubles. Los resultados evidenciaron que esta relación, es 5 veces mayor en las muestras provenientes de genotipo TrJ con respecto a las wt (Figura 12-B, Apéndice-Tabla 3).

4.3-Estabilidad de los microfilamentos en nervios ciáticos de ratones wt y TrJ

Para cumplir con el tercer objetivo específico, se procedió a evaluar la estabilidad de la F-actina en fibras de nervios ciáticos de ratones wt y TrJ, mediante el uso de citocalasina D. Esta toxina de origen fúngico y permeable a membranas provoca la depolimerización del citoesqueleto de actina, dado que

se asocia al extremo del filamento donde la incorporación de monómeros es más rápida (extremo mas "+"). Esto provoca la disrupción del filamento ya formado e impide la neopolimerización del mismo. Además, la citocalasina D es capaz de inducir cambios conformacionales en los monómeros de actina, así como la formación de dímeros de G-actina-ATP, causando una hidrólisis del nucleótido más rápida que en el monómero libre (Goddette & Frieden, 1986; Sampath & Pollard, 1991).

En la Figura 13 se muestran micrografías confocal de fluorescencia para las sondas Faloidina (F-actina) y DAPI (núcleos), de nervios ciáticos de ambos genotipos extraídos y fijados inmediatamente (C0) o tratados por una 1 hora en ausencia (C1) o presencia (CD) de citocalasina D. A tiempo 0 (C0) y para el genotipo wt (Figura 13-A), se puede observar que la señal de faloidina esta distribuída por dominios discretos de la fibra (flechas blancas), donde se pueden apreciar con claridad las ISL (cabezas de flecha amarillas), así como también grandes regiones con ausencia de señal, que se corresponden a las regiones internodales de mielina compacta. Sin embargo en el genotipo TrJ (Figura 13-D) la señal de Faloidina global es más intensa que en el wt, además de encontrarse distribuida de forma más homogénea sobre la fibra, lo cual coincide con lo reportado por nuestro grupo (Kun *et al.*, 2012; Tesis Maestría Bresque, 2014).

Cuando las fibras de nervios ciáticos de ambos genotipos son tratadas con citocalasina D (Figura 13-C (wt) y F (TrJ)), se puede observar que la intensidad de señal global de Faloidina es similar entre los genotipos, pero es mucho menor que la señal que presentan sus respectivos controles (Figura 13-B (wt) y E (TrJ)), además de casi no observarse la señal de actina filamentosa a nivel de las ISL. También puede apreciarse que en el genotipo wt, la intensidad de señal global de Faloidina a tiempo 0 es menor que en las fibras incubadas 1 hora en ausencia de citocalasina D (Figura 13-A y B). Sin embargo en el genotipo TrJ, en principio, no se observan diferencias entre C0 y C1 (Figura 13-D y E). Cabe destacar que las micrografías efectuadas con la sonda DAPI, evidencian en nervios ciáticos de genotipo TrJ (Figura 13-D1, E1, F1) un mayor número de núcleos por fibra con respecto al genotipo wt (Figura 13-A1, B1, C1), lo cual también ya ha sido reportado por otros autores (Henry *et al.*,

1983; Li *et al.*, 2013) así como por nuestro grupo (Tesis Maestría Bresque, 2014).

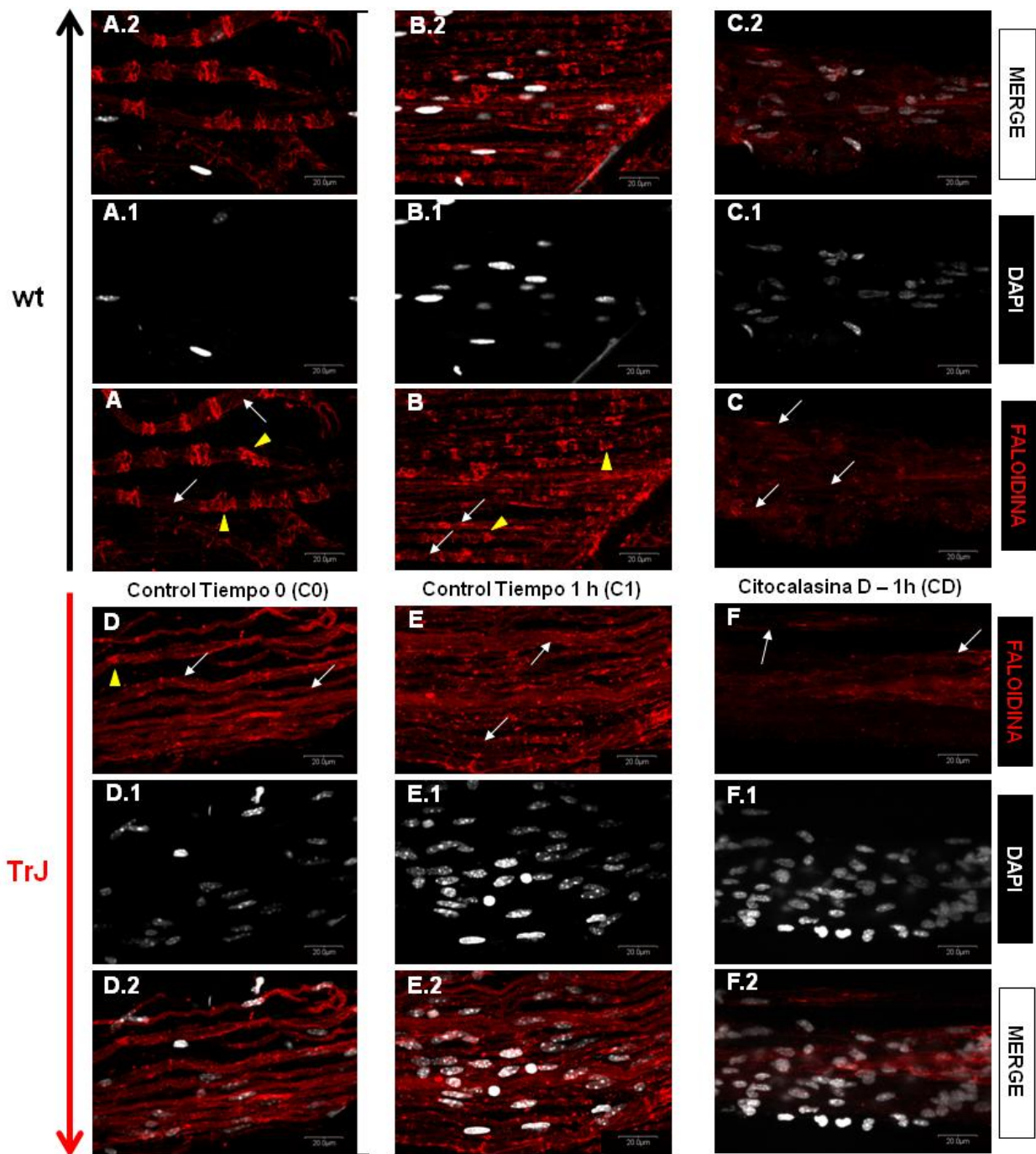


Figura 13. Estabilidad de F-actina en nervios ciáticos de ratones wt y TrJ. La figura muestra micrografías confocal de fluorescencia (60X). Cada una de ellas son proyecciones máximas de 10 planos confocales consecutivos (tomados cada 1μm). Fibras de nervios ciáticos de ratones wt (A,B,C) y TrJ (D,E,F) teñidas con Faloidina (rojo) para evidenciar el citoesqueleto de actina en las condiciones C0(A-A.2; D-D.2), C1(B-B.2; E-E.2) y luego del tratamiento con citocalasina D 2μM (CD) durante 1 hora (C-C.2; F-F.2). En blanco se observan los núcleos de fibras wt (A.1, B.1, C.1) y TrJ (D.1, E.1, F.1), evidenciados mediante tinción con DAPI. A.2, B.2, C.2 muestra el merge para Faloidina y DAPI en C0,C1 y CD respectivamente, para el genotipo wt; mientras que D.2, E.2 y F.2 lo muestran para el genotipo TrJ. Flechas blancas: fibras de nervios ciáticos. Cabezas de flecha amarillas: ISL. La barra blanca al pie de cada imagen indica 20 μm.

La cuantificación de la señal de Faloidina en regiones internodales, tal como se justificó y describió en la Sección 3.7.3, se observa en la Figura 14.

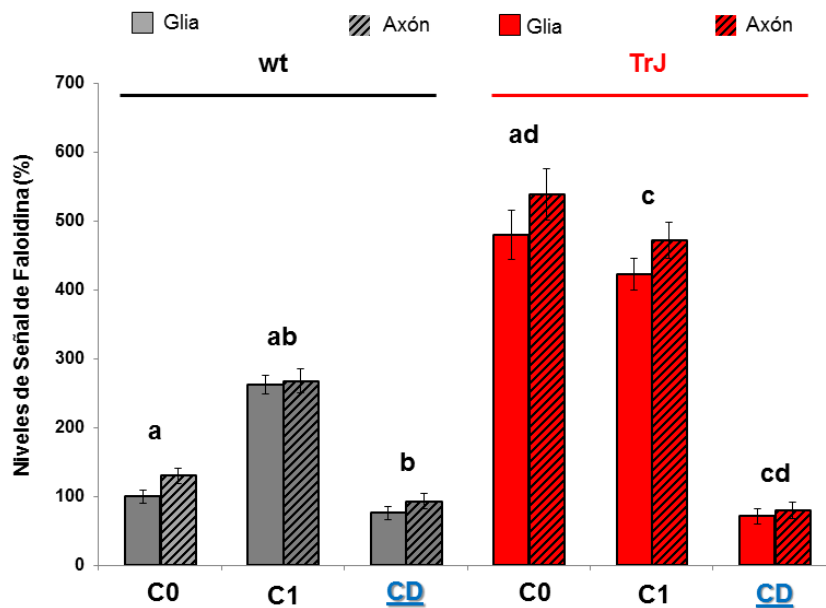


Figura 14. Niveles de F-actina en nervios ciáticos de ratones wt y TrJ pre y pos tratados con citocalasina D. El grafico muestra las medias de los niveles de señal de Faloidina en regiones internodales de fibras de nervios ciáticos wt (gris) y TrJ (rojo) en los dominios gliales (gris o rojo liso) y axonales (gris o rojo rayado) para cada condición. Los valores fueron normalizados contra el valor de la media de la señal de faloidina para el dominio glial en el genotipo wt, el cual se consideró como 100%. C0: Tiempo 0; C1: 1 hora de incubación en ausencia de citocalasina D; CD: 1 hora de incubación con citocalasina D 2µM. Las barras representan el ES. Misma letra sobre las barras indica diferencias significativas con p<0,01.

Los niveles de señal de faloidina intermodal, en los dominios gliales versus los dominios axonales, para una misma condición, no presentaron diferencias significativas para ninguno de los genotipos (Apéndice-Tabla 1).

A tiempo 0, la señal de faloidina internodal, tanto en dominios gliales como axonales, son 4 veces mayores en el genotipo TrJ con respecto al wt (Figura 14, Apéndice-Tabla 5), lo que coincide con lo reportado por nuestro grupo (Tesis Maestría Bresque; 2014).

Luego del tratamiento con citocalasina D, la intensidad de señal de Faloidina internodal, tanto en dominios gliales como axonales, disminuye 2 veces en el genotipo wt respecto de su control. Sin embargo en el genotipo TrJ y para ambos dominios, esta señal disminuye cuatro veces con respecto a su control (Figura 14, Apéndice-Tabla 5).

Cabe destacar que luego de finalizado el tratamiento con citocalasina D, la señal de Faloidina intermodal no presentó diferencias significativas respecto del genotipo para ninguno de los 2 dominios (Figura 14, Apéndice-Tabla 5).

Por último, se debe señalar, que las fibras wt presentan un aumento en la señal intermodal de Faloidina cuando son incubadas 1 hora en ausencia de CD con

respecto al tiempo 0. Sin embargo, en el genotipo TrJ, esta señal no presenta diferencias significativas entre las condiciones C0 y C1 (Figura 14, Apéndice-Tabla 5).

4.4-Niveles de OCT6 en fibras de nervios ciáticos de ratones wt y TrJ

Para testear la hipótesis de que el incremento de F-actina observado en las fibras periféricas de nervios ciáticos de ratones TrJ, está asociado a una disminución de los niveles de AMPc, se propuso utilizar como indicador el factor de transcripción OCT6 el cual es inducible por AMPc (Monuki *et al.*, 1989). Como ya fue descrito, OCT6 es un regulador de la mielinización con localización nuclear y citoplasmática (Baranek *et al.*, 2005), cuya expresión es transitoria, siendo máxima en las CS promielinizantes. Dicha expresión decae en el proceso de mielinización, pero se ha observado su expresión en CS mielinizantes en nervios surales humanos (Kawasaki *et al.*, 2003; Zorick *et al.*, 1996). Por esta razón es que se planteó como primera medida, determinar los niveles de expresión basal de OCT6 en las fibras nerviosas de ratones wt y TrJ (Figura 15-A y B). La inmunohistoquímica para OCT6 de fibras de nervios ciáticos extraídas e inmediatamente fijadas (C0, ver Sección 3.2), revela una distribución de la señal que se localiza en los núcleos y en la membrana abaxonal de la CS y en dominios axonales en el genotipo wt (A y A.3, magnificación en recuadro amarillo). Sin embargo en el genotipo TrJ esta señal es menos intensa y se encuentra distribuída de forma mas homogénea sobre la fibra (B magnificación en recuadro amarillo).

La cuantificación de la señal de OCT6 en regiones nucleares y perinucleares de la CS en la fibra nerviosa tal como se describió y justificó en la sección 3.7.3 se muestra en la Figura 16-A. Dicha cuantificación evidenció una localización mayor a nivel nuclear respecto de la región perinuclear independiente del genotipo. Sin embargo el genotipo TrJ muestra niveles menores de OCT6 tanto en el dominio nuclear como perinuclear respecto del wt (Apéndice-Tabla 6).

A su vez, la cuantificación de la señal de OCT6 en los dominios citoplasmáticos gliales y axonales de la fibra nerviosa tal como se describió y justificó en la sección 3.7.3 se muestra en la Figura 16-B. Dicha cuantificación evidenció que la distribución de OCT6 en los dominios gliales y axonales no presenta

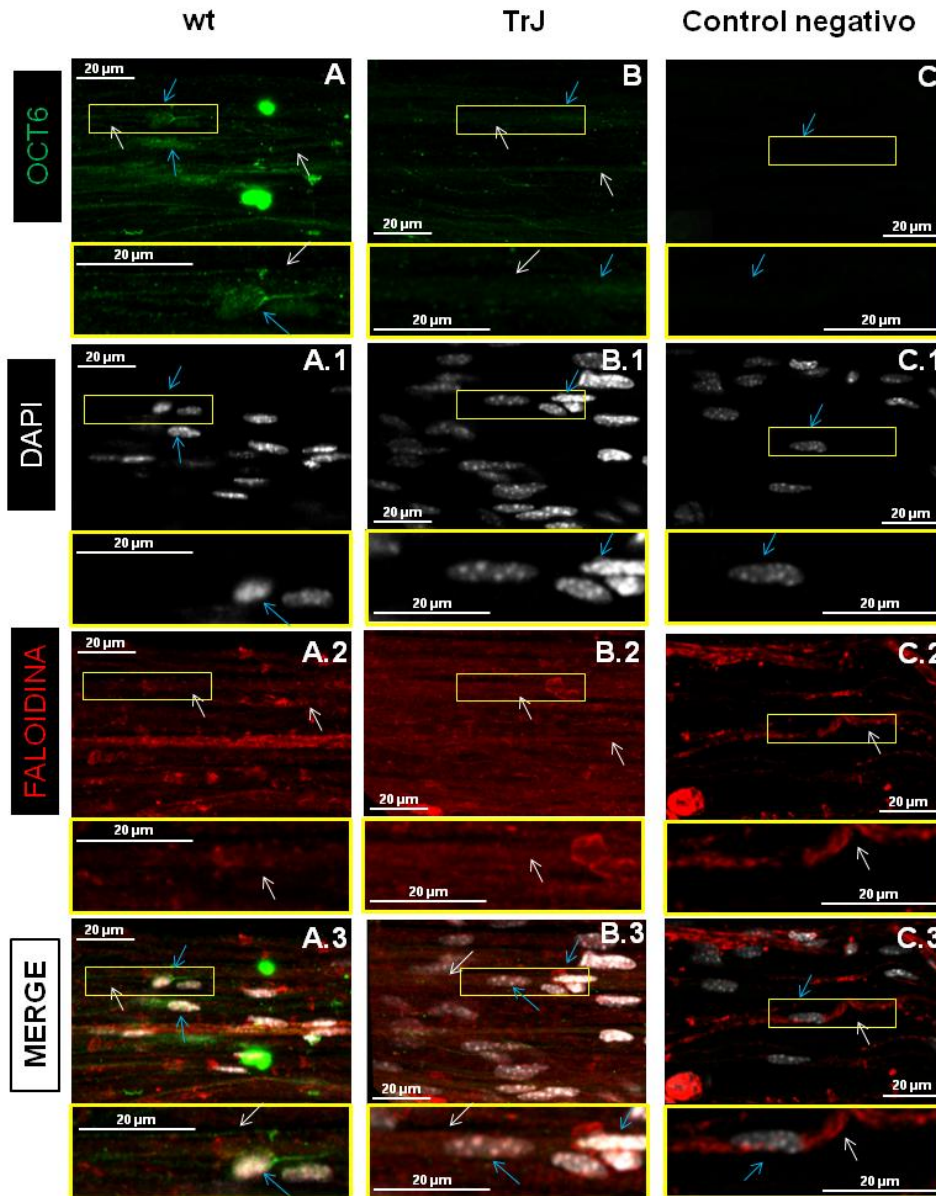


Figura 15. Niveles de OCT6 en nervios ciáticos de ratones wt y TrJ a tiempo 0 (C0). La figura muestra micrografías confocal de fluorescencia(60X). Cada una de ellas son proyecciones máximas de 10 planos confocales consecutivos (tomados cada 1µm). Fibras de nervios ciáticos de ratones wt (A a A.3) y TrJ (B a B.3), extraídas, inmediatamente fijadas (C0) e inmunoteñidas con un anti-anticuerpo conjugado a Alexa 488 (verde), que reconoce el inmunocomplejo OCT6-anti OCT6 en el genotipo wt y TrJ (A y B). C corresponde al control negativo de la inmunohistoquímica para OCT6, donde el tejido fue incubado con el anti-anticuerpo pero en ausencia del anti-OCT6. A su vez, las fibras fueron co-teñidas con DAPI (blanco) para evidenciar los núcleos (A.1, B.1, C.1), Faloidina (rojo) para evidenciar el citoesqueleto de actina (A.2, B.2, C.2). En A.3 (wt), B.3(TrJ) y C.3(control negativo) se muestra el merge para los 3 marcadores antes mencionados. Flechas blancas: fibras de nervios ciáticos. Flechas azules: posición de los núcleos. El recuadro amarillo en cada figura se presenta magnificado al pie de la misma. La barra blanca en cada imagen indica 20 µm.

diferencias significativas independientemente del genotipo. Sin embargo el genotipo TrJ muestra nuevamente niveles menores de OCT6 tanto en el dominio glial como en el axonal respecto del wt (Apéndice-Tabla 7).

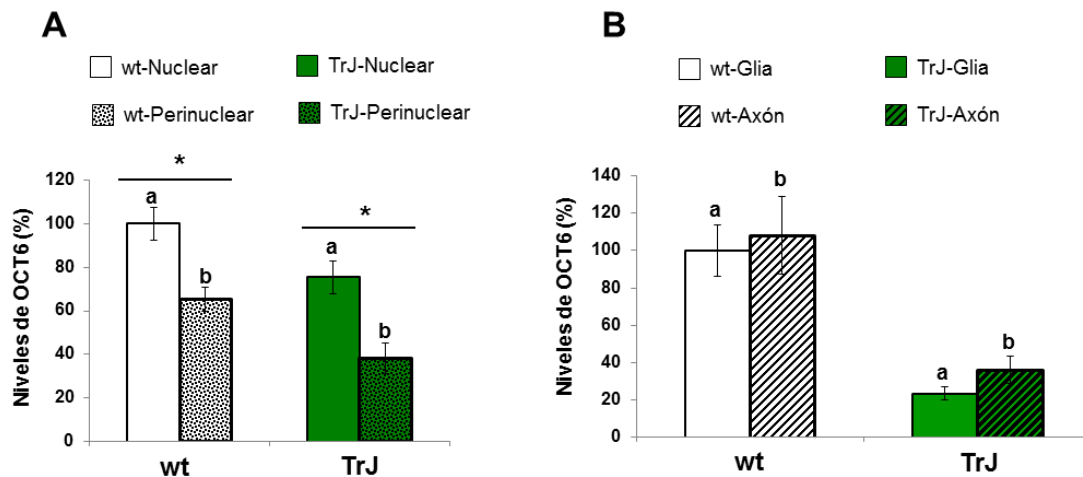


Figura 16. Cuantificación de los niveles de OCT6 en nervios ciáticos de ratones wt y TrJ a tiempo 0 (C0). Los graficos muestran las medias de los niveles de señal del anti-anticuerpo conjugado a Alexa 488 que reconoce el inmunocomplejo OCT6-anti OCT6 en distintos dominios y regiones de la fibra nerviosa. En A se observa los niveles de intensidad de señal para el genotipo wt (blanco) y TrJ (verde) en regiones nucleares (blanco o verde liso) y perinucleares (blanco o verde punteado) de fibras de nervios ciáticos. Los valores fueron normalizados contra el valor de la media de señal para la región nuclear en el genotipo wt, el cual se consideró 100%. En B se observa los niveles de señal en fibras de nervios ciáticos wt (blanco) y TrJ (verde) en los dominios gliales (blanco o verde liso) y axonales (blanco o verde rayado). Los valores fueron normalizados contra el valor de la media de la señal para el dominio glial en el genotipo wt, el cual se consideró como 100%. Las barras representan el ES. El asterisco (*) indica diferencias significativas intragenotipo con $p < 0,05$. Misma letra sobre las barras indica diferencias significativas intergenotipo con $p < 0,01$.

4.5-Efecto del db-AMPC en las fibras de nervios ciáticos de ratones wt y TrJ

Para evaluar la modulación por AMPC del citoesqueleto de actina en las fibras de nervios ciáticos, se propuso incubar ex-vivo las fibras nerviosas de ratones de ambos genotipos en presencia y ausencia de db-AMPC (DB), un análogo al AMPC permeable a membranas (ver Sección 3.2). Considerando que OCT6 es un factor de transcripción tejido-específico inducible por AMPC, se planteó utilizarlo como indicador del efecto del tratamiento con DB.

La figura 17 muestra micrografías confocal de fluorescencia para el reconocimiento de OCT6 (verde), núcleos (blanco) y F-actina (rojo) en nervios ciáticos de ambos genotipos extraídos y tratados por una 1 hora en ausencia (C1) o presencia de db-AMPC.

Con respecto a OCT6 se puede observar que en ausencia de tratamiento (C1), los niveles de este marcador son menores para el genotipo TrJ (C) respecto del wt (A), al igual que lo observado a tiempo 0 (ver Sección 4.4). Esto indica que el comportamiento de este marcador se mantiene, en la fibra nerviosa incubada 1 hora ex-vivo en ausencia de tratamiento. Por otra parte, se puede observar que el tratamiento con DB induce respecto del control (A y C), un aumento en ambos genotipos (B y D), en la intensidad de señal fluoróforo conjugado al anticuerpo que reconoce el inmunocomplejo OCT6-anti OCT6, principalmente en regiones nucleares, indicando que el tratamiento tuvo efecto.

Con respecto a los niveles de F-actina se puede observar que en ausencia de tratamiento (C1) los niveles de Faloidina son mayores para el genotipo TrJ (C.2) respecto del wt (A.2), mostrando el mismo comportamiento ya descrito en la sección 4.3. Sin embargo, el tratamiento con DB pareciera provocar efectos disitintos sobre la señal de actina filamentosa reconocida por la Faloidina en cada genotipo. En las fibras wt, el tratamiento de 1 hora con DB (B.2), pareciera generar un leve aumento en la señal global de Faloidina respecto del control (B.1), mientras que en las fibras TrJ, este tratamiento (D.2) induce una disminución en la señal global de Faloidina respecto de su control (C.2). La cuantificación de la señal de OCT6 y Faloidina en las distintas regiones de la fibra de nervio ciático de ambos genotipos, tal como se describió y se justificó en la Sección 3.7.3, se ilustra en la Figura 18.

Los niveles de OCT6 mostraron una localización mayor a nivel nuclear respecto de la región perinuclear independiente del genotipo y tratamiento. Sin embargo el tratamiento, solo indujo cambios en las regiones nucleares, respecto del control, en ambos genotipos, no encontrándose diferencias significativas en las regiones perinucleares respecto de su control (Figura 18 A y B; Apéndice-Tabla 8 (wt) y 9 (TrJ)).

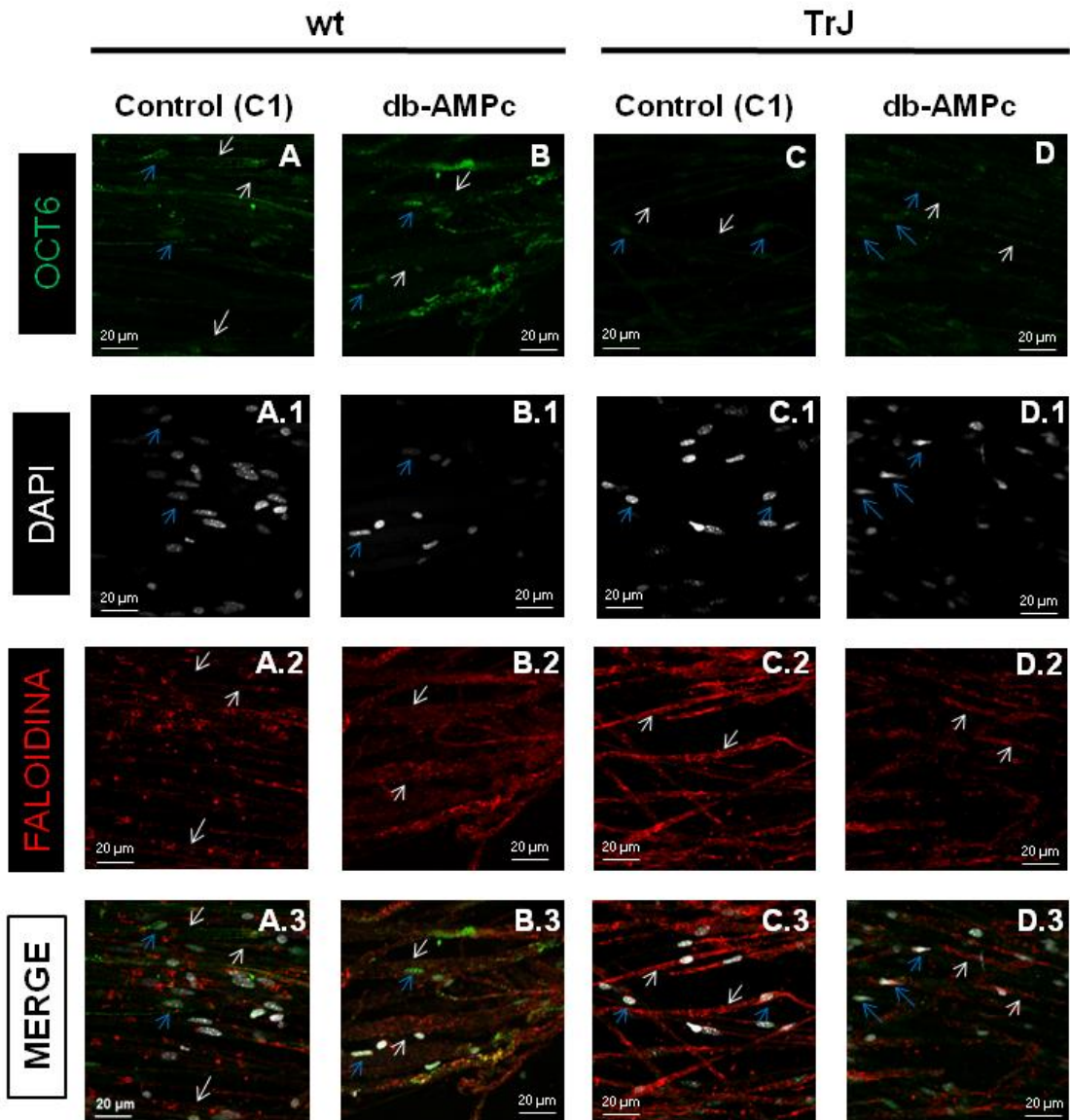


Figura 17. Efecto del db-AMPc en fibras de nervios ciáticos de ratones wt y TrJ. La figura muestra micrografías confocal de fluorescencia (60X). Cada una de ellas son proyecciones máximas de 10 planos confocales consecutivos (tomados cada 1 μ m). Fibras de nervios ciáticos de ratones wt (A a A.3 y B a B.3) y TrJ (C a C.3 y D a D.3), incubadas durante 1 hora en medio Neurobasal en ausencia (Control-C1; A a A.3 y C a C.3) o presencia de db-AMPc 1,5 mM (B a B.3 y D a D.3). Las fibras fueron inmunoteñidas con un anti-anticuerpo conjugado a Alexa 488 (verde), que reconoce el inmunocomplejo OCT6-anti OCT6 en el genotipo wt y TrJ (A, B, C y D) A su vez, las fibras fueron co-teñidas con DAPI (blanco) para evidenciar los núcleos (A.1, B.1, C.1 y D.1), Faloidina (rojo) para evidenciar el citoesqueleto de actina (A.2, B.2, C.2 y D.2). En A.3, B.3, C.3 y D.3, se muestra el merge para los 3 marcadores antes mencionados. Flechas blancas: fibras de nervios ciáticos. Flechas azules: posición de los núcleos. La barra blanca en cada imagen indica 20 μ m.

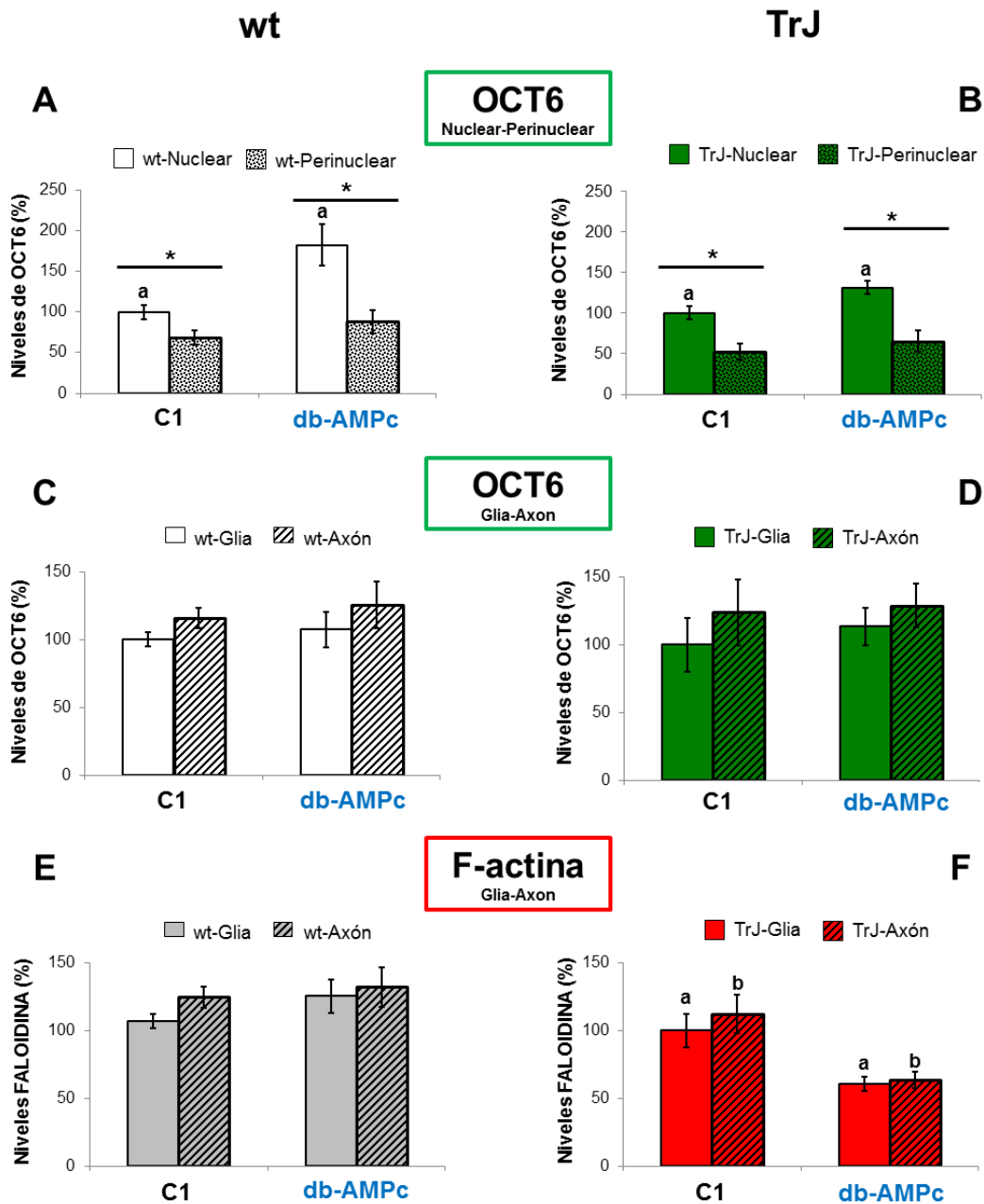


Figura 18. Efecto del db-AMPC sobre los niveles de OCT6 y F-actina en fibras nerviosas de ratones wt y TrJ. A, B, C y D. Los gráficos muestran las medias de intensidad de señal del anti-anticuerpo conjugado a Alexa 488 que reconoce el inmunocomplejo OCT6-anti OCT6 en fibras de nervios ciáticos wt (A y C) y TrJ (B y D), incubadas 1 hora en ausencia (C1) o presencia de db-AMPC 1,5 mM. En A y B se observa la cuantificación de dicha señal en regiones nucleares (blanco o verde liso) y perinucleares (blanco o verde punteado) de la CS de la fibra nerviosa de ambos genotipos en cada condición. En C y D se observa la cuantificación para los dominios gliales (blanco o verde liso) y axonales (blanco o verde rayado) de la fibra nerviosa de ambos genotipos en cada condición. **E y F.** Los gráficos muestran las medias de intensidad de señal de FALOIDINA en fibras de nervios ciáticos de ratones wt (E) y TrJ (F) incubadas 1 hora en ausencia (C1) y presencia de db-AMPC 1,5 mM, en dominios gliales (gris o rojo liso) y axonales (gris o rojo rayado). En cada gráfico, los valores fueron normalizados contra el valor de la media de intensidad de señal para el dominio nuclear o glial (según corresponda) en la condición control (C1), la cual se consideró 100%. Las barras representan el ES. El asterisco (*) indica diferencias significativas intratratamiento con $p < 0,05$. Misma letra sobre las barras indica diferencias significativas entre tratamientos con $p < 0,01$.

A su vez, la cuantificación de la señal de OCT6 en los dominios citoplasmáticos gliales y axonales de la fibra nerviosa evidenció que la distribución de OCT6 es homogénea en la fibra independientemente del genotipo y el tratamiento. En estos dominios, el tratamiento con db-AMPC no indujo cambios en los niveles de OCT6 respecto de su control, en ninguno de los genotipos (Figura 18 C y D, Apéndice-Tabla 10 y 11).

Con respecto a la cuantificación de la señal de Faloidina en los dominios citoplasmáticos gliales y axonales de la fibra nerviosa, se puede apreciar que la que la distribución de esta señal es homogénea en la fibra independientemente del genotipo y el tratamiento. Pero en estos dominios, el tratamiento con db-AMPC, solo indujo cambios en el genotipo TrJ, disminuyendo los niveles de señal de Faloidina tanto en el dominio glial como axonal, respecto de su control (Figura 18 E y F, Apéndice-Tabla 12 y 13).

5 – Discusión

La presente tesis de maestría analiza posibles causas de la diferencia observada en el citoesqueleto de actina de fibras de nervios ciáticos de ratones TrJ (modelo animal de CMT1E) respecto de ratones wt (Tesis Maestría Bresque, 2014; Kun et al., 2012).

Una causa probable del aumento de los niveles de F-actina observado en estas fibras, podría deberse a un aumento en los niveles de expresión de G-actina. Nosotros hipotetizamos que al haber más monómero, podría ensamblarse más polímero. Pero un aumento en los niveles proteicos puede estar vinculado a un aumento en la síntesis proteica o a un aumento en la síntesis del ARNm que codifica para esa proteína que finalmente se traduce, o ambas, entre otras opciones de regulación.

Observando el problema desde este ángulo fue que nos propusimos determinar los niveles relativos de ARNm de β -actina en la fibra nerviosa de ambos genotipos. Nuestros resultados indican que los niveles de transcrito de β -actina en la fibra nerviosa del genotipo TrJ es 3 veces mayor que en el genotipo wt.

Considerando el fenotipo histo-patológico de los nervios ciáticos de los ratones TrJ, éste se corresponde con una hipomielinización crónica, ocasionada por una mielinización defectuosa e inestable, que alterna constantemente episodios de degeneración y regeneración (Verheijen et al., 2011). Estos procesos necesitan una reorganización dinámica del citoesqueleto de actina, como ya se ha señalado en la Introducción. Y una forma de responder a estos cambios constantes, podría conseguirse a través del aumento de los niveles transcripcionales de *β -actina*.

Es importante señalar que en nervios ciáticos de ratones TrJ se analizaron los niveles de ARNm que codifican para las proteínas PMP22, MBP, MAG, vimentina y los factores E2F8 y EIF3E de inicio de la transcripción y traducción respectivamente, no encontrándose diferencias significativas de estos transcritos respecto del wt (Tesis de Maestría Romeo, 2016). Esto sugiere que la diferencia encontrada en los niveles de ARNm de β -actina en los nervios ciáticos de los ratones TrJ, podría ser una característica específica del genotipo TrJ.

Por otra parte, el análisis de proteínas totales (FT) de los nervios ciáticos de ratones wt y TrJ, mostraron grandes diferencias en el patrón e intensidad de bandas obtenidas en el SDS-PAGE, lo cual ha sido reportado recientemente por Romeo (2016). En particular, en esta fracción se observó para el genotipo TrJ una disminución en la banda de 27 KD y un aumento en la banda de 67 KD, respecto del genotipo wt. Este resultado es coincidente con lo señalado por Bürgisser y colaboradores (1987) para ratones Tr, en donde no sólo observan diferencias en el patrón e intensidad de las bandas obtenidas en el SDS-PAGE, respecto del genotipo salvaje, sino que además observan el mismo comportamiento en las bandas de 27 y 67 KD, que acabamos de describir. Estos autores atribuyen la disminución observada en la banda de 27 KD, a una disminución en MPZ, considerando que el peso molecular de esta proteína es de 25 KD y que es la proteína más abundante en la mielina del SNP (Bürgisser et al., 1987). Esta banda está presente en los SDS-PAGEs de las FS y FIn, con el mismo comportamiento. El contenido de detergentes presentes en el buffer de homogenización con el que se trató los nervios ciáticos de ratones de cada genotipo, tenía como objetivo insolubilizar el citoesqueleto de la fibra nerviosa, para luego precipitarlo como una red, mediante ultracentrifugación. Considerando que MPZ es una proteína de mielina, la cual no se encuentra asociada directamente al citoesqueleto, sería razonable pensar que la misma se encontraría en la fracción soluble (Scherer & Arroyo, 2002). El hecho de que dicha banda también aparezca en la FIn y con el mismo comportamiento según el genotipo, podría indicar contaminación de dicha fracción por la FS, o la presencia de otra/s proteína/s con pesos moleculares aparentes cercanos a los 27 KD, con menor expresión en el genotipo TrJ en comparación con el wt. Respecto de la banda de 67 KD, la misma se aprecia claramente en los SDS-PAGEs de la FT y FS, mientras que en la FIn, la detección de bandas de alto peso molecular es difícil, dada la baja intensidad de la coloración (azul de Coomassie) en esa región del gel. Esto puede deberse a la escasa presencia de proteínas con pesos moleculares altos en la FIn y que la cantidad de proteína total sembrada para esta fracción, en el gel, no fue suficiente para obtener una mejor resolución de estas bandas. Todo esto sugiere que la banda de 67 KD podría contener principalmente una proteína soluble, no asociada al citoesqueleto. De todas formas, la caracterización molecular de las bandas de

27 y 67 KD mediante espectrometría de masa, será un paso ineludible para la identificación de las proteínas que ellas contienen.

Con respecto a los WB realizados para cada fracción, con el fin de evidenciar los niveles de β -actina en cada una de ellas según el genotipo, se pudo apreciar que los niveles de β -actina son mayores en el genotipo TrJ respecto del wt, en todas las fracciones. Esto no sólo confirma que los niveles de F-actina son mayores en los ratones TrJ respecto de los wt (Bresque, 2014; Kun et al., 2012), sino que indica que los niveles de G-actina también son mayores en el genotipo TrJ. Pero como ya mencionamos, niveles mayores de G-actina y F-actina, no indica necesariamente cambios en la relación F-actina/G-actina según el genotipo. Considerando que este cociente representa el equilibrio de formación del microfilamento, nuestros resultados indican que este equilibrio se encontraría desplazado hacia la formación de F-actina en los nervios ciáticos de ratones TrJ respecto del wt.

La polimerización de actina, es un proceso dinámico que consta de 3 fases en función del tiempo. Durante la primera fase (fase lag), algunos de los pequeños agregados inestables de G-actina presentes en el citoplasma de la célula, son capaces de pasar la barrera cinética que genera la nucleación de estos monómeros. Esto permite la transición hacia un oligómero más estable, el cual será la base para la polimerización del filamento. A continuación de la fase lag, se da la fase de elongación, donde el filamento crece rápidamente debido a la rápida adición de monómeros sobre los extremos del filamento. El extremo del filamento donde la incorporación de monómeros es más rápida, se denomina extremo mas "+", mientras que en el extremo donde dicha incorporación es más lenta se denomina extremo menos "-". En otras palabras, la polimerización del filamento se ve favorecida en el extremo +, mientras que la depolimerización se ve favorecida en el extremo -. Finalmente, el sistema se aproxima a un estado estacionario, donde la tasa de incorporación de monómeros se iguala a la tasa de disociación de los mismos. En este proceso de intercambio de monómeros de actina (treadmilling) no hay un crecimiento neto del filamento, por lo cual el largo del mismo se mantiene relativamente constante. En este punto, la concentración de monómeros libres en solución se denomina Concentración crítica (Cc). Por lo tanto, para que se produzca un crecimiento neto del filamento, deben haber extremos + disponibles y la

concentración de monómero libre debe ser mayor a la C_c (Alberts et al., 2008). Si la C_c no se alcanza, el sistema tiende a seguir formando el filamento. Según los resultados obtenidos, en los nervios ciáticos de los ratones TrJ, los niveles de ARNm de β -actina, así como los de G-actina son mayores respecto del wt. Esto podría indicar que la concentración de monómero es siempre alta, por lo tanto es esperable que haya más actina polimerizada en los nervios ciáticos de los ratones TrJ respecto del wt.

Otro factor que podría estar influyendo en estas observaciones es la estabilidad del microfilamento. Ensayos en fibroblastos en cultivo donde se ha estabilizado el citoesqueleto de actina mediante su incubación con Faloidina, han evidenciado que dicha estabilización promueve un aumento de la síntesis de actina, tanto de ARNm como de proteína (Bershadsky et al., 1995). En este sentido es que se decidió explorar en este trabajo, si el genotipo TrJ presentaba en sus nervios ciáticos, una diferencia en la estabilidad de los microfilamentos respecto del wt. Los resultados obtenidos en el ensayo de depolimerización con citocalasina D, no fueron concluyentes. Si consideramos que en el tiempo de incubación con el depolimerizador, la disminución de la señal de Faloidina en el genotipo TrJ fue mayor que en el wt, respecto de sus controles (Figura 14; wt C1 vs CD; TrJ C1 vs CD), podríamos inferir que el citoesqueleto de la fibra nerviosa TrJ es más inestable comparado con el wt. Sin embargo, el hecho de que los niveles de señal de Faloidina en los nervios tratados con citocalasina D de ambos genotipos no presenten diferencias significativas (Figura 14; wt CD vs TrJ CD), indica que en ese periodo ambas muestras alcanzaron un máximo de depolimerización. Pero no es posible determinar con este ensayo, en que momento del período de incubación lo alcanzaron. Para poder determinarlo debería haberse realizado medidas en puntos intermedios al tiempo de incubación planteado.

Cabe destacar que el incremento de Faloidina encontrado en los nervios ciáticos de ratones wt luego de ser incubados una hora en medio neurobasal en ausencia de citocalasina D respecto de su control (wt C0 vs wt C1), podría deberse a algún mecanismo de respuesta del citoesqueleto de actina asociado a la descentralización del nervio. De hecho, en segmentos de axones provenientes de neuronas de hipocampo en cultivo, se observó un fuerte incremento de F-actina y de RhoA, 1 hora después de la disección, sugiriendo

que el aumento de F-actina en esta condición viene dado por la activación de RhoA (Garland et al., 2012). Sin embargo, el genotipo TrJ no exhibe cambios significativos en los niveles de Faloidina, cuando los nervios son incubados una hora en medio neurobasal en ausencia de citocalasina D respecto de su control (TrJ C0 vs TrJ C1).

No obstante, la estabilidad de los microfilamentos es dependiente de proteínas de unión a actina que son capaces de promover la polimerización o depolimerización del mismo (profilina, gelsolina, cofilina, N-Wasp, Arp2/3, entre otras)(Ishikawa; 2007). El estudio de la expresión de estas proteínas en el genotipo wt y TrJ será indispensable para la evaluación integral de la estabilidad del citoesqueleto de actina en ambos genotipos.

Respecto de los niveles de OCT6 en nervios ciáticos de ambos genotipos, se pudo determinar que tanto en el núcleo de la CS como en regiones perinucleares, estos niveles son inferiores en el genotipo TrJ respecto del wt. En las regiones internodales, libres de núcleos, también se pudo observar que en el genotipo TrJ, los niveles de OCT6 son menores respecto del wt.

OCT6 es un factor de transcripción, inducible por AMPc durante el inicio de la mielinización. En el proceso de mielinización, sus niveles de expresión bajan rápidamente casi hasta la extinción y este mecanismo aún se desconoce (Svaren & Meijer, 2008). Se ha sugerido que *Krox 20* está involucrada en dicha regulación, dado que CS que carecen de *Krox 20* no son capaces de disminuir los niveles de OCT6 (Zorick et al. 1996). Sin embargo, en nervios surales humanos normales se ha observado la expresión constitutiva de OCT6 en el núcleo y citoplasma adaxonal de la CS, lo que coincide con nuestros resultados, pero no en dominios axonales, a diferencia de nuestras observaciones (Kawasaki et la., 2003). Asumiendo que OCT6 en etapas posteriores al inicio de la mielinización mantiene su regulación positiva a través de AMPc, podríamos inferir, que en el genotipo TrJ los niveles de AMPc en la fibra nerviosa se encuentran disminuídos respecto del wt.

Sin embargo, la modulación de OCT6 a través de AMPc, en esta etapa de la mielinización, fue confirmada, dado que el tratamiento de los nervios ciáticos de ambos genotipos con db-AMPc, provocó el aumento de los niveles de OCT6 en regiones nucleares y perinucleares de la CS.

Además, este tratamiento, logró también modular los niveles de Faloidina en el genotipo TrJ, disminuyéndolos; mientras que en el genotipo wt no se observaron cambios. Estos resultados sugieren que el incremento de F-actina observado en el genotipo TrJ podría deberse a una disminución en los niveles de AMPc de la fibra nerviosa.

Si asumimos que en este sistema se cumple la vía de señalización propuesta para RhoA en varios tipos celulares, donde el AMPc activa PKA, quien fosforila a RhoA inhibiéndola, provocando la disminución de los niveles de fibras de estrés (Aslam et al., 2010; Sohail et al., 2009; Hall, 1998), nuestros resultados podrían sugerir que la vía RhoA se encuentra sobreactivada. Además, en ratones knockout condicionales en las CS para Rac1, una RhoGTPasa involucrada en la polimerización de actina cortical pero antagonista del efecto de RhoA sobre las fibras de estrés, exhibieron en nervios ciáticos niveles disminuidos de AMPc, además de hipomielinización (Guo et al., 2012; Hall, 1998). Esto refuerza la idea de que una de las causas del fenotipo hipomielinizante observado en el genotipo TrJ esté dada por una disminución en los niveles de AMPc en la fibra nerviosa periférica.

De todas formas, para dar evidencia probatoria de que estos son en parte los mecanismos que subyacen en este modelo animal de CMT1E, habría que determinar los niveles de AMPc en la fibra nerviosa wt y TrJ. Además debería probarse en los nervios ciáticos de ratones TrJ, la activación de PKA frente a un aumento en los niveles de AMPc, la presencia de RhoA y su inhibición dependiente de PKA, provocando una disminución de los niveles de F-actina en fibra nerviosa.

6 - Conclusiones

Los nervios ciáticos de ratones TrJ presentan mayores niveles de ARNm de β -actina y G-actina, así como una relación aumentada de F-actina/G-actina respecto del wt. Esto indicaría que en el genotipo TrJ, la reacción de polimerización de microfilamentos a partir de monómeros, se encuentra desplazada hacia la formación de F-actina.

A su vez, los nervios ciáticos de ratones TrJ presentaron, respecto del wt, niveles inferiores de OCT6, los cuales fueron modulados positivamente frente a la presencia de una fuente exógena de AMPc.

Por último, este aumento de AMPc ocasionó una disminución en los niveles de F-actina en los nervios ciáticos de ratones TrJ, sugiriendo que en este modelo animal de CMT1E, una disminución de AMPc podría ser, en parte, causa de las alteraciones que se observan en el citoesqueleto de actina de este genotipo.

7-Apéndice

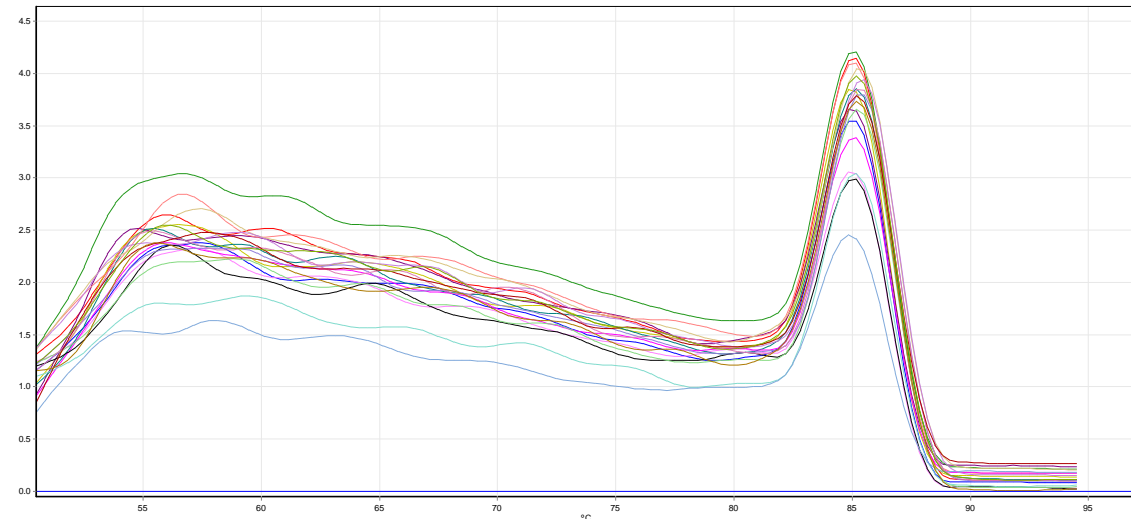


Figura 1. Curva de disociación del fragmento amplificado de ARNm de β -actina. Curva de Melting de cada una de las muestras incluidas en la curva estándar y de 3 muestras wt y 3 TrJ. Se observa para todas las muestras un pico centrado en los 85°C, indicando la amplificación de un único fragmento.

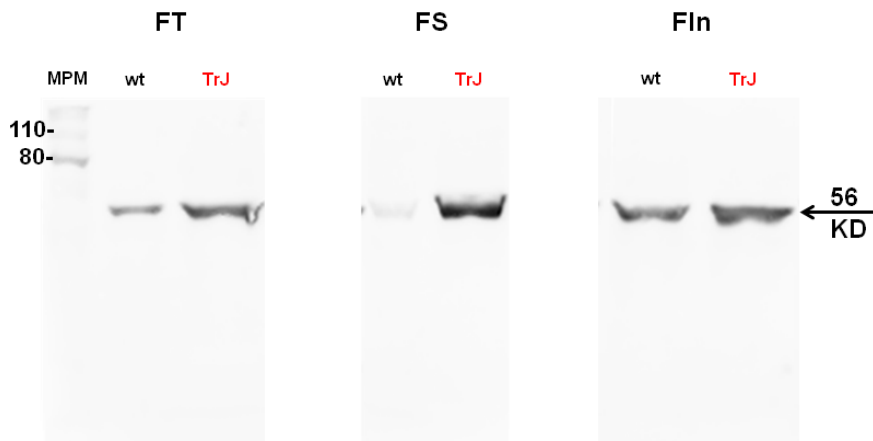


Figura 2. Evaluación de β tubulina como control de carga. Western Blot (WB) para β tubulina (anticuerpo anti ratón hecho en conejo- Abcam- dilución de trabajo 1:2000) revelado mediante fluorescencia utilizando un anti-anticuerpo anti-ratón hecho en cabra, conjugado al fluoróforo Alexa-488 (Invitrogen, dilución de trabajo: 1/1000) y visualizado mediante el sistema Fujifilm FLA-9000. El WB corresponde a la transferencia a membrana de PVDF de un SDS-PAGE en acrilamida al 12%, para las fracciones total (FT), soluble (FS) e insoluble (FIn) obtenidas para cada genotipo (wt y TrJ). Se sembraron 10 μ g de proteína total en cada carril de la FT, 4 μ g de proteína total en cada carril de FS y 2 μ g de proteína total en cada carril de FIn. MPM:marcador de peso molecular en kilo Daltons (KD). Los números a la izquierda del blotting indican el peso molecular. La flecha negra indica una banda de peso molecular aparente de 56 KD presente en el WB.

Tabla 1. Cambio en los niveles de ARNm de β -actina ($2^{-\Delta CT}$) en nervios ciáticos de ratones wt y TrJ, así como el p-valor intergenotipo.

	wt		TrJ		Estadístico $\alpha=0,01$
	Mediana (u.a.) ¹	Rango Intercuartílico (u.a.) ¹	Mediana (u.a.) ¹	Rango Intercuartílico (u.a.) ¹	Ucalculado (Utabulado:33) ²
ARNm β-actina	0,98	0,64 – 1,56	3,19	2,66 – 6,44	35

¹Unidades arbitrarias

²Si Ucalculado>Utabulado, hay diferencias significativas entre genotipos

Tabla 2. Niveles de β -actina en nervios ciáticos de ratones wt y TrJ determinados mediante ultracentrifugación, SDS-PAGE y WB. Se presentan los valores densitométricos del WB para cada genotipo en las fracciones obtenidas, así como el p-valor intergenotipo para una fracción dada.

Fracción	wt		TrJ		Estadístico $\alpha=0,01$
	Mediana (u.a.) ¹	Rango Intercuartílico (u.a.) ¹	Mediana (u.a.) ¹	Rango Intercuartílico (u.a.) ¹	Ucalculado (Utabulado:33) ²
Total (FT- actina total)	9019	8478-11457	48690	42314-51162	36
Soluble (FS- G-actina)	18158	16644-26795	38258	35041-48645	36
Insoluble (Fln – F-actina)	1834	942-3125	19034	17783-19154	36

¹Unidades arbitrarias

²Si Ucalculado>Utabulado, hay diferencias significativas entre genotipos

Tabla 3. Relación F-actina/G-actina en nervios ciáticos de ratones wt y TrJ. Se presenta el cociente de los valores densitométricos extraídos de los WB para β -actina de la FS y Fln (Fln/FS) en cada genotipo, así como el p-valor intergenotipo.

	wt		TrJ		Estadístico $\alpha=0,01$
	Mediana (u.a.) ¹	Rango Intercuartílico (u.a.) ¹	Mediana (u.a.) ¹	Rango Intercuartílico (u.a.) ¹	Ucalculado (Utabulado:33) ²
F-actina/G-actina	0,10	0,06 – 0,12	0,49	0,40 – 0,50	36

¹Unidades arbitrarias

²Si Ucalculado>Utabulado, hay diferencias significativas entre genotipos

Tabla 4. Medias de intensidad de señal de faloidina para los dominios gliales y axonales en nervios ciáticos de ratones wt y TrJ, así como sus valores de probabilidad entre dominios para un mismo genotipo y tratamiento.

Genotipo	wt			TrJ		
	Glia media \pm ES (%)	Axón media \pm ES (%)	p-valor (Interdominios)	Glia media \pm ES (%)	Axón media \pm ES (%)	p-valor (Interdominios)
C0	100,0 \pm 9,7	130,4 \pm 1,2	1,0	479,8 \pm 36,3	538,7 \pm 7,4	0,9
C1	262,5 \pm 3,2	267,8 \pm 7,4	1,0	422,7 \pm 23,1	471,5 \pm 6,1	0,9
CD	75,9 \pm 9,9	93,1 \pm 11,5	1,0	71,1 \pm 10,4	79,8 \pm 11,4	1,0

Tabla 5. Medias de intensidad de señal de faloidina para los dominios gliales y axonales en nervios ciáticos de ratones wt y TrJ, así como sus valores de probabilidad entre genotipos y tratamientos, para un dominio dado.

Dominio	Glia			Axon		
	wt media ± ES (%)	TrJ media ± ES (%)	p-valor (Intergenotipo)	wt media ± ES (%)	TrJ media ± ES (%)	p-valor (Intergenotipo)
C0	100,0 ± 9,7	479,8 ± 36,3	1x10 ⁻⁷	130,4 ± 1,2	538,7 ± 7,4	1x10 ⁻⁸
C1	262,5 ± 3,2	422,7 ± 23,1	-----	267,8 ± 7,4	471,5 ± 6,1	-----
CD	75,9 ± 9,9	71,1 ± 10,4	1,0	93,1 ± 11,5	79,8 ± 11,4	1,0
p-valor C0 vs C1	1x10 ⁻⁷	0,94	-----	0,002	0,95	-----
p-valor C1 vs CD	1x10 ⁻⁶	1x10 ⁻⁷	-----	0,002	1x10 ⁻⁸	-----

Tabla 6. Medias de intensidad de señal de OCT6 en fibras de nervio ciático de ratones wt y TrJ, para los dominios nucleares y perinucleares, así como sus valores de probabilidad entre dominios y genotipo.

Genotipo	wt media ± ES (%)	TrJ media ± ES (%)	p-valor (Intergenotipo)
Dominio Nuclear	100,0 ± 7,6	75,4 ± 7,7	0,0012
Dominio Perinuclear	62,5 ± 5,5	38,2 ± 6,9	0,0013
p-valor (Interdominios)	0,021	0,038	-----

Tabla 7. Medias de intensidad de señal de OCT6 en nervios ciáticos de ratones wt y TrJ para los dominios gliales y axonales, así como sus valores de probabilidad entre dominios y genotipo.

Genotipo	wt media ± ES (%)	TrJ media ± ES (%)	p-valor (Intergenotipo)
Dominio Glial	100,0 ± 13,9	23,3 ± 3,5	6,4 x 10 ⁻⁶
Dominio Axonal	108,0 ± 20,9	35,9 ± 7,3	0,003
p-valor (Interdominios)	0,75	0,13	-----

Tabla 8. Medias de intensidad de señal de OCT6 para los dominios nucleares y perinucleares de nervios ciáticos de ratones wt tratados en ausencia (C1) y presencia de db-AMPC (2 µM) durante 1 hora. Se presentan los valores de probabilidad entre dominios y tratamientos.

Genotipo	wt		
Tratamiento	C1 media ± ES (%)	DB media ± ES (%)	p-valor (Intertratamientos)
Dominio Nuclear	100,0 ± 9,0	182,5 ± 25,5	2,0 x 10 ⁻⁵
Dominio Perinuclear	68,7 ± 8,8	88,2 ± 14,2	0,13
p-valor (Interdominios)	0,042	0,002	-----

Tabla 9. Medias de intensidad de señal de OCT6 para los dominios nucleares y perinucleares de nervios ciáticos de ratones TrJ tratados en ausencia (C1) y presencia de db-AMPC (2 μ M) durante 1 hora. Se presentan los valores de probabilidad entre dominios y tratamientos.

Genotipo	TrJ		
	C1 media \pm ES (%)	DB media \pm ES (%)	p-valor (Intertratamientos)
Dominio Nuclear	100,0 \pm 8,1	131,2 \pm 8,2	0,003
Dominio Perinuclear	52,8 \pm 9,8	65,4 \pm 13,2	0,54
p-valor (Interdominios)	0,044	0,001	-----

Tabla 10. Medias de intensidad de señal de OCT6 para los dominios gliales y axonales de nervios ciáticos de ratones wt tratados en ausencia (C1) y presencia de db-AMPC (2 μ M) durante 1 hora. Se presentan los valores de probabilidad entre dominios y tratamientos.

Genotipo	wt		
	C1 media \pm ES (%)	DB media \pm ES (%)	p-valor (Intertratamientos)
Dominio Glial	100,0 \pm 5,3	107,5 \pm 13,0	0,56
Dominio Axonal	116,2 \pm 7,5	125,7 \pm 16,9	0,57
p-valor (Interdominios)	0,18	0,53	-----

Tabla 11. Medias de intensidad de señal de OCT6 para los dominios gliales y axonales de nervios ciáticos de ratones TrJ tratados en ausencia (C1) y presencia de db-AMPC (2 μ M) durante 1 hora. Se presentan los valores de probabilidad entre dominios y tratamientos.

Genotipo	TrJ		
	C1 media \pm ES (%)	DB media \pm ES (%)	p-valor (Intertratamientos)
Dominio Glial	100,0 \pm 20,1	113,4 \pm 13,6	0,58
Dominio Axonal	124,1 \pm 24,4	129,1 \pm 16,1	0,87
p-valor (Interdominios)	0,45	0,46	-----

Tabla 12. Medias de intensidad de señal de Faloidina para los dominios gliales y axonales de nervios ciáticos de ratones wt tratados en ausencia (C1) y presencia de db-AMPC (2 μ M) durante 1 hora. Se presentan los valores de probabilidad entre dominios y tratamientos.

Genotipo	wt		
	C1 media \pm ES (%)	DB media \pm ES (%)	p-valor (Intertratamientos)
Dominio Glial	100,0 \pm 5,2	125,6 \pm 12,3	0,18
Dominio Axonal	124,6 \pm 7,7	132,2 \pm 14,8	0,65
p-valor (Interdominios)	0,07	0,73	-----

Tabla 13. Medias de intensidad de señal de Faloidina para los dominios gliales y axonales de nervios ciáticos de ratones TrJ tratados en ausencia (C1) y presencia de db-AMPC (2 μ M) durante 1 hora. Se presentan los valores de probabilidad entre dominios y tratamientos.

Genotipo	TrJ		
	C1 media \pm ES (%)	DB media \pm ES (%)	p-valor (Intertratamientos)
Dominio Glial	100,0 \pm 12,1	60,5 \pm 5,2	0,004
Dominio Axonal	112,3 \pm 14,1	63,3 \pm 6,1	0,002
p-valor (Interdominios)	0,51	0,70	-----

8 – Referencias Bibliográficas

- Abe I., Ochiai N., Ichimura H., Tsujino A., Sun J., Hara Y.** (2004). Internodes can nearly double in length with gradual elongation of the adult rat sciatic nerve. *J Orthop Res.* 22(3):571-7.
- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.** (2008) *Molecular Biology of the Cell.* Chapter 16: The Cytoskeleton, pp: 965-1047. 5th Edición. Editorial Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K.** (2000) Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res.* 261:44–51.
- Aslam M., Hartel F., Arshad M., Gunduz D., Abdallah Y., Sauer H., Piper H. Noll T.** (2010). cAMP/PKA antagonizes thrombin-induced inactivation of endothelial myosin light chain phosphatase: role of CPI-17. *Cardiovasc Res* 87: 375–384
- Badii M., Guillen A., Araiza L., Cerna E., Valenzuela J., Landeros J.** (2012) Non Parametric Methods of Common Usage. *Inter.I Journ. Good Consc.* 7: 132-155.
- Banchs I., Casasnovas C., Albert, A., De Jorge L., Povedano M., Montero J., Martinez-Matos J., Volpini V.** (2009) Diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease. *Journ. Biomed. Biotech.* 10, 1-10.
- Baranek C., Sock E., Wegner M.** (2005) The POU protein Oct-6 is a nucleocytoplasmic shuttling protein. *Nucl. Ac. Res.* 19: 6277–6286
- Benninger Y., Thurnherr T., Pereira J., Krause S., Wu X., Chrostek-Grashoff A., Herzog D., Nave K., Franklin R., Meijer D., Brakebusch C., Suter U., Relvas J.** (2007) Essential and distinct roles for cdc42 and rac1 in the regulation of Schwann cell biology during peripheral nervous system development. *J Cell Biol.* 177:1051–1061.
- Bermingham J., Scherer S., O'Connell S., Arroyo E., Kalla C., Powell F., Rosenfeld M.** (1996) Tst-I/Oct-6/SCIP regulates a unique step in peripheral myelination and is requirea for normal respiration. *Gen. & Devel.* 10:1751-1762.
- Bershadsky A., Glück U., Denisenko OI, Sklyarova T., Spector I., Ben-Ze'ev.** (1995) The state of actin assembly regulates actin and vinculin expression by a feedback loop. *Jnal. Cell Sci.*108: 1183-1193.
- Bird TD.** (2013) Charcot-Marie-Tooth Hereditary Neuropathy Overview. 1998 [Updated 2013]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors.

GeneReviews™ Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK135>

Brancolini C., Marzinotto S., Edomi P., Agostoni E., Fiorentini C., Müller H., Schneider C. (1999) Rho-dependent regulation of cell spreading by the tetraspan membrane protein Gas3/PMP22. *Mol Biol Cell.* 10(7):2441-59.

Bresque M. (2014) Análisis microscópico de las diferencias entre las fibras nerviosas periféricas de ratones wt y Trembler J portadores de Charcot-Marie-Tooth tipo 1E en condiciones ad libitum y bajo un tratamiento de restricción calórica. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias- UdelaR.

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

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

Bustin S.A. & Nolan T. (2004) Analysis of mRNA expression by real-time PCR. Capítulo de Libro Titulado: Real-Time PCR; An Essential Guide. Ed. Horizon Bioscience, pp:125-184.-

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

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

Eldridge C., Bunge M., Bunge R., Wood P.(1987) Differentiation of axon-related Schwann cells *m vitro*. I. Ascorbic acid regulates basal lamina assembly and myelin formation. *J. Celt. Biol.* 105: 1023-1034.

Fagotti A., Di R., Simoncelli F., Chaponnier C., Gabbiani G., Pascolini R. (1998). Actin isoforms in amphioxus *Branchiostoma lanceolatum*. *Cell and Tissue Res.* 292: 173-176.

Falconer D. (1951) Two new mutants, "Trembler" and "Reeler", with neurological actions in the house mouse. *Journal of Genetics,* 50, 192-212.

Feltri M. & Wrabetz L. (2005) Laminins and their receptors in Schwann cells and hereditary neuropathies. *J. Peripher. Nerv. Syst.;*10:128–143.

Feltri M., Suter U., Relvas J. (2008) The function of RhoGTPases in axon ensheathment and myelination. *Glia* 56: 1508–1517.

Fernandez –Valle C., Gorman D., Gomez A., Bunge MB. (1997) Actin plays a role in both changes in cell shape and gene-expression associated with Schwann cell myelination. *The Journ.Neurosc.*; 17:241-250.

Fernando R., Cotter L., Perrin-Tricaud C., Berthelot J., Bartolami S., Perira J., Gonzalez S., Suter U., Tricaud N. (2016) Optimal myelin elongation relies on YAP activation by axonal growth and inhibition by Crb3/Hippo pathway. *Nature Comm.* 7:12186, DOI: 10.1038/ncomms12186.

Flores M., Vasconcellos A., Paredes M. (2015) Análisis de la expresión transcripcional del receptor de estrógeno en ovario de ovejas prepúberes de razas Texel y Criolla Araucana mediante RT-PCR cuantitativo en tiempo real. *Arch. Med. Vet.* 47: 155-160.

Garland P., Broom L., Quraishie S., Dalton P., Skipp P., Newman T., Perry H. (2012) Soluble Axoplasm Enriched from Injured CNS Axons Reveals the Early Modulation of the Actin Cytoskeleton. *PLoS ONE* 7(10): e47552.

Giambonini-Brugnoli G., Buchstaller J., Sommer L., Suter U., Mantei N. (2005) Distinct disease mechanisms in peripheral neuropathies due to altered peripheral myelin protein 22 gene dosage or a Pmp22 point mutation. *Neurobiol Dis.*18:656–668.

Goddette D., Frieden C. (1986) Actin Polymerization. The Mechanism of action of cytochalasin D. *Journal. Biol. Chem.*,. 261: 15974-15980.

Guo L., Moon C., Niehaus K., Zheng Y., Nancy Ratner. (2012) Rac1 controls Schwann cell myelination through cAMP and NF2/Merlin. *J Neurosci.* 32(48): 17251–17261

Hall A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 279:509–514

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

Henry E., Cowen J., Sidman R. (1983) Comparison of Trembler and Trembler-J mouse phenotypes: varying severity of peripheral hypomyelination. *J Neuropathol Exp Neurol.* 42(6):688-706.

Howe D. & McCarthy K. (2000) Retroviral inhibition of cAMP-dependent protein kinase inhibits myelination but not Schwann cell mitosis stimulated by interaction with neurons. *J Neurosci.* 20(10):3513–3521.

Itou, J., Suyama M., Imamura Y., Deguchi T., Fujimori K., Yuba S., Kawarabayasi Y. Kawasaki T. (2009). Functional and comparative genomics analysis of pmp22 in medaka fish. *BMC Neurosci.*10:60.

Ionasescu V., Searby C., Ionasescu R., Chatkupt S., Patel N., Koenigsberger R.(1997) Dejerine-Sottas neuropathy in mother and son with same point mutation of PMP22 gene. *Muscle and Nerve*, 20,97-99.

Ishikawa R. (2007) Actin, actin binding proteins and myosins in nervous system. *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology: Neural protein metabolism and function*, Ed. Springer, Vol.3, Capitulo 7:225 – 242.

Jagalur N., Ghazvini M., Mandemakers W., Driegen S., Maas A., Jones E., Jaegle M., Grosveld F., Svaren J., Meijer D. (2011) Functional dissection of the Oct6 Schwann cell enhancer reveals an essential role for dimeric Sox10 binding. *Journal of Neuroscience.* 31(23): 8585-94.

Jessen K. & Mirsky R. (2005) The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nature Rev. Neurosc.* 6: 671-682.

Jin F., Dong B., Georgiou J., Jiang Q., Zhang J., Bharioke A., Qiu F., Lommel S., Feltri M., Wrabetz L., Roder J., Eyer J., Chen X., Peterson A., Siminovitch K. (2011) N-WASp is required for Schwann cell cytoskeletal dynamics, normal myelin gene expression and peripheral nerve myelination. *Development* 138, 1329–1337

Lee M., Badache A., DeVries G. (1999) Phosphorylation of CREB in axon-induced Schwann cell proliferation. *J. Neurosci Res.*55(6):702–712.

Lee S., Amici S., Tavori H., Zeng W., Freeland S., Fazio S., Notterpek L. (2014) PMP22 Is Critical for Actin-Mediated Cellular Functions and for Establishing Lipid Rafts. *Journ. Neurosc.* 34(48):16140 –16152

Li J., Parker B., Martyn C., Natarajan C., Guo J. (2013) The PMP22 gene and its related diseases. *MolNeurobiol.* 47(2):673-98.

Limpert A. & Carter B. (2010) Axonal neuregulin 1 type III activates NF-kappaB in Schwann cells during myelin formation. *J Biol Chem.* 285(22):16614-22.

Liu Z., Jin Y., Chen L., Wang Y., Yang X., Cheng J., Wu W., Qi Z., Shen Z. (2015) Specific marker expression and cell state of Schwann Cells during culture in vitro. *PLoS ONE* 10(4): e0123278.

Kawasaki T., Oka N., Tachibana H., Akiguchi I., Shibasaki H. (2003) Oct6, a transcription factor controlling myelination, is a marker for active nerve regeneration in peripheral neuropathies. *Acta Neuropathol.* 105: 203–208.

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.

Kun A., Otero L., Sotelo-Silveira J.R., Sotelo J.R. (2007) Ribosomal distributions in axons of mammalian myelinated fibers. *J Neurosci Res.* 85(10):2087-2098.

Kun A., Canclini L., Rosso G., Bresque M., Romeo C., Hanusz A., Cal K., Calliari A., Sotelo Silveira J.R., Sotelo J.R. (2012) F-actin distribution at Nodes of Ranvier and Schmidt-Lanterman Incisures in mammal sciatic nerves. *Cytoskeleton (Hoboken).* 69(7):486-495.

Mathis S., Funalot B., Boyer O., Lacroix C., Marcorelles P., Magy L., Richard L., Antignac C., Vallat J. (2014) Neuropathologic Characterization of INF2-Related Charcot-Marie-Tooth Disease: Evidence for a Schwann. *J Neuropathol Exp Neurol.* 73(3): 223-233.

Cell Actinopathy Meier C., Parmantier E., Brennan A., Mirsky R., Jessen K. (1999) Developing Schwann cells acquire the ability to survive without axons by establishing an autocrine circuit involving IGF, NT-3, and PDGF-BB. *J Neurosci* 19:3847–3859.

Michailov G., Sereda M., Brinkmann B., Fischer T., Haug B., Birchmeier C., Role L., Lai C., Schwab M., Nave K. (2004) Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science,* 304: 700-703.

Mirsky R., Woodhoo A., Parkinson D., Arthur-Farraj P., Bhaskaran A., Jessen K. (2008) Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation. *Journal of the Peripheral Nervous System.* 13(2): 122–135.

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

Mogha A., Benesh A., Patra C., Engel F., Schöneberg T., Liebscher I., Monk, K. (2013). Gpr126 Functions in Schwann Cells to Control Differentiation

- and Myelination via G-Protein Activation. *Journ. Neuroscience*, 33(46): 17976–17985.
- Monk K., Naylor S., Glenn T., Mercurio S., Perlin J., Dominguez C., Moens C., Talbot W.** (2009) A G protein-coupled receptor is essential for Schwann cells to initiate myelination. *Science* 325 (5946): 1402-1405
- Monk K., Oshima K., Jörs S., Heller S., Talbot W.** (2011). Gpr126 is essential for peripheral nerve development and myelination in mammals. *Development*, 138(13): 2673–2680.
- Monuki E., Weinmaster G., Kuhn R., Lemke G.** (1989) SCIP: A glial POU domain gene regulated by cyclic AMP. *Neuron*, 3:783-793.
- Morgan L., Jessen K., Mirsky R.** (1991) The effects of cAMP on differentiation of cultured Schwann cells: progression from an early phenotype (04+) to a myelin phenotype (P0+, GFAP-, N-CAM-, NGF receptor-) depends on growth inhibition. *J Cell Biol* 112(3):457–467.
- Myers, J.; Mobley, C.; Sanders, C.** (2008) The peripheral neuropathy-linked Trembler and Trembler-J mutant forms of peripheral myelin protein 22 are folding-destabilized. *Biochemistry*. 47(40):10620-9.
- Nave K., Sereda M., Ehrenreich H.** (2007) Mechanisms of disease: inherited demyelinating neuropathies—from basic to clinical research. *Nature Reviews Neurology*. 3:453-464
- Nodari A., Zambroni D., Quattrini A., Court F., D’Urso A., Recchia A., Tybulewicz V., Wrabetz L., Feltri M.** (2007) Beta1 integrin activates Rac1 in Schwann cells to generate radial lamellae during axonal sorting and myelination. *J Cell Biol*. 177:1063–1075.
- Notterpek, L.; Ryan, M.; Tobler, A.; Shooter, E.** (1999). PMP22 accumulation in aggregates: implications for CMT1A pathology. *Neurobiol Dis*. (5):450-60.
- Notterpek L & Tolwani R.** (1999) Experimental models of peripheral neuropathies. *Lab Anim Sci*. 49(6):588-99.
- Nickols J., Valentine W., Kanwal S., Carter B.** (2003) Activation of the transcription factor NF-kappaB in Schwann cells is required for peripheral myelin formation. *Nat. Neurosci*.6(2):161–167.
- 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.; 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.* 17(20):7754-62.

Pereira A., Lebrun-Julien F., Suter U. (2012). Molecular mechanisms regulating myelination in the peripheral nervous system. *Trends in Neurosciences* , 35 (2): 123 – 134.

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

Pfaffl M.W. (2004) Quantification strategies in real-time PCR. In *A-Z of quantitative PCR*. Ed. S.A. Bustin, La Joya, CoA, International University Line, 87-112.

Ramakers G. & Moolenaar W. (1998) Regulation of Astrocyte Morphology by RhoA and Lysophosphatidic Acid. *Exp. Cell Res.*245, 252–262.

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

Rasband, W.S. (1997-2012). ImageJ. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>

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

Romeo C. (2016) Estudio de la expresión de pmp22 en un modelo animal del Síndrome Charcot-Marie-Tooth. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Udelar.

Rosso G., Cal K., Canclini L., Damián J.P., Ruiz P., Rodríguez H., Sotelo J.R., Vázquez C., Kun A. (2010) Early phenotypical diagnoses in Trembler-J mice model. *Journal of Neuroscience Methods.* 190:14-19.

Rosso G. (2011) Análisis topográfico, mecánico y molecular de fibras nerviosas periféricas de ratones Trembler J (modelo animal de la neuropatía humana CMT1A) por microscopía de fuerza atómica y confocal. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias – Udelar.

Roux K., Amici S., Fletcher B., Notterpek L. (2005) Modulation of epithelial morphology, monolayer permeability and cell migration by growth arrest specific 3/peripheral myelin protein 22. *Mol. Biol. Cell* 16:1142-1151

Russo M., Laura M., Polke J., Davis M., Blake J., Brandner S., Hughes R., Houlden H., Bennett D., Lunn M., Reilly M. (2011). Variable phenotypes are associated with PMP22 missense mutations. *Neuromuscul.Disord.* 21:106–114.

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

Sahenk Z. (1999) Abnormal Schwann cell-axon interactions in CMT neuropathies. The effects of mutant Schwann cells on the axonal cytoskeleton and regeneration-associated myelination. *Ann N Y Acad Sci.* 14;883:415-26.

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 L. (1997). Clustering sodium channels at the node of Ranvier:Close encounters of the axoglia kind. *Neuron* 18:843–846.

Salzer, J. (2003) Polarized domains of myelinated axons. *Neuron.* 40: 297–318.

Salzer J., Brophy P., Peles E. (2008) Molecular Domains of Myelinated Axons in the Peripheral Nervous System. *Glia* 56:1532–1540.

Sampath P., Pollard T. (1991) Effects of cytochalasin, phalloidin, and pH on the elongation of actin filaments. *Biochemistry* 30: 1973-1980.

Searles C., Ide L., Davis M., Cai H., Weber M. (2004) Actin Cytoskeleton Organization and Posttranscriptional Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase During Cell Growth. *Circulation Research*; 95:488-495.

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

Sereda M. & Nave K. (2006) Animal models of Charcot-Marie-Tooth disease Type 1A. *Neuromol. Med.* 8:205-216.

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

Shy M., Blake J., Krajewski K., Fuerst D., Laura M., Hahn A., Li J., Lewis R., Reilly M. (2005) Reliability and validity of the CMT neuropathy score as a measure of disability *Neurology.* 64(7):1209-1214.

Sidman R., Cowen J., Eicher E. (1979) Inherited muscle and nerve diseases in mice: A tabulation with commentary. *Ann NY Ac. Sci.*317: 497-505.

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

Siskind C., Panchal S., Smith C., Feely S., Dalton J., Schindler A., Krajewski K. (2013) A Review of Genetic Counseling for Charcot Marie Tooth Disease (CMT). *J Genet Counsel* 22:422–436.

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

Sobue G., Shuman S., Pleasure D. (1986) Schwann cell responses to cyclic AMP: proliferation, change in shape, and appearance of surface galactocerebroside. *Brain Res* 362(1):23–32.

Sohail M., Hashmi A., Hakim W., Watanabe A., Zipprich A., Groszmann R., Dranoff J., Torok N., Mehal W. (2009). Adenosine Induces Loss of Actin Stress Fibers and Inhibits Contraction in Hepatic Stellate Cells via Rho Inhibition. *Hepatology*. 49(1): 185–194.

Sparrow N., Manetti M., Bott M., Fabianac T., Petrilli A., Bates M., Bunge M., Lambert S., Fernandez-Valle C. (2012) The actin-severing protein cofilin is downstream of neuregulin signaling and is essential for Schwann cell myelination. *Jour. Neurosc.*; 32:5284-5297.

Susuki K., Raphael A., Ogawa Y., Stankewich M., Peles E., Talbot W., Rasband M. (2011) Schwann cell spectrins modulate peripheral nerve myelination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 8009–8014

Suter U., Welcher A., Ozcelik T., Jackson G., Kosaras B., Francke U., Billings-Galiardi S., Sidman R., Shooter E. (1992 a) Trembler mouse carries a point mutation in myelin gene. *Nature* 356:241-243.

Suter U., Moskow J., Welcher A., Jackson G., Kosaras B., Sidman R., Buchber A., Shooter E. (1992 b) A leucine-to-proline mutation in the putative first transmembrane domain of the 22-kDa peripheral myelin protein in the trembler-J mouse. *Neurobiology* 89:4382-4386.

Svaren J. & Meijer D. (2008) The molecular machinery of myelin gene transcription in Schwann cells. *Glia* 56(14): 1541–1551.

Taveggia C., Zanazzi G., Petrylak A., Yano H., Rosenbluth J., Einheber S., Xu R., Loeb J., Shrager P. (2005) Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron*, 47: 681-694.

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.

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

Valentijn L., Baas F., Wolterman R., Hoogendijk J., van den Bosch N., Zorn I., Gabreels-Festen A., de Visser M., Bolhuis P. (1992) Identical point mutations of PMP-22 in Trembler-J mouse and Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat. Gen.*:289-291.

Verheijen M., Lammens M., Ceuterick-de Groote C., Timmerman V., De Jonghe P., King R., Smit A., van Minnen J. (2011) Increased axonal ribosome numbers in CMT diseases. *J. Peripher. Nerv. Syst*, 16:71-73

Yao X., Chaponnier C., Gabbiani G., Forte J. (1995) Polarized distribution of actin isoforms in gastric parietal cells. *Mol. Biol. Cell*, 6:541-557.

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*. 62(2):78-87.

Yoon C., Korade Z., Carter B. (2008) Protein Kinase A-Induced Phosphorylation of the p65 Subunit of Nuclear Factor- κ B Promotes Schwann Cell Differentiation into a Myelinating Phenotype. *J Neurosci*. 28(14):3738–3746.

Yun J., Heisler L., Hwang I., Wilkins O., Lau S., Hycza M., Der S. (2006). Genomic DNA functions as a universal external standard in quantitative real-time PCR. *Nucleic Acids Research*. 34,:e85. doi:10.1093/nar/gkl400.

Zhong H., Voll R., Ghosh S. (Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol. Cell*. 1(5):661–671.

Zoltewicz S., Lee S., Chittoor V., Freeland S., Rangaraju S., Zacharias D., Notterpek L. (2012) The palmitoylation state of PMP22 modulates epithelial cell morphology and migration. *ASN Neuro* 4:409-421.

Zorick T., Syroid D., Arroyo E., Scherer S., Lemke G. (1996) The transcription factors SCIP and Krox-20 mark distinct stages and cell fates in Schwann cell differentiation. *Mol.Cell Neuroscience*, 8 (2-3):129-145.