

Tesina de Fin de Carrera de la Licenciatura en Bioquímica

**Estudio del componente vascular encefálico en
ratones TrJ, modelo murino de la neuropatía
periférica humana Charcot Marie Tooth de tipo 1-E**

Mariana Martínez

Tutora: Alejandra Kun, Co-tutor: Javier Brum

Departamento de Proteínas y Ácidos Nucleicos – IIBCE
Instituto de Acústica y Ultrasonido – Facultad de Ciencias

Julio 2020

Contenidos	Nº de página
I.- Resumen	3
II.- Introducción	5
IV.- Hipótesis	13
V.- Objetivos	13
VI.- Materiales y métodos	14
VII.- Resultados	21
VIII.- Discusión	32
a) Las diferencias vasculares en el fenotipo TrJ	32
b) Análisis correlativo de imágenes DUF y MCC	36
c) Niveles de organización vascular del encéfalo murino	37
d) El SNC en el modelo Trembler-J: la lipofuscina como posible indicador de neurodegeneración	38
IX.- Conclusiones generales	40
X.- Perspectivas	41
XI.- Bibliografía	42

Resumen:

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT), es la más frecuente neuropatía periférica hereditaria humana (incidencia 1/3300). Sus principales mutaciones afectan las células de Schwann (CS) (CMT-1) o la neurona (CMT-2). Las alteraciones en *pmp22*, gen que codifica la proteína de la mielina compacta PMP22, representan el 50% de todas las CMTs. La mielinopatía CMT1E, es causada por una mutación puntual en *pmp22*. La afección puede modelizarse adecuadamente en los ratones Trembler J (TrJ), portadores de la misma mutación puntual en el gen *pmp22*, que una familia humana.

El transcripto de *pmp22* fue descrito en neuronas motoras del sistema nervioso central embrionario y adulto. Estudios de nuestro grupo, también permitieron visualizarlo en neuronas piramidales del hipocampo y células del cestillo en el cerebelo de ratones TrJ.

Una característica en común en enfermedades neurodegenerativas es el daño del sistema vascular. En la Enfermedad de Alzheimer, se observa frecuentemente desregulación neurovascular asociada al desarrollo de la enfermedad, afectando también la perfusión y conectividad del cerebro.

En el presente trabajo hemos investigado probables alteraciones a nivel cerebral, en ratones TrJ comparándolos con los WT. Se hallaron alteraciones en la red vascular, visualizadas mediante la técnica Doppler Ultra Rápido (DUF), in vivo, mediante la cual se determinó la existencia de alteraciones tanto en el volumen sanguíneo como en el área ocupada por la sangre, en los ratones TrJ. También se observaron agregados lipoproteicos autofluorescentes, como lipofuscina, en mayor cantidad y de mayor tamaño en los heterocigotos, al compararlos con los WT. Esto sugiere que la mutación estudiada genera una afección sistémica, involucrando varios aspectos del sistema nervioso central.

Un análisis correlativo DUF con microscopía Confocal (MCC), permitió asociar a grandes estructuras de flujo sanguíneo una organización funcional de pequeños vasos identificados por MCC. Tal suborganización vascular, no ha sido descrita anteriormente en la bibliografía revisada. Parte de estos resultados ya fueron comunicados en el congreso International Congress Ultrasonic setiembre 2019 (Brum et al , 2019).

Introducción:

El Sistema Nervioso (SN) es el encargado de mediar la relación de los individuos con el ambiente. Dada su importancia en todo el reino animal, es de sumo interés su estudio, para comprender su estructura y fisiología en condiciones de salud y enfermedad. De acuerdo a sus diferentes funciones y orígenes en el desarrollo embrionario, el SN de mamíferos se puede dividir en Sistema Nervioso Periférico (SNP) y Sistema Nervioso Central (SNC). El SNP está formado por ganglios y nervios espinales que se extienden fuera del sistema nervioso central, las células involucradas son neuronas motoras y sensoriales, y células gliales, en este caso células de Schwann mielínicas y amielínicas, células de Schwann de la triple sinapsis, células de Schwann del ganglio de la raíz dorsal, que acompañan los cuerpos neuronales, y fibroblastos. La función del SNP es captar las señales del ambiente, enviarlas al SNC y efectuar la respuesta correspondiente. El SNC está formado por el encéfalo y la médula espinal, las células involucradas son neuronas de distintos tipos, y células gliales, como oligodendrocitos, astrocitos y microglía. La función del SNC es procesar la información del ambiente, y organizar la respuesta. (Farley A et al 2012), (Farley A et al 2013)

Las neuronas transmiten la información de forma rápida y eficiente, distintas características de estas células se adaptaron para cumplir esta función, por ejemplo, los axones de algunas neuronas, están rodeados por una vaina de mielina, formada por células de Schwann en el SNP, y oligodendrocitos en el SNC. Los daños en estas células, pueden resultar fatales para la conducción del impulso nervioso, y el funcionamiento del sistema nervioso. (Ceballos, 1999) (Rangaraju, 2009) (Goldstein, 2006).

Una de las situaciones en las que se ve dañada esta función, es en la enfermedad de Charcot Marie Tooth (CMT), ésta es la más frecuente neuropatía periférica hereditaria humana (incidencia de 1/2500 a 1/3300) (Gorazd B. Stokin 2006) (Berciano 2003). Debido al avance en el conocimiento genético de estas afecciones ha surgido una amplia clasificación (Inherited Peripheral Neuropathies Mutation Database). Sin embargo, generalmente se clasifica en dos tipos diferentes: CMT-I consideradas genéricamente como schwannopatías y las CMT-II que agrupa a las axonopatías. Presentan mutaciones en proteínas de la célula de Schwann (principalmente en proteínas de la mielina, mielinopatías, CMT I) o del axón (axonopatías CMT II).

Las alteraciones en pmp22, gen que codifica la proteína de la mielina compacta PMP22, representan el 50% de todas las CMT (figura 1) (Fortun 2005). Estas afecciones tienen un patrón

fenotípico de debilidad y pérdida muscular. CMT1E (5% de todas las CMT1), es causada por diferentes mutaciones puntuales en pmp22. Puede modelizarse adecuadamente en los ratones TrJ, portadores de la misma mutación espontánea puntual en el gen pmp22, que una familia humana (Valentijn 1992). Las principales manifestaciones son parálisis espástica y temblor generalizado. La mutación afecta el plegamiento de la proteína, impidiendo su inserción en la membrana, acumulándose perinuclearmente, con ganancia de función tóxica (Quarles R, 2006). Algunas de las características observadas en esta afección son dismielinización, desmielinización, degeneración axonal, proliferación de CS y lámina basal redundante, siendo muy similar a lo que se reporta en humanos nacidos con las mismas mutaciones. (Suter, 2003) (Kun, 2012) (Thomas D Bird,1998) (Eichinger 2018) (Maxime Jouaud. 2019) (Rossor, 2013) (Morena, 2019) (Pareyson, 2017) .

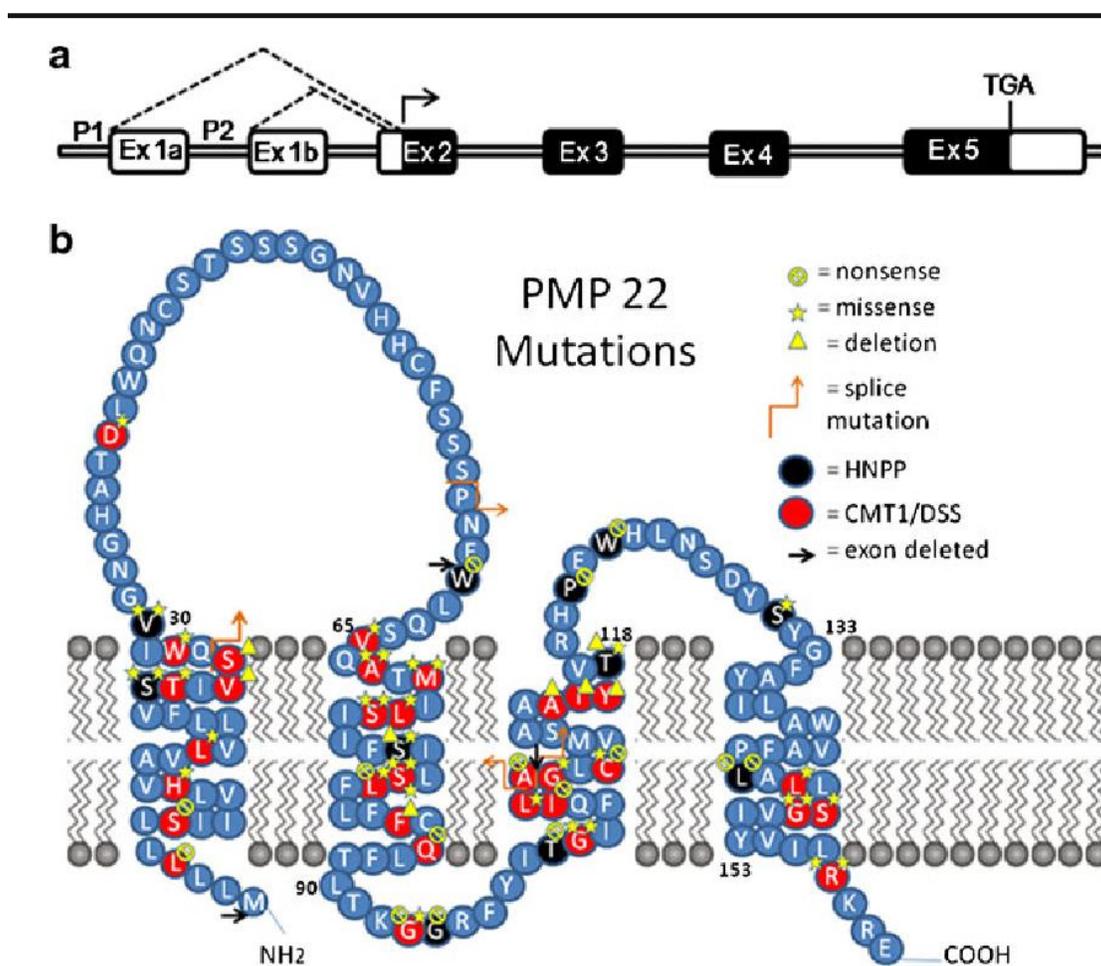


Figura 1-Estructura del gen PMP22 y predicción de la estructura de la proteína. A) Una representación esquemática del gen PMP22 consiste de seis exones. El exón 1a contiene transcritos predominantemente expresados en las células de Schwann mielinizantes. El exón 1b

contiene transcritos expresados en células no neuronales. B) Representación esquemática de la topología de la proteína humana PMP22, muestra dominios extracelulares, intracelulares y transmembrana. Se muestran varias de las mutaciones que generan CMT1A y E. Tomada de Nave et al., 2007.

A pesar de ser una enfermedad típicamente periférica, existen indicios de daños a nivel del sistema nervioso central, debidos a esta patología. El transcripto de pmp22, fue descrito en neuronas motoras del sistema nervioso central embrionario y adulto, y también en la mielina central (Parmentier, 1997) (Ohsawa, 2006) (De Gasperi, 2010). Estudios de nuestro grupo, también permitieron visualizarlo en hipocampo y cerebelo de ratones TrJ (Tesis de Grado Carlos Pizzarossa).

Siguiendo con el estudio del SNC en esta patología, en nuestro grupo de investigación, se han encontrado características diferenciales en los vasos sanguíneos de los ratones de ambos genotipos. Se observaron menor número de capilares y, en general, vasos de menor calibre en los ratones TrJ (Tesis Lic. Bioquímica Mónica Bubé, en redacción). Estos hallazgos nos guiaron a estudiar las posibles afecciones del sistema vascular en este modelo, impulsados por la importancia del funcionamiento saludable del sistema vascular en un órgano tan dependiente del oxígeno sanguíneo como lo es el cerebro. Las neuronas requieren cantidades muy altas de ATP para funcionar y no tienen reservas de glucógeno, por lo que obtienen su energía a partir del metabolismo de la glucosa, esto las hace muy dependientes del oxígeno y la glucosa proporcionada por el sistema sanguíneo, por lo tanto cualquier alteración en el sistema sanguíneo puede generar consecuencias drásticas en este tejido. (E. Bennetta 2017) (Völgyi, 2017) (Obenaus, 2016) (Wei Cai, 2017)

Alteraciones en la red sanguínea del cerebro están presentes en la Enfermedad de Alzheimer, el tipo más común de demencia en humanos, con una prevalencia entre 5% y 10% (Paula Grammas, 2011). El envejecimiento se encuentra entre los principales factores de riesgo, (Alzheimer's Society 2013). Es una enfermedad progresiva cuyas principales consecuencias son pérdida de tejido cortical, declinación progresiva del funcionamiento mental, deterioro de memoria, cognición, función motora y comportamiento social. Se observa frecuentemente desregulación neurovascular asociada al desarrollo de la enfermedad, afectando también la perfusión y conectividad del cerebro. A nivel celular, se ven comprometidas, las rutas intracelulares del oxígeno incluyendo el metabolismo glucídico, fosforilación oxidativa y homeostasis mitocondrial y celular, de neuronas y glía. (Holtzman, 2011) (Villemagne 2013) (Iadecola, 2016) (Seth Love · J. Scott Miners, 2015)

Estas consideraciones nos llevan a prestarle especial atención a la red vascular del cerebro, y a estudiar los daños que eventualmente pudieran sufrir en el modelo TrJ. El cerebro recibe irrigación sanguínea desde la región basal por dos arterias carótidas internas y dos arterias vertebrales, que forman el círculo de Willis dentro del cerebro, asegurando la llegada del oxígeno a todas las zonas del encéfalo (figura 2). En la región posterior, las arterias vertebrales se originan de las arterias subclavias. Las arterias cerebrales anteriores están unidas con la arteria anterior comunicante, y se conectan con las posteriores mediante el círculo de Willis. A partir de este círculo, las arterias irrigan todo el encéfalo. Las venas internas yugulares, drenan en las venas subclavianas, que retornan la sangre del cerebro. Una red similar se puede encontrar en el cerebro murino. (Hur JC 2016) (Neuroscience. 2nd edition. Purves 2001.) (Fantin. 2015)

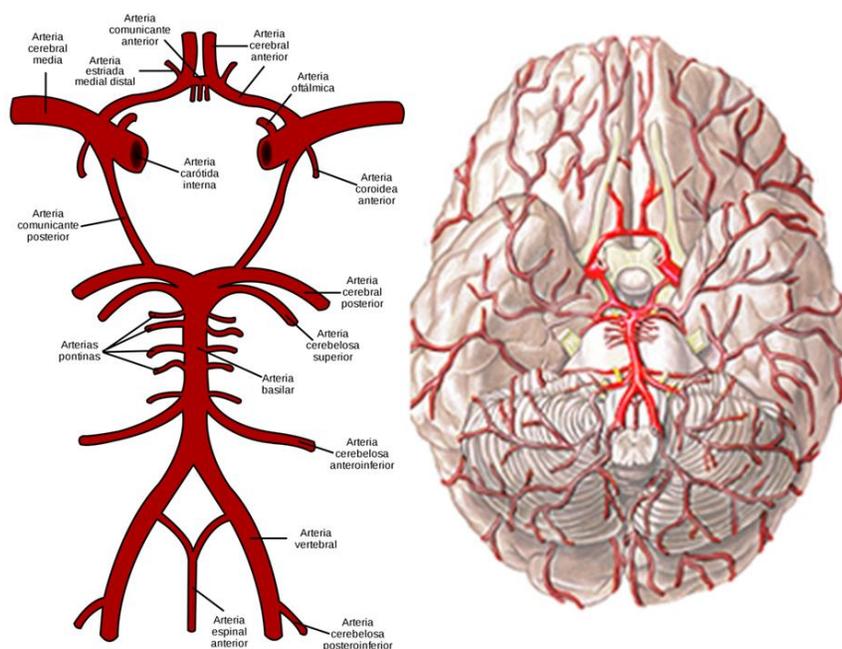


Figura 2- Se muestra la disposición de las arterias que forman el círculo de Willis.

La interacción funcional entre los vasos sanguíneos y los tejidos cerebrales ocurre en los capilares, donde se genera la unidad neurovascular, especialmente afectada en la neurodegeneración.

La barrera hematoencefálica se encarga de permitir el pasaje selectivo de sustancias entre los vasos sanguíneos y el tejido cerebral, protegiendo al cerebro de sustancias dañinas. Esta barrera está formada por la unión de los procesos terminales de los astrocitos con los vasos sanguíneos (Li, 2019) (Hamanaka 2018)

Los cambios hemodinámicos en el cerebro pueden utilizarse como una forma de detectar cambios en la activación neuronal y cerebral. Dada la importancia del sistema sanguíneo del

cerebro en condiciones de salud y enfermedad, es importante contar con metodologías que permitan evidenciarlos, sobre todo en animales vivos, ya que se puede obtener información sobre su funcionamiento, en distintas condiciones.

Una metodología muy utilizada para evidenciar vasos sanguíneos es la imagenología Doppler. Esta técnica es ampliamente utilizada en medicina y biología, ya que permite la observación del flujo en grandes vasos sanguíneos de distintos tejidos. El principio de la imagenología Doppler consiste en enviar pulsos ultrasónicos dentro del tejido. Dichos pulsos serán retrodispersados por los glóbulos rojos, los cuales se encuentran en movimiento debido al flujo sanguíneo. Es así que la frecuencia de los pulsos retrodispersados será diferente a la del pulso emitido debido al efecto Doppler: el glóbulo rojo actúa como una fuente de ultrasonido en movimiento. Midiendo el cambio en frecuencia entre los pulsos emitidos y recibidos se estima la velocidad del flujo sanguíneo. Para generar una imagen Doppler se utiliza una sonda ultrasónica la cual está formada por varios emisores de ultrasonido llamados elementos. Utilizando sólo algunos elementos de los que posee la sonda, se emiten ondas focalizadas. Para cada onda focalizada transmitida, se graban los ecos retrodispersados y se forma una línea de la imagen Doppler (figura 3a). La imagen completa se forma repitiendo el proceso línea a línea, para lo cual se necesita tantas emisiones ultrasónicas como líneas de la imagen, lo que resulta en una cadencia de imagen de aproximadamente 3 a 5 Hz. Sin embargo, más allá de su utilidad clínica, el Doppler convencional posee una baja sensibilidad al momento de visualizar vasos sanguíneos cerebrales debida a la baja velocidad de flujo involucrada (del orden de los 25 mm/s comparado con una velocidad de 50 cm/s para grandes vasos).

Para aumentar dicha sensibilidad surge una metodología novedosa que permite estudiar el flujo sanguíneo: el Doppler ultra-rápido (o Doppler Ultra fast: DUF) (Heinzer, 2008) (Bercoff, 2011). Esta nueva técnica tiene mayor sensibilidad que el Doppler convencional, debido a la secuencia ultrasónica utilizada para la formación de la imagen Doppler. En lugar de utilizar ondas focalizadas, esta herramienta utiliza la composición de múltiples ondas planas a diferentes ángulos, sobre el órgano a estudiar (figura 3b). Los ecos obtenidos para cada ángulo son combinados generando una única imagen Doppler de mayor sensibilidad que una única imagen convencional (figura 3). Este proceso se puede repetir a una cadencia de 500 Hz. La aproximación estructural-funcional que ofrece el DUF, es una poderosa herramienta en el horizonte de estos desafíos, permitiendo la exploración vascular in vivo en humanos y en animales. La mejora de la relación señal/ruido, permite la visualización de vasos sanguíneos de menor calibre, que de otra forma no sería posible. (Osmanski, 2014) (Demené, 2015) (C Errico, 2016) (C Errico, 2015) (Demene, 2017) (Tiran, 2017) (Xiong, 2017) (Bergel, 2018) (E Mace, 2013).

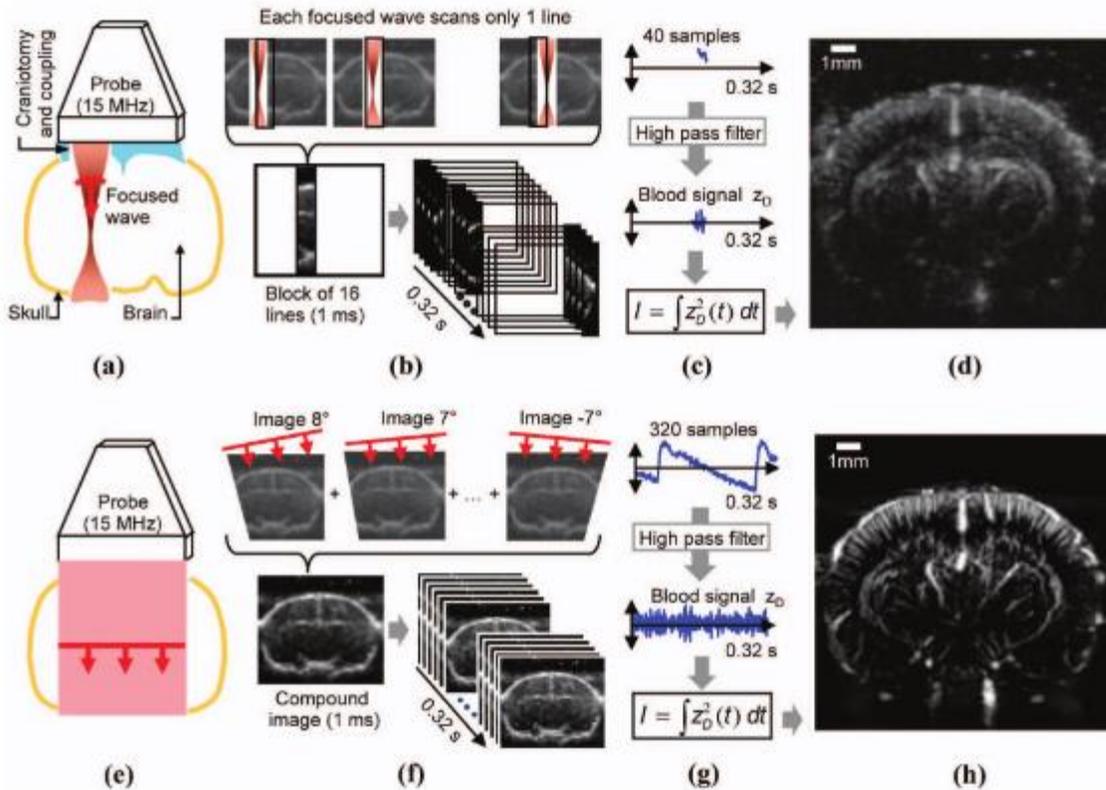


Figura 3- Descripción de la secuencias usualmente utilizadas para (a) Doppler convencional y (b) Doppler super rápido. (Tomada de Mace et al. 2013).

Para la obtención de imágenes DUF del cerebro, es necesario conocer cuáles son las capas de tejido, que podrían dificultar su visualización. El SNC tiene varias capas de protección, como la piel, pelo, tejido subcutáneo, tejido adiposo, hueso, meninges y el fluido cerebroespinal. El cráneo está protegido por ocho huesos: frontal, parietal, temporal, occipital, esfenoidal y etmoidal, la fusión de las uniones entre los huesos forma una caja con mucha rigidez, los huesos están unidos por suturas, que son uniones fibrosas inmóviles. Estas suturas le añaden fuerza al cráneo y reducen posibles fracturas. En el nacimiento estas suturas no están fusionadas. En los ratones, estas suturas terminan de fusionarse aproximadamente a los 40 días de nacimiento (Bradley JP, 1996) (Opperman LA. 2000).

La siguiente capa de protección la integran las meninges, que rodean el cerebro y la médula espinal; está formada por tres capas: la duramadre (externa), la madre aracnoidea (media) y la piamadre (capa interna). La duramadre es una capa densa de tejido fibroso, tiene una región central de vasos sanguíneos conocida como seno sagital, que es un reservorio venoso que colecta sangre del cerebro y la retorna al corazón por la vena yugular interna. Hay otros senos pequeños

dentro de los pliegues duros que actúan como reservorio venoso. Debajo de la duramadre hay un espacio anatómico (espacio subdural) lleno con fluido seroso.

La madre aracnoide es una capa de tejido conectivo, debajo del mismo se encuentra el espacio subaracnoide. Se une con la duramadre en la columna vertebral. El espacio subaracnoide tiene fluido seroso. La piamadre es la capa más interna de tejido conectivo, delicada y fina, con numerosos vasos sanguíneos, está adherido a la superficie del cerebro y la médula espinal. Los capilares que dejan los vasos sanguíneos de la pia madre penetran en el tejido neural del cerebro. (Krishnakali Dasgupta, 2019) (Adeeb N, 2012) (Woldenberg Greenberg, 1994).

Algunos autores han señalado la presencia de PMP22, en niveles apreciables en muy diversas áreas del SNC de ratas, ratones y humanos (Parmantier E, 1995) (Ohsawa Y, 2006) (Xie CH, 2016) (Norreel JC, 2001). Nuestro grupo decidió explorar la expresión central de pmp22 en ratones TrJ. Así, forma parte de un trabajo en redacción resultados en los que se describe la presencia del transcripto del gen pmp22 y de su proteína (PMP22) en neuronas piramidales, de las capas polimorfa y molecular del Cuerno de Amón, en el Hipocampo de ratones TrJ (Tesis Licenciatura en Bioquímica, Facultad de Ciencias, Pizzarossa, 2013; Pizzarossa et al, 2020 en redacción). Dos tests de ansiedad (campo abierto y cruz elevada) complementan el análisis molecular. Hemos encontrado diferencias significativas entre TrJ y WT tanto en la expresión del transcrito como de su proteína, a nivel citoplasmático y nuclear, así como en los estudios cognitivos que indican cambios de comportamiento con un claro compromiso a nivel del hipocampo. La neurodegeneración modelizada en TrJ, muestra la presencia de agregados proteicos, indicadores de deficientes procesos intracelulares de eliminación de agregados, que hemos señalado a nivel de la célula de Schwann (Tesis Maestría de Mariana Bresque, 2014). Sin embargo, no ha sido explorada la presencia de agregados a nivel del SNC, como indicador del proceso de neurodegeneración CMT1E, modelizado por Trembler-J. El compromiso funcional del hipocampo involucra procesos relevante en la vida del individuo como son la adquisición de memoria y el aprendizaje. La afectación de estas áreas durante el desarrollo neurodegenerativo, es un evento frecuente en las principales neuropatías del SNC.

Dentro de los principales agregados observados a nivel del SNC destaca la presencia de lipofuscina. La lipofuscina (LF) es un pigmento autofluorescente, más evidente en células postmitóticas (A Terman, 1998) (Jeannette König, 2017). Se agrega como un conjunto de lípidos, metales, moléculas orgánicas y biomoléculas. Este pigmento se acumula progresivamente en lisosomas secundarios, generando un patrón de senescencia, asociado con la edad. Es conocida

y utilizada ampliamente como un marcador etario (Crouch RK, 2015) (Annika Höhn, 2013) (M Tsuchida, 1987) (Ioanna Korovila, 2017) (Feng FK, 2015).

Los agregados de LF podrían estar asociados a la neurodegeneración, ya que se ha observado su relación con el decrecimiento neuronal, y proliferación glial a nivel del SNC, tanto con cambios morfológicos como bioquímicos en las células nerviosas (E A Georgakopoulou, 2013) (G Di Guardo, 2015) (A V Chaplygina, 2018). La LF representa un marcador de vulnerabilidad cerebral, estrés, envejecimiento y patología asociada. También se relaciona con otras alteraciones metabólicas, tales como estrés oxidativo, alteraciones en la proteostasis y disfunción lisosomal y mitocondrial. El análisis del contenido de lipofuscina en afecciones neurodegenerativas es escasamente señalado en la literatura, así como su eventual rol en la patogenia o su aparición como consecuencia de la afección del sistema nervioso (Moreno-García A, Kun 2018) (Kun, 2018) (Gray DA, Woulfe J. 2005) (Terman A, Brunk UT. 2004), por lo que su elucidación cobra especial interés.

Hipótesis:

El fenotipo neurodegenerativo CMT1E modelizado en los ratones Trembler-J se manifiesta también a nivel del SNC en un compromiso del componente vascular del encéfalo y en la presencia de agregados lipoproteicos a nivel del hipocampo.

Objetivo general:

Evaluar la manifestación central del fenotipo neurodegenerativo TrJ, explorando el compromiso vascular mediante DUF y caracterizar la presencia de lipofuscina en el hipocampo de ratones de genotipo TrJ y WT.

Objetivos específicos:

- 1) Obtención de imágenes coronales DUF, en la región cerebral comprendida entre Bregma y Lambda, en ratones de genotipo WT y TrJ.
- 2) Reconocimiento de la red vascular de los mismos cerebros analizados en (1), (con lectina IB4), obteniendo imágenes en mosaico en microscopio confocal.
- 3) Procesamiento de imágenes: cuantificación, reconstrucción 3D, proyección en z correlación con imágenes doppler.
- 4) Realizar un análisis comparativo cuantitativo de imágenes DUF de cerebros de ratones WT y TrJ.
- 5) Realizar un análisis comparativo cuantitativo de agregados de lipofuscina, con imágenes de microscopía confocal de la región hipocampal.

Materiales y métodos:

Para estudiar la red vascular cerebral utilizamos dos abordajes integrados y correlativos: Doppler superrápido y microscopía confocal.

La combinación de estas dos técnicas permite un mayor entendimiento del sistema vascular, siendo posible acceder a la red in vivo mediante imágenes DUF, y obteniendo imágenes de mucha mayor resolución mediante microscopía confocal.

Ejemplares utilizados:

En este trabajo se utilizaron ratones de 3, 6 y 18 meses de fenotipo WT y TrJ (pertenecientes a los mismos grupos etarios). Los ratones TrJ son heterocigotos para la mutación puntual L16P en la proteína PMP22, en el gen (T1703C). Estos ratones pertenecen a la cepa B6D2-Pmp22<TrJ>/J adquirida en Jackson Laboratory, USA en 2008 (CSIC I+D 2007, responsable Alejandra Kun).

El genotipo de los ratones fue identificado de acuerdo a los criterios establecidos en Rosso et al., 2010. La colonia se encuentra en el bioterio del IIBCE, su mantenimiento, los procedimientos quirúrgicos y la eutanasia de los ratones fue realizada por la Dra Kun, de acuerdo con las normas del Comité de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, bajo las regulaciones establecidas en la ley nacional de experimentación animal N° 18611.

1.- Obtención de imágenes coronales DUF, en la región comprendida entre Bregma y Lambda, en cerebro de ratones WT y TrJ:

Para obtener las imágenes los ratones deben estar anestesiados durante un intervalo de tiempo de forma que se mantengan inmóviles durante todo el experimento (aproximadamente dos horas), para esto se adecuó la administración de anestesia. Se realizó una dilución de la dosis correcta de anestesia (Mudarra, 2011), solución con 120 mg/kg ketamina+16 mg/kg xilacina, y se llevó a un volumen final de 300ul, esto fue inyectado intraperitonealmente de a poco mientras se observaba el comportamiento del animal, hasta conseguir el estado de anestesia. De ser necesario se proporciona el resto del volumen.

Cuando el ratón está completamente dormido, se realiza craneotomía generando una “ventana” de 5 mm x 6 mm, centrada en la cisura sagital, que expone el cerebro entre Bregma y Lambda. La piamadre se conserva intacta para mantener la estructura del cerebro. Se cubre la región con gel para ultrasonido para el acoplado, de ésta forma se busca disminuir los ecos. Se posiciona la

sonda sobre la ventana, perpendicular a la base de la cabeza, de forma que se obtengan imágenes DUF coronales del cerebro. Se utiliza una sonda de 2,5 cm, de 15MHz de 128 elementos conectada a un ecógrafo ultrarrápido programable (Verasonics Vantage System). Para obtener una imagen DUF se promedian 200 imágenes compuestas las cuales son adquiridas durante 200 ms. La imagen final se forma realizando un promedio de 20 imágenes DUF. Se realiza el registro DUF en sentido rostro caudal (desde Bregma hacia Lambda), cada 250um.

2.-Reconocimiento de la red vascular de los mismos cerebros analizados en (1), (con lectina IB4), imágenes en mosaico en microscopio confocal.

Terminado el registro DUF, se sacrifica el animal mediante sobredosis de anestesia y se extrae y fija el cerebro por difusión en solución fijadora (4% Paraformaldehído, en buffer PHEM: 60mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, pH 7,2; a 4°C). Se realizan cortes coronales seriados de 60 micras, con vibrátomo (Leica VT 1000S), para esto se incluye al cerebro en una mezcla de 12% seroalbúmina bovina, 1,5% gelatina que se solidifica con el agregado de glutaraldehído al 1% (concentración final).

Para visualizar los vasos sanguíneos se utiliza isolectina IB4, que está conjugada a una sonda fluorescente, funciona uniéndose a las paredes de los vasos sanguíneos. Se incuba en una concentración 1:100 en buffer PHM, con CaCl₂ 0,5M que promueve la unión de la isolectina a los vasos. Se realiza incubación durante toda la noche. Luego de los lavados, se realiza marcación de los núcleos con DAPI, incubando durante 15 minutos.

Se obtienen imágenes en mosaico utilizando la platina motorizada, y la herramienta tiles scan, mediante microscopía confocal (Zeiss 800) con lente 10x, de todo el cerebro.

3.-Procesamiento de imágenes: cuantificación, reconstrucción 3D, proyección en z correlación con imágenes doppler.

La combinación de la microscopia confocal y la imagenología DUF permite un mayor entendimiento del sistema vascular, siendo posible acceder a la red in vivo mediante imágenes DUF, y obteniendo muy buena resolución mediante las imágenes de microscopía confocal, lo que permite una mayor comprensión de ambas metodologías.

Las imágenes seriadas de microscopía confocal son editadas, alineando las rodajas del cerebro de a 4 para obtener un espesor total de cada imagen similar al espesor de las imágenes obtenidas por DUF. Esto se realiza utilizando el software imageJ y el plugin TrakEM2.

Se utilizaron imágenes de la zona del hipocampo anterior. Teniendo en cuenta estructuras conocidas del cerebro, se buscan las mismas zonas en las imágenes obtenidas por ambas metodologías, utilizando como referencia el atlas del cerebro murino (George Paxinos, 2007). Esto permite solapar las imágenes DUF con las imágenes de microscopía confocal y observar las coincidencias en los vasos sanguíneos de ambas imágenes.

4.-Realizar un análisis comparativo cuantitativo de imágenes DUF de cerebros de ratones WT y TrJ.

Se utilizaron cuatro ratones WT (tres de 6 meses y uno de 3 meses) y tres ratones TrJ (uno de 3 y dos de 18 meses).

Luego de obtener las imágenes DUF de ratones de ambos genotipos, se cuantifica utilizando Matlab. Se selecciona la zona del hipocampo por ser una estructura fácilmente reconocible y muy importante en procesos de memoria y aprendizaje. Se llamará intensidad a la intensidad promedio de todos los píxeles del área medida. Los parámetros medidos fueron:

- 1) Área hipocampal total: se crea una figura ovalada que abarca toda la zona hipocampal de la imagen y se mide el área de esa figura (figura 4);
- 2) Área hipocampal con vasos sanguíneos: se mide la cantidad de píxeles con intensidad mayor a -25db dentro del área delimitada anteriormente;
- 3) El cociente entre área hipocampal con vasos sanguíneos y área hipocampal total (a esto le llamaremos densidad) (Li HC, 2019).
- 4) El cociente entre la intensidad en el área hipocampal total, y el área hipocampal total;
- 5) El cociente entre intensidad en el área con vasos, y el área con vasos;
- 6) El cociente entre la intensidad en el área hipocampal total, y la densidad.

Con los datos obtenidos se realizaron test de normalidad D'Agostino- Pearson, Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov con intervalo de confianza de 0,05. Como la distribución no era normal, se realizó un t-test no paramétrico, Kolmogorov-Smirnov con un intervalo de confianza de 0,05, utilizando Graphpad para comparar ambos fenotipos.

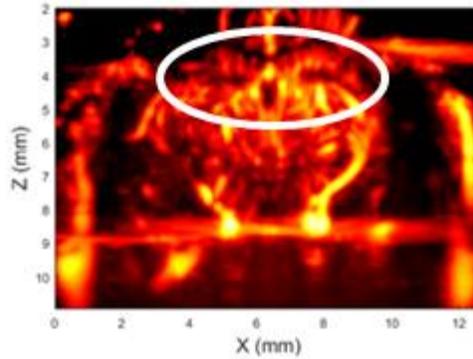


Figura 4- Se muestra el área hipocampal mencionada en el punto 1. El tamaño de la figura ovalada se selecciona en cada imagen, ya que cambia según el tamaño del cerebro.

5.-Realizar un análisis comparativo-cuantitativo de agregados de lipofuscina, con imágenes de microscopía confocal de la región hipocampal.

Los cerebros analizados fueron fijados con Paraformaldehído al 3%. Se infiltraron en concentraciones crecientes de medio de inclusión en sacarosa, y se congelaron. Se realizaron secciones de 10 μm de espesor utilizando criostato.

Para obtener imágenes de microscopía confocal se realizó marcación con DAPI, para visualizar los núcleos y poder identificar estructuras importantes como el hipocampo. No se realizó ninguna otra marcación ni proceso de desenmascaramiento, para observar la autofluorescencia de los agregados.

Se adquirieron imágenes de microscopía confocal del Cuerno de Amón del hipocampo, se analizó esta estructura ya que estudios comportamentales, de hibridación *in situ* e inmunohistoquímicos de nuestro grupo, indican un claro compromiso hipocampal asociado al genotipo Trembler-J (manuscrito en redacción). Nuestro grupo ha iniciado trabajos preliminares en el estudio de otras áreas del SNC, como el cerebelo (Trabajo de Grado en Bioquímica del Dr. Carlos Pizarossa, 2012) y la región de la sustancia nigra (Trabajo de Grado en Bioquímica de Mónica Bubé, en redacción), cuyos componentes vasculares también deberán ser analizados con mayor profundidad. Se utilizaron todos los láseres del microscopio Zeiss 800, la adquisición de las imágenes se realizó comenzando por las longitudes de onda mayores y continuando con las menores, de forma de no sobreexcitar la muestra y afectar la autofluorescencia de los agregados. Las imágenes de las muestras de ratones TrJ y WT se realizaron de forma pareada, en la misma

sesión, sin modificar las características de adquisición de la imagen, como los valores de auto voltaje.

Se midió la cantidad de agregados, su tamaño y su intensidad. Los datos se tomaron a partir de una proyección en Z de 20 planos. Se realizó un análisis estadístico (t test no paramétrico) para evidenciar diferencias en los distintos fenotipos, para esto se comparó la cantidad de agregados de distintos tamaños en las diferentes longitudes de onda entre ambos fenotipos.

Con los datos obtenidos se realizó un test de normalidad D'Agostino- Pearson, Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov con intervalo de confianza 0,05. Como la distribución no era normal, se realizó un test estadístico no paramétrico Kolmogorov Smirnov con un intervalo de confianza de 0,05, para comparar ambos fenotipos. Los test estadísticos fueron realizados en Graphpad.

Datos preliminares:

En el grupo de trabajo se obtuvieron imágenes DUF sin remover el cráneo (figura 5- 1 y 3). Esto se realizó en ratones de tres meses, para evitar que el hueso del cráneo estuviera muy consolidado, y la sonda pudiera penetrar mejor.

Luego se obtuvieron imágenes DUF del mismo cerebro (figura 5- 2 y 4), removiendo el cráneo. Pudimos comparar ambas imágenes, encontramos que las imágenes sin cráneo tenían mejor resolución y se pueden observar más estructuras.

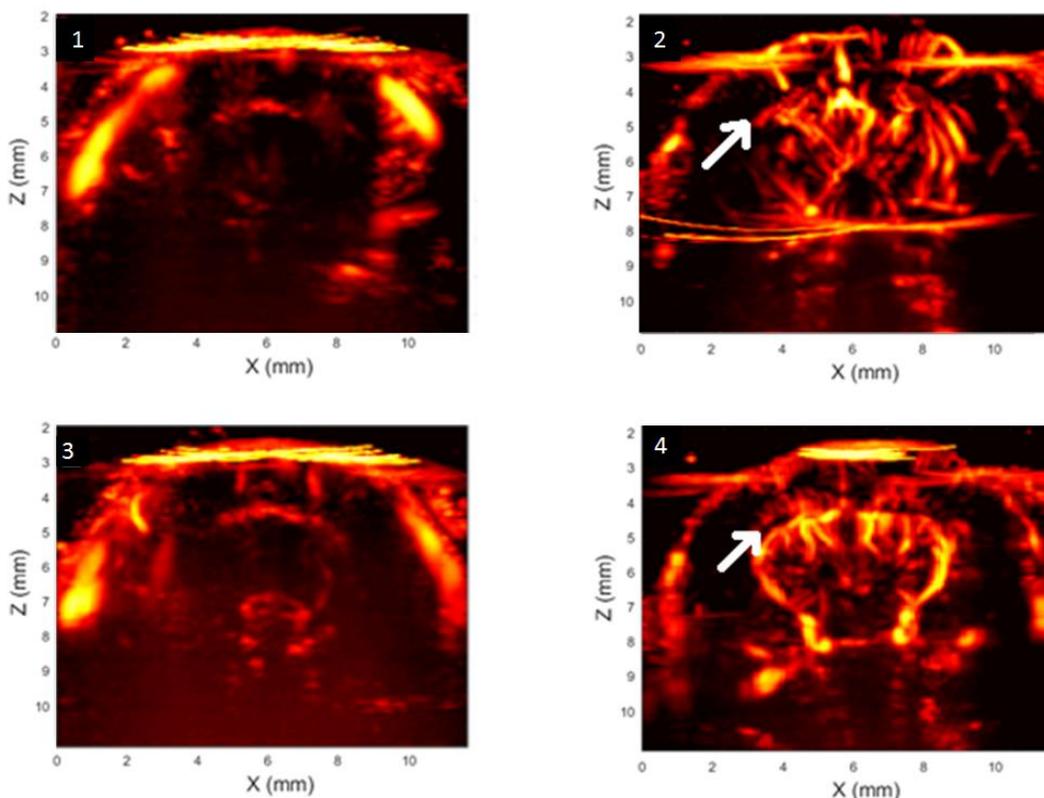


Figura 5- Imagen DUF de cerebro de ratón TrJ de 3 meses de edad. 1) Imagen tomada sin retirar el cráneo, correspondiente a la zona más anterior del cerebro, donde empieza a visualizarse el hipocampo. 2) Imagen tomada sin retirar el cráneo, correspondiente a una zona más posterior. 3) y 4) imágenes obtenidas luego de retirar el cráneo. Correspondientes a la misma altura que las imágenes 1) y 2) respectivamente. En estas se observan los vasos sanguíneos con mayor resolución y en mayor cantidad, se obtiene una estructura con más detalle y mejora la penetración de la sonda, visualizando zonas más profundas. Las flechas muestran el hipocampo anterior.

Las imágenes obtenidas con cráneo sólo muestran estructuras próximas a la corteza y con muy poco contraste, mientras que en las imágenes obtenidas luego de la remoción del cráneo podemos identificar distintas estructuras, por ejemplo, se puede observar la zona del hipocampo (señalado por flechas), y arterias grandes en la parte más inferior. En las imágenes tomadas sin cráneo además se visualizan vasos de menor calibre que no son visibles en las imágenes con cráneo.

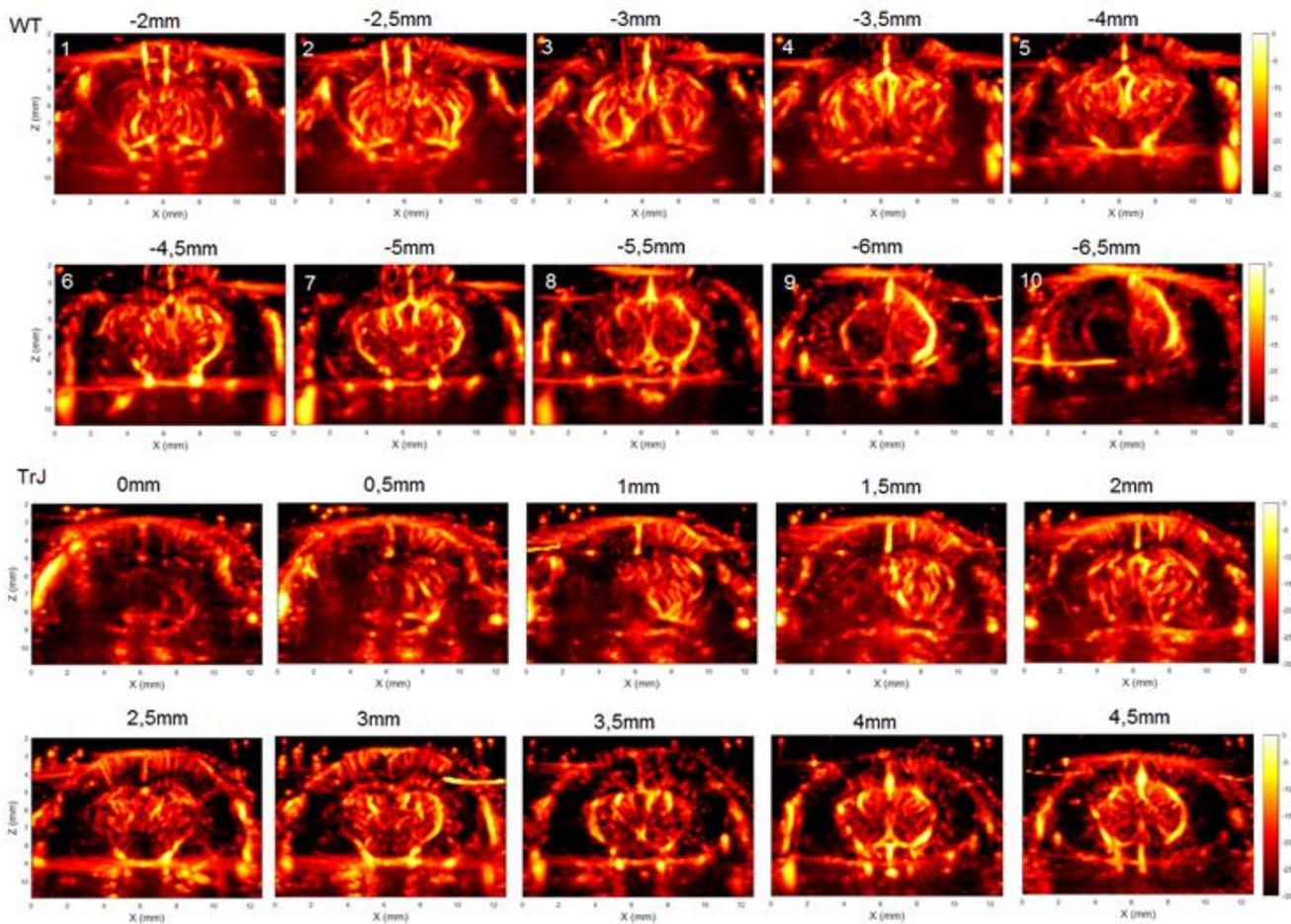
Como resultado de estos datos, decidimos continuar obteniendo imágenes con el encéfalo expuesto, realizando una craneotomía.

Resultados:

1.- Obtención de imágenes coronales DUF, en la región cerebral comprendida entre Bregma y Lambda, en ratones de genotipo WT y TrJ.

Se utilizaron 4 ratones WT (tres de 6 meses y uno de 3 meses) y 3 ratones TrJ (uno de 3 y dos de 18 meses).

Se reconocieron estructuras conocidas del cerebro (figura 6), como son la zona del hipocampo, las 4 arterias que se observan en la zona más inferior, además se reconocieron en varias imágenes una estructura en forma de 8 en el hemisferio izquierdo, y una estructura que se forma en la región central de la corteza.



(figura 6: 1-10) Imágenes DUF del cerebro de ratón WT, se observan los vasos sanguíneos del cerebro, tanto los más cercanos a la corteza como los más profundos. La zona del hipocampo se observa en la figura 5, 6 y 7, en la parte superior.

(figura 6: 11-20) Imágenes DUF del cerebro de ratón TrJ, al igual que en la imagen anterior se observan los vasos sanguíneos de todo el cerebro, se puede observar el hipocampo en la parte superior, imágenes 16, 17 y 18.

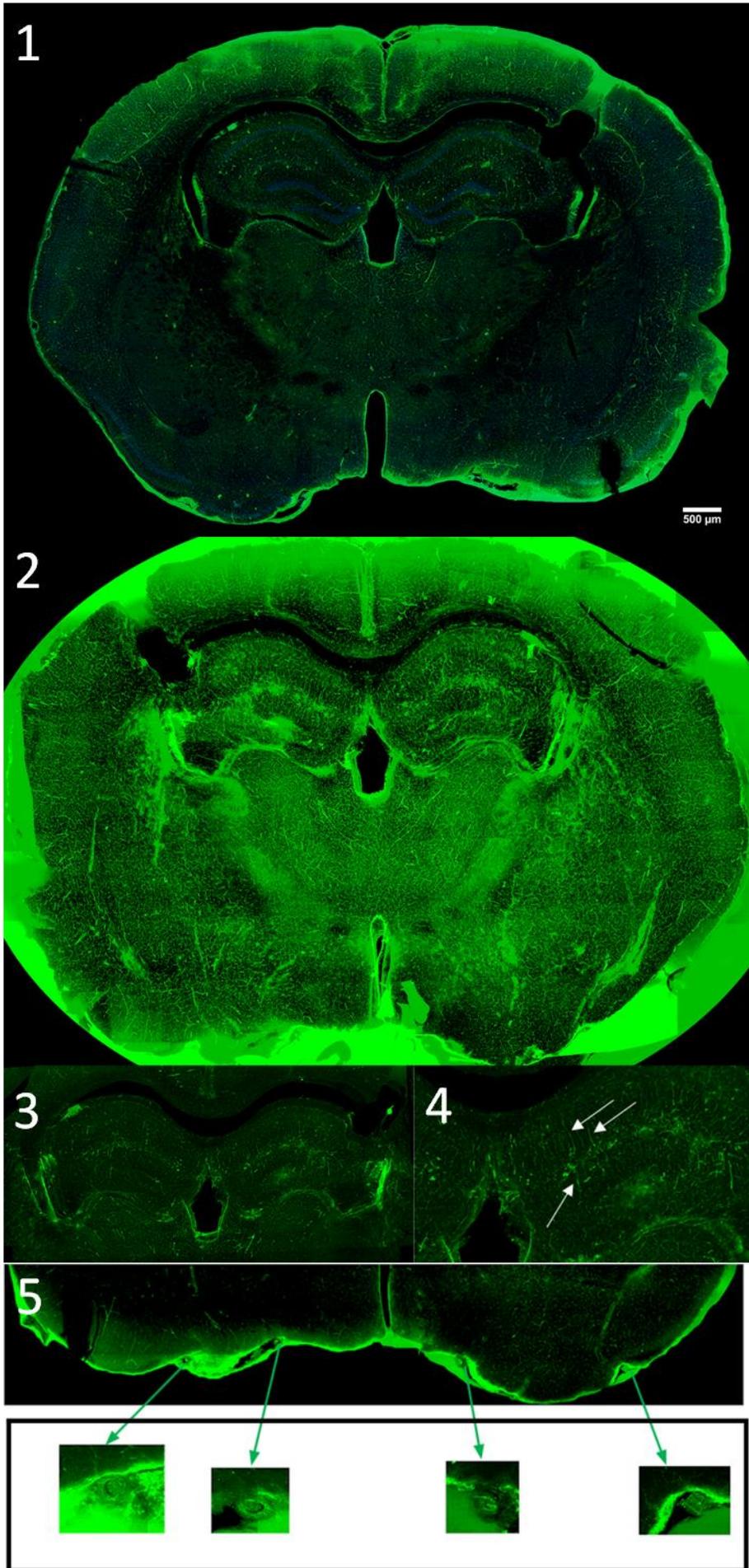
Se señalan las estructuras reconocidas que fueron útiles para comprender las imágenes y reconocer la zona del cerebro a la que corresponden.

- a) hipocampo, se observa como líneas verticales pequeñas formando una estructura curvada, esto corresponde a la parte más anterior del hipocampo.
- b) Estructura curvada, en forma de 8, se observó esta estructura en todos los ratones, sobre el lado izquierdo.
- c) Las arterias más profundas, se observan de forma transversal al flujo de sangre, estas arterias formarían parte del círculo de Willis.
- d) Se observa una estructura vertical, en la zona más cercana a la corteza, se encuentra en las secciones que corresponden a la parte más anterior del hipocampo. En algunos ratones no se observa bien debido a problemas que no permiten visualizar la corteza.

2.- Reconocimiento de la red vascular de los mismos cerebros analizados en (1), (con lectina IB4), imágenes en mosaico en microscopio confocal.

Se obtuvieron imágenes de microscopía confocal evidenciando los vasos sanguíneos con la sonda IB4. El espesor de cada corte es de 60 μm . Con cada imagen se realizó una proyección en z para visualizar todo el volumen (figura 7, 1).

A partir de estas imágenes, se solaparon imágenes de cuatro cortes consecutivos, para obtener una imagen que represente un espesor total de 240 μm , similar al espesor de las imágenes DUF. Esto se realizó para imágenes del cerebro entero, para la sección del hipocampo y de las arterias inferiores (figura 7- 2, 3, 4 y 5).



(figura 7: 1) *Imagen de microscopía confocal, DAPI (azul) evidencia los núcleos, IB4 (verde) evidencia los vasos sanguíneos. Corresponde a una rodaja de 60 micras, se realizó una proyección en z de los 10 planos obtenidos. Se observa el hipocampo evidenciado con DAPI, se visualizan vasos sanguíneos transversales a las líneas de núcleos.*

(figura 7: 2) *Esta imagen se obtuvo por superposición de imágenes de cuatro rodajas, alineándolas para que coincidieran, de forma que sea comparable con las imágenes DUF. Se observan mejor las líneas transversales de vasos cercanos al hipocampo.*

(figura 7: 3) *Amplificación de la imagen anterior, se pueden distinguir mejor los vasos de la zona del hipocampo. Se observa una acumulación de vasos sanguíneos formando la misma figura que formaban los núcleos.*

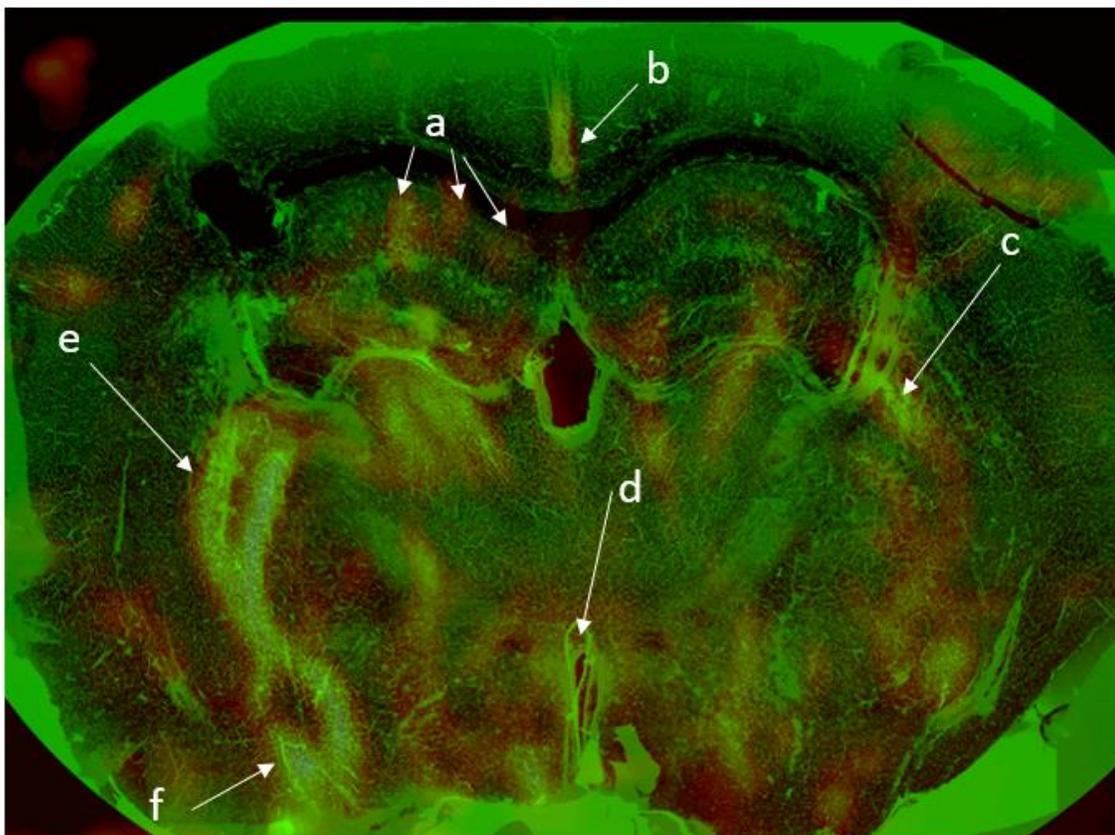
(figura 7: 4) *Sección del hipocampo, se señalan algunos vasos que se ubican transversalmente a la estructura del mismo.*

(figura 7: 5) *Sección inferior de la imagen, se observan arterias orientadas transversalmente, en algunas se puede observar la estructura de la capa muscular que la rodea, lo que sugiere, junto con el diámetro, que se trata de arterias.*

3.- Procesamiento de imágenes: cuantificación, reconstrucción 3D, proyección en z correlación con imágenes DUF.

Para comparar las imágenes obtenidas por ambas metodologías, se utilizaron imágenes de la misma zona del cerebro, luego de generar imágenes de microscopía confocal con información del mismo espesor que las imágenes DUF, se analizaron ambas estructuras buscando comprender la distinta información obtenida por estas dos metodologías (figura 8). Se identificaron estructuras comunes en ambas imágenes. Una característica a resaltar es que las imágenes de microscopía confocal tienen mucha mayor resolución que las imágenes DUF, siendo el límite de resolución 0,14-0,25um para las imágenes de microscopía confocal y 100 um para las imágenes DUF, por lo tanto permite resolver capilares más pequeños. En DUF se observaron conjuntos de vasos que en

esta metodología se observan como una estructura única, sin embargo, mediante microscopía confocal se confirmó que se trataba de un conjunto de vasos más pequeños, separados entre sí. En la zona del hipocampo se observan estructuras lineales en ambas imágenes.

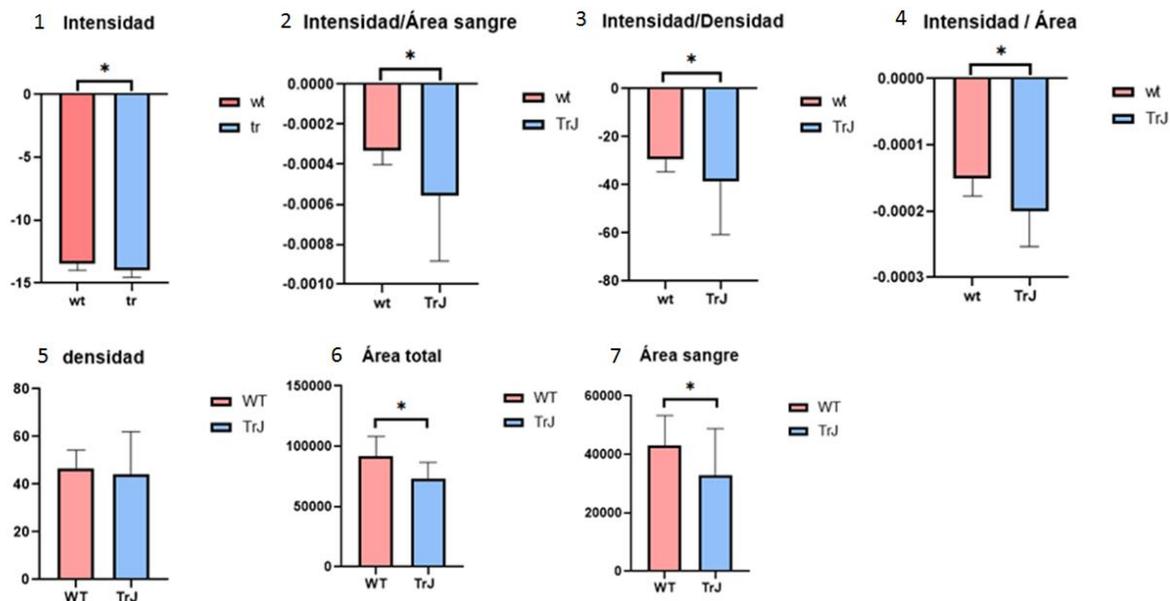


(Figura 8) Imagen DUF y de microscopía confocal solapadas, se observan estructuras que coinciden en ambas imágenes, se puede ver que las estructuras venosas visualizadas por DUF como estructuras individuales, se tratan de grupos de vasos más pequeños.

Se observan estructuras que coinciden en ambas imágenes. a) Vasos o grupos de vasos que corren transversalmente en la zona hipocampal. b) Vasos ubicados en la cisura interhemisférica. d) Grupo de vasos que corresponden a la pared del tercer ventrículo. C) se observa un conjunto de vasos, posiblemente corresponden a la zona de la fimbria del hipocampo e), f) Estructura en forma de 8 observada en todos los ratones, se puede visualizar por ambas metodologías, corresponde a la zona de la capsula interna.

4.- Análisis comparativo cuantitativo de imágenes DUF de cerebros de ratones WT y TrJ.

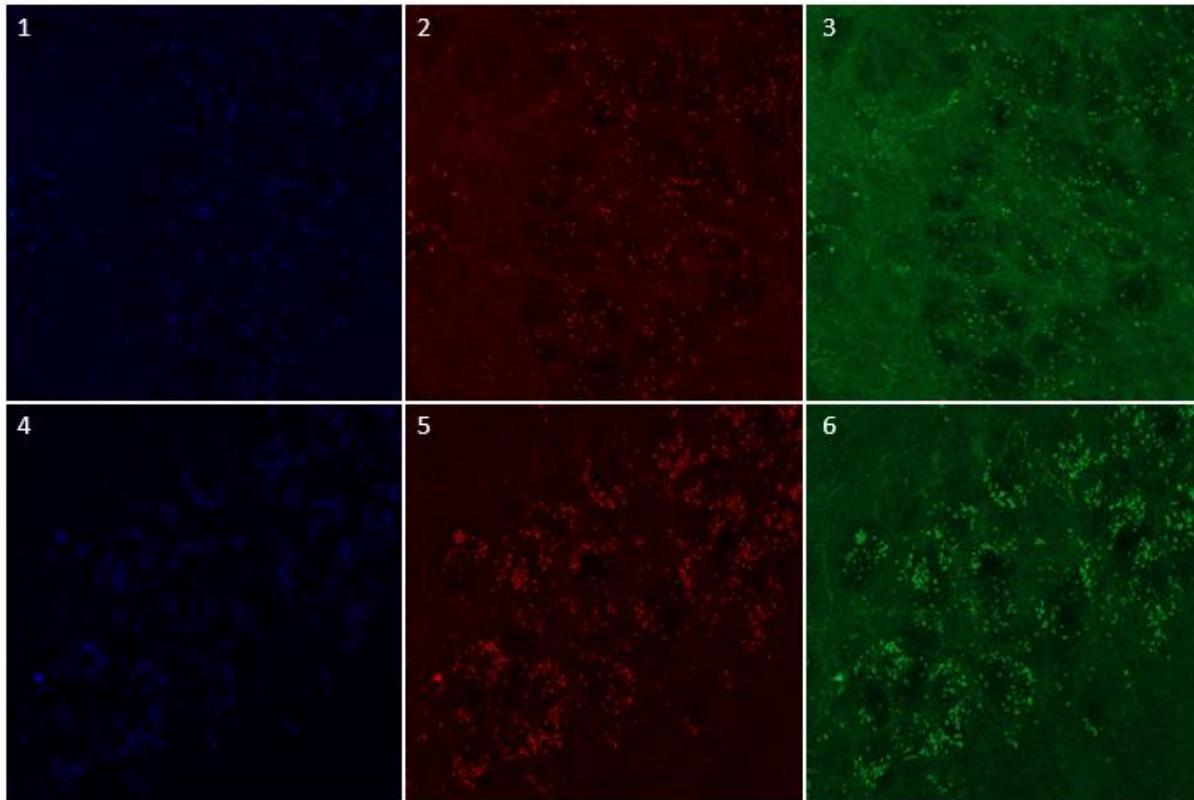
Con los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico comparando las medidas de ratones WT respecto a ratones TrJ, utilizando el programa Graphpad. Se utilizaron imágenes del hipocampo, entre bregma -1,2 y -2,2 aproximadamente (medidas en relación a bregma), (George Paxinos, 2007). Mediante este análisis se obtuvieron diferencias significativas para las medidas de intensidad (I), intensidad sobre área hipocampal sanguínea (I/AS), intensidad sobre densidad (I/D), intensidad sobre área total (I/AT). Todas estas medidas mostraron un valor absoluto mayor en los ratones TrJ. Las medidas de área total y área de vasos sanguíneos, también mostraron una diferencia significativa, presentando un valor mayor para los ratones WT (figura 9). Las medidas de intensidad se miden en decibeles, un valor de intensidad de menor valor absoluto (más cercano a cero) corresponde a mayor intensidad. Estos resultados muestran que los ratones TrJ presentan menor intensidad respecto a los WT, que corresponde a menor volumen así como menor área ocupada por el flujo sanguíneo.



(Figura 9) Gráficos comparando las dimensiones de las imágenes DUF medidas por Matlab, en ratones TrJ y WT. Gráfico 1: Se muestran diferencias de intensidad en ambos fenotipos, observándose valores significativamente mayores para el TrJ. Gráfico 2: se observan diferencias significativas en la medida de intensidad/área sanguínea, obteniendo un valor mayor en el TrJ. Gráfico 3: valores de intensidad/densidad, se observan valores significativamente mayores en el TrJ. Gráfico 4: diferencias de intensidad/área total del hipocampo, valores significativamente mayores en el TrJ. Gráfico 5: comparación de valores de densidad, no se observan diferencias significativas. Gráfico 6: comparación de valores de área total, se observan valores significativamente mayores para el WT. Gráfico 7: comparación de valores de área ocupada por sangre, se observa un valor significativamente mayor en ratones WT. Los valores de intensidad se expresan en decibeles (db).

5.- Análisis comparativo cuantitativo de agregados de lipofuscina, con imágenes de microscopía confocal de la región hipocampal.

Se obtuvieron fotos de autofluorescencia del giro dentado, del hipocampo de cuatro ratones de 9 meses, dos de ellos WT y dos TrJ (figura 10). Utilizando DAPI se evidenciaron los núcleos. Se obtuvieron 8 fotos para cada fenotipo, de dos ratones distintos.



*Figura 10: Agregados de lipofuscina en el **Cuerno de Amón (CA3)** del hipocampo. (1, 2, 3): imágenes de cerebro de ratón WT, en las longitudes de onda 633, 561, 488 respectivamente. (4, 5, 6): imágenes de cerebro de ratón TrJ, en las longitudes de onda 633, 561, 488 respectivamente. Se observan agregados de mayor tamaño y en mayor cantidad en el ratón TrJ.*

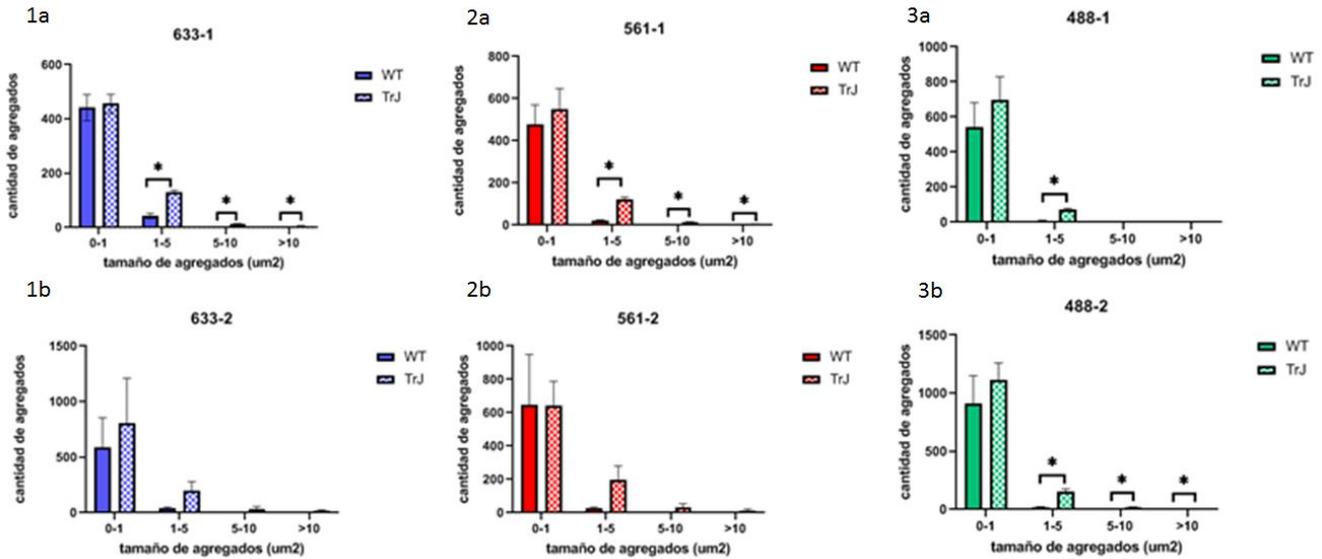
Para contabilizar los agregados de lipofuscina se utilizó el programa de procesamiento de imágenes Image J. Se realizó una máscara con un valor de umbral definido para cada longitud de onda, de forma que separara los agregados visibles del fondo, y estos se pudieran distinguir entre sí. Se seleccionaron los agregados que incluía la máscara y se contabilizaron, tanto la cantidad como la intensidad de fluorescencia.

Con estos datos se realizaron los siguientes análisis:

Tamaño de agregados:

Se separaron los agregados en grupos según su área: 0-1; 1-5; 5-10; >10 μm^2 , contando la cantidad de agregados en cada grupo para cada longitud de onda, y en cada foto por separado (figura 11).

Se realizó un t-test múltiple para evidenciar diferencias entre la cantidad de agregados de los distintos tamaños en ratones TrJ respecto a los WT.



(Figura 11) Gráficos de cantidad de agregados de lipofuscina separados por rangos de tamaño: 0-1um², 1-5um², 5-10um², >10um². Figura 1a- longitud de onda 633, primer par de ratones TrJ-WT. Figura 1b- longitud de onda 633, segundo par de ratones TrJ-WT. Figura 2a- longitud de onda 561, primer par de ratones TrJ-WT. Figura 2b- longitud de onda 561, segundo par de ratones TrJ-WT. Figura 3a- longitud de onda 488, primer par de ratones TrJ-WT. 3b- longitud de onda 488, segundo par de ratones TrJ-WT.

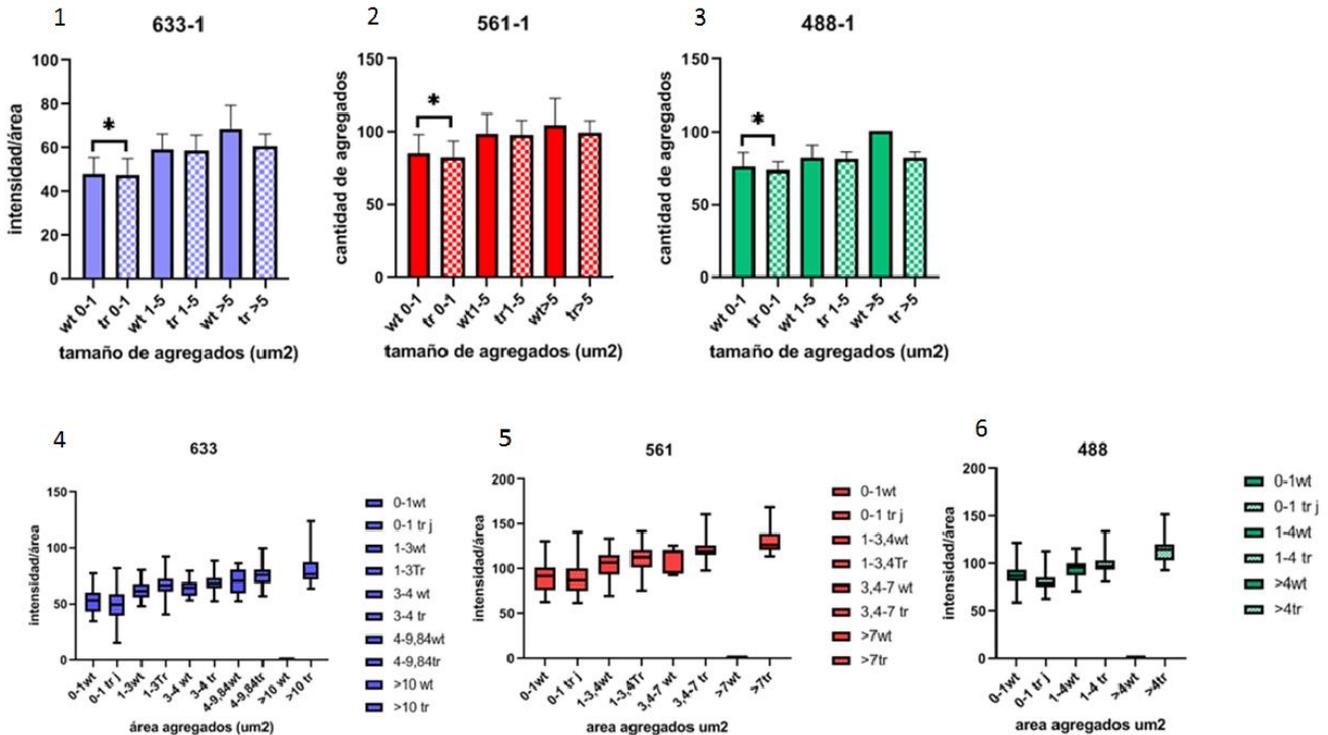
Para las longitudes de onda 633 y 561, se obtuvieron cantidades de agregados significativamente mayores para los agregados de tamaños 1-5, 5-10 y >10um² del ratón TrJ respecto al WT, solo en un par de datos (un ratón WT y un ratón TrJ), esto puede deberse a que en el segundo par de datos solo se identificaron tres fotos y no fueron suficientes para obtener diferencias significativas.

Para la longitud de onda 488, en el primer par de datos se obtuvieron cantidades de agregados significativamente mayores para el ratón TrJ, en los tamaños de 1-5um², mientras que en el segundo par de datos se obtuvieron diferencias significativas para los agregados de tamaños 1-5, 5-10 y >10.

En todos los casos los TrJ presentaron mayor cantidad de agregados que los WT.

Intensidad de los agregados:

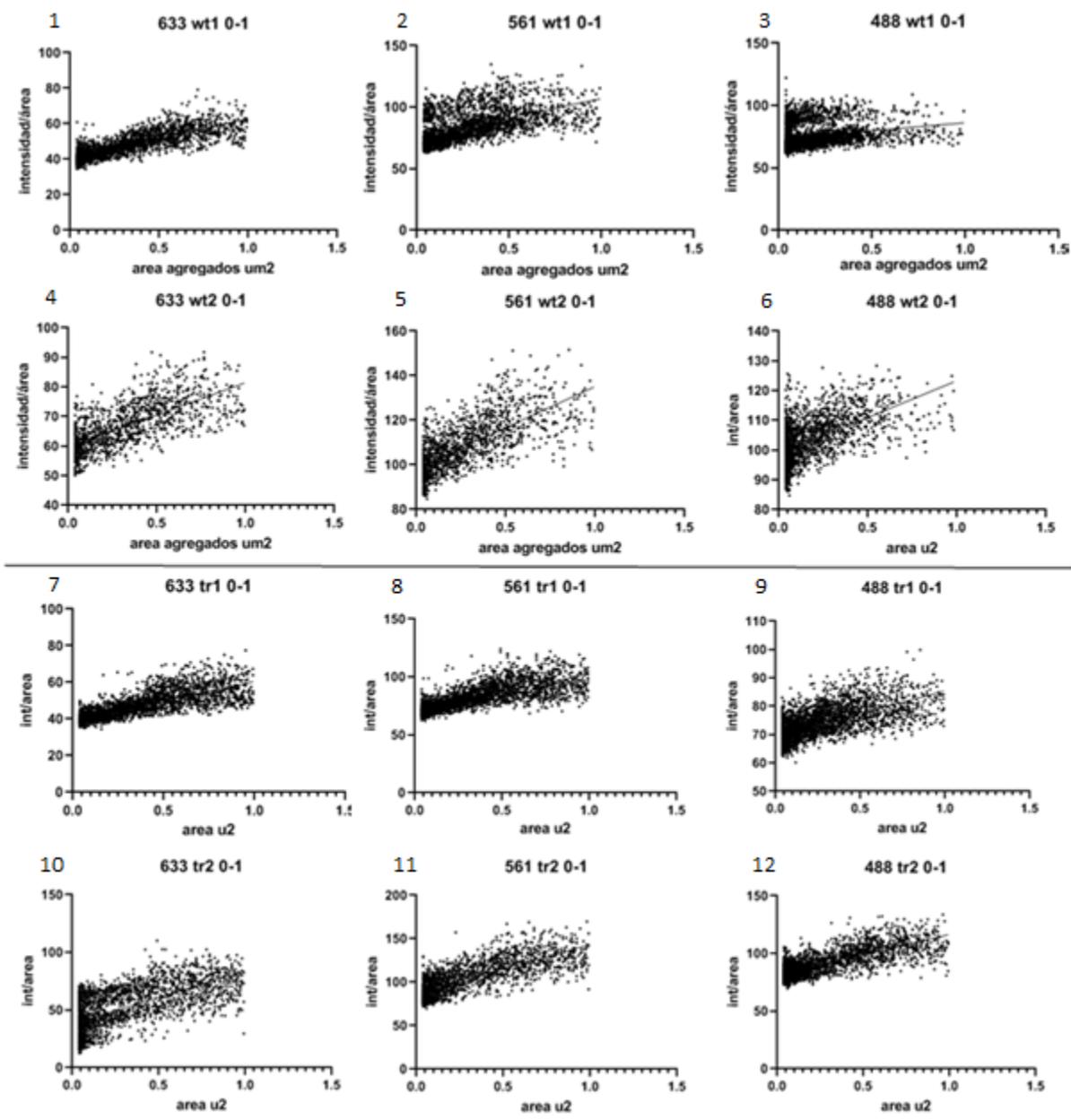
Se midió la intensidad de fluorescencia dividido entre el área de cada agregado. Esto se realizó para las distintas longitudes de onda y se separaron los datos en distintos rangos según el área de los agregados (figura 12).



(Figura 12) Comparación de la intensidad/área de agregados de lipofuscina, separados en rangos de tamaños. Gráficos 1, 2 y 3: intensidad /área de agregados en las longitudes de onda 633, 561 y 488, respectivamente, separados en los rangos 0-1 μ^2 , 1-5 μ^2 y >5 μ^2 . Gráficos 4, 5 y 6: intensidad /área de agregados en las longitudes de onda 633, 561 y 488, respectivamente, separados en rangos más chicos, esto permite observar una tendencia creciente, indicando que la intensidad aumenta con el tamaño de los agregados.

Se realizó un análisis estadístico no paramétrico (ya que las medidas no seguían una distribución normal) mediante el cual se hallaron diferencias significativas en la intensidad de lipofuscina para los distintos genotipos, de todas formas, dado que la cantidad de animales es baja, y hay mucha dispersión en los datos, esto no se puede tomar como un dato concluyente, no se puede observar una diferencia contundente respecto a la intensidad de fluorescencia en los distintos genotipos.

Con los resultados obtenidos también se observa que la intensidad de lipofuscina crece en todos los casos con el área de los agregados, lo que sucede en todas las muestras y en todas las longitudes de onda. A partir de esto se analizaron los agregados de 0 a 1 μm^2 y se observó que la intensidad de los agregados sigue una relación lineal con el tamaño (figura 13).



(Figura 13) Gráfico de intensidad/área en función del área de los agregados, para cada longitud de onda en cada ratón. Gráfico 1-6: WT; gráfico 6-12: Tr.J. Se observa que la intensidad crece linealmente con el área.

Discusión:

a) Diferencias vasculares en el fenotipo TrJ

El primer hallazgo de este trabajo es haber puesto a punto un método de detección de la función cerebral del flujo sanguíneo en el encéfalo murino, en condiciones saludables y en neurodegeneración.

Un hallazgo interesante fue la determinación de alteraciones en la estructura de la red vascular asociada a cambios en el volumen sanguíneo en el cerebro murino de un ratón que modeliza la neuropatía periférica CMT1-E. Para obtener estos datos se utilizó una metodología novedosa, DUF, mediante la cual se adquirieron imágenes muy ricas en información, de áreas vasculares y flujo sanguíneo global a nivel encefálico.

Este es un resultado valioso por varios motivos:

1.- En primer lugar, se encontraron alteraciones en el sistema nervioso central, en un modelo murino de la principal neuropatía periférica humana, lo cual fue escasamente reportado anteriormente (Wang Y, 2016). Esto indica que la neuropatía no solo afecta al SNP, sino que también afecta en alguna medida al SNC. Este es un dato muy nuevo, que abre una serie de preguntas, sugiriendo que pueden estar afectados otros dominios del SN, que no han sido suficientemente explorados hasta el presente en afecciones periféricas y de los que no se conoce el impacto sobre el fenotipo neurodegenerativo. También aporta al entendimiento del SN, ya que estos indicios sugieren que la mutación no afecta solo al SNP, sino que produce un impacto sistémico.

2.- Por otro lado, en el presente trabajo, se observaron alteraciones en el sistema vascular del cerebro en el modelo murino de CMT1E, Trembler-J, lo que implica un dato novedoso y escasamente reportado con anterioridad, a pesar de que originalmente CMT ha sido descrita como acompañada también de anormalidades vasomotoras (Brooks AP, 1980) (Charcot, J-M, 1886).

Se obtuvieron diferencias significativas comparando el registro del volumen sanguíneo en el cerebro de ratones TrJ y WT, lo que podría afectar su funcionamiento cerebral. En el presente trabajo mostramos decrecimiento en el volumen sanguíneo en TrJ respecto de WT, en la zona del hipocampo anterior. Además, el área que contiene sangre, es significativamente menor en los ratones TrJ. Esto significa que el fenotipo neurodegenerativo TrJ presenta menor volumen sanguíneo, lo que se observa tanto en la intensidad como en el área ocupada. Estas observaciones

podrían complementarse obteniendo las imágenes de la velocidad axial a partir de la frecuencia central de la señal sanguínea, que es proporcional a la velocidad axial de la sangre como ha sido señalado (Macé et al, 2011, 2013).

Para realizar este estudio fue necesario poner a punto la técnica DUF, esto fue un desafío ya que es una técnica nueva y no utilizada anteriormente en nuestro laboratorio. Existen escasos estudios previos en los que se utiliza este método en cerebros de ratones, para estudiar las diferencias de la red sanguínea, asociadas a un fenotipo neurodegenerativo (Li HC, 2019). Los estudios previos se realizaron en rata (Bercoff, 2011) (Osmanski, 2014) (C Errico, 2015) (C Errico, 2016) (Bergel, 2018) (Macé et al, 2013), ratón (Heinzer, 2008) (Tiran, 2017), y en bebés humanos (Demene, 2017). Los estudios DUF realizados en ratón en estos trabajos se centran en evaluar la respuesta funcional, sin evaluar un proceso de neurodegeneración. Por lo tanto, fue necesaria una etapa de perfeccionamiento de la técnica, para generar un protocolo de trabajo práctico, la obtención de datos confiables, así como la adquisición de imágenes de buena calidad, que permitieran observar el cerebro en toda su extensión. En estos trabajos previos, se constató que era necesario remover una sección del cráneo, para obtener registros DUF con imágenes más nítidas y de mejor contraste. El procedimiento implicó un aprendizaje nuevo en cuanto a la sedación y anestesia de los ratones durante la craneotomía y el tiempo ulterior del registro DUF, (alrededor de 2 horas en total). El éxito del procedimiento está basado en la sincronización de ambas técnicas (anestésica y quirúrgica). Fue necesario poner a punto la obtención de imágenes DUF, e idear una forma de cuantificación, para comparar la red vascular en los distintos fenotipos, ya que no existen estudios previos similares utilizando esta técnica. La cuantificación de densidad de vasos, fue realizada utilizando el programa Matlab, diseñando una secuencia que nos permitió evaluar en las imágenes DUF del cerebro murino, la intensidad de señal asociada a las áreas de vasos sanguíneos.

Es necesario también considerar la alteración de la red vascular en respuesta a los componentes de la anestesia, como un factor con impacto sobre la estructura de la red vascular. En general, la anestesia va acompañada en los primeros momentos de un descenso de la temperatura central (de 0,5 a 1,5 °C en los primeros 30 a 60 minutos), conocido como hipotermia de distribución de la inducción anestésica, que está integrado también por la vasodilatación cutánea, con consecuencias térmicas y cardiovasculares. Esta vasodilatación puede ser una respuesta directa a los anestésicos o deberse a la inhibición de la actividad vasoconstrictora del Sistema Nervioso Simpático.

Hemos aplicado una mezcla de anestésico Ketamina y sedante Xilacina recomendada en la literatura para anestesia quirúrgica en roedores (Mudarra I. et al, 2011; Regueiro M. et al, 2013), a ratones de ambos genotipos. La xilacina es un analgésico, sedante y relajante muscular, depresor de los mecanismos termorreguladores (Paddleford, 1999). La ketamina es un anestésico general, que induce inmovilización y es considerado por sus efectos, un anestésico disociativo (Regueiro M. et al 2013). La mezcla de ambos fármacos produce una anestesia estable por períodos prolongados de tiempo y una mínima vasodilatación, comparada con otros anestésicos, líquidos o gaseosos.

Nuestro trabajo ha demostrado la existencia de diferencias significativas en las áreas vasculares y en el volumen sanguíneo in vivo de la red vascular encefálica de ratones TrJ respecto de los wt. Estos estudios fueron efectuados bajo anestesia, suministrada en las mismas condiciones y dosis para ambos genotipos, en relación a su peso corporal. De ocurrir, la principal alteración esperable (la vasodilatación) podría actuar enmascarando los niveles de estenosis real en el genotipo TrJ. A pesar de ello, las diferencias observadas in vivo y bajo la acción de los fármacos Ketamina y Xilacina, en los ratones TrJ comparados con los wt, mostraron ser significativas.

Para nuestro trabajo futuro inmediato hemos incorporado un sistema de control de temperatura sincronizado con una cama térmica termostatazada, que se activa al bajar la temperatura rectal del ratón. Este sistema tiende a minimizar los efectos de las variaciones corporales de temperatura. Serán necesario incorporar nuevos estudios en la caracterización de otros aspectos del sistema vascular, como el ritmo cardíaco y respiratorio de cada genotipo, bajo la acción de la anestesia, para comprender con mayor profundidad los efectos de la misma en relación al componente vascular murino de ambos genotipos.

b) Análisis correlativo de imágenes DUF y MCC

El segundo aporte de este Trabajo de Grado es la puesta a punto de una metodología que permitió correlacionar las imágenes DUF, adquiridas in vivo, con imágenes de MCC de alta resolución.

En efecto, nuestro novedoso abordaje permitió la comparación entre imágenes DUF y MCC de las mismas áreas del cerebro. Dado que las imágenes de microscopía confocal tienen un espesor menor a las adquiridas por DUF, fue necesario realizar un tratamiento especial, utilizando distintos programas de procesamiento, que permiten apilar las imágenes de microscopía confocal de forma coherente, para obtener un espesor de imagen igual a las de las imágenes adquiridas in vivo por

DUF, y luego superponer ambas. Para esto fue necesario perfeccionar la obtención de imágenes mediante ambas técnicas. En DUF, buscamos obtener imágenes que incluyeran todo el cerebro, desde la región cortical superior hasta las zonas más profundas del cerebro, en cortes coronales completos. En cuanto a las imágenes de microscopía confocal, se utilizó la imagen de todo el cerebro a partir de una misma sección coronal. La platina motorizada es una adquisición reciente del IIBCE para el nuevo microscopio ZEISS-800 y ella nos permitió el uso de la función “escaneo en mosaico” (tiles scan), que fue puesta a punto por primera vez por nosotros, para la obtención de estas imágenes. Se realizaron pruebas para obtener el correcto solapamiento de las imágenes ordenadas del mosaico, con el objetivo de obtener una única imagen de cada sección, unida correctamente.

Una de las principales ventajas de esta aproximación, es la posibilidad de analizar distintas características de un mismo fenómeno. La microscopía confocal, permite caracterizar el epitelio vascular del cerebro, brindando información sobre la morfología y la conectividad de los vasos sanguíneos. En tanto que las imágenes DUF, brindan información sobre la funcionalidad de los mismos, permitiendo observar y caracterizar el volumen sanguíneo. La microscopía confocal, posee mayor resolución que la DUF ($R=100\text{ }\mu\text{m}$), por lo cual se puede observar con detalle la conectividad de los vasos y distinguir sus calibres, aún los más pequeños, donde ocurre la unión neurovascular, de gran importancia para el funcionamiento cerebral. La limitación de la MCC aplicada a nuestros objetivos, es que las medidas se realizan pos mortem y luego de una serie de tratamientos, que en mayor o menor medida promueven una serie de alteraciones con impacto variable sobre la estructura tisular. Por otro lado, la imagenología DUF permite obtener imágenes con el animal vivo, obteniendo información de la red sanguínea en funcionamiento, como un todo, visualizando la irrigación completa del cerebro. Se obtiene macro-información del tamaño y estructura del sistema vascular y volumen de flujo sanguíneo. La limitación de ésta técnica, DUF, es que la resolución es mucho menor que la de la microscopía confocal ($R>250\text{ }\mu\text{m}$), lo que no permite distinguir a los vasos de menor calibre.

Sistematizamos la identificación de áreas del cerebro por DUF y la caracterización en las mismas áreas del cerebro, de los epitelios vasculares señalados con isolectina fluorescente, por MCC. Nos enfocamos en establecer una correcta correlación y superposición de ambos tipos de imágenes en la zona del hipocampo anterior.

c) Niveles de organización vascular del encéfalo murino

El tercer aporte original de nuestro trabajo, fue la identificación por MCC de un grupo de pequeños vasos organizados de forma tal que al superponer las imágenes de MCC con la imagen DUF correspondiente, coincidían perfectamente con grandes estructuras de flujo sanguíneo.

Dado que las imágenes DUF aportan información funcional, esto sugiere que estos grupos de vasos pequeños, a pesar de estar separados anatómicamente, parecerían encontrarse asociados funcionalmente. Dicho de otro modo, dominios descritos como poseedores de un flujo reconocido por DUF, aparecen en la microscopía confocal, como vasos de pequeño calibre, separados anatómicamente, que se pueden visualizar formando estos agrupamientos cuando montamos la imagen de confocal con la de DUF, que cambian en conjunto. Esto sólo puede deducirse a partir de la comparación correlativa de ambas técnicas. En efecto, al observar la imagen de MCC no se identificaban grandes estructuras vasculares con isolectina fluorescente, pero al superponer las imágenes DUF se observa nítidamente cuáles son los grupos de vasos que corresponden a esas estructuras, y se comprende mejor la asociación funcional que posee el arreglo tridimensional de ellos. Este hallazgo es muy valioso, ya que podría implicar un nivel de organización funcional asociado a una su organización de capilares de menor calibre. Tal resultado, en la bibliografía que conocemos del tema, no ha sido descrito anteriormente y de confirmarse su existencia en un mayor número de animales, podría contribuir a comprender el funcionamiento del sistema vascular cerebral desde otra perspectiva.

Esta correlación se realizó en animales sanos. Entendemos de sumo interés, realizar estudios posteriores para verificar si se observa la misma correspondencia de imágenes en los ratones TrJ o si muestran una organización diferente.

d) El SNC en el modelo Trembler-J: la lipofuscina como posible indicador de neurodegeneración

El cuarto aporte de este trabajo es haber determinado la existencia de diferentes niveles de autofluorescencia de agregados intracelulares de lipofuscina a nivel del hipocampo, en cerebro de ratones TrJ y WT.

El SNC también parece estar afectado en el modelo TrJ. Nuestro grupo ha señalado la expresión diferencial del ARNm de pmp22 y de su proteína monomérica y en agregados a nivel de las neuronas hipocampales de ratones de ambos genotipos (TrJ y WT), asociado a comportamiento neuromotores y cognitivos conductuales específicos, lo que forma parte de un trabajo actualmente en vías de publicación. Contribuyendo a la caracterización del fenotipo neurodegenerativo TrJ, hemos iniciado un trabajo complementario, analizando las formas de agregación proteica en el hipocampo, analizando cuali y cuantitativamente la presencia de agregados de lipofuscina en cerebros de ratones TrJ y WT.

La lipofuscina es un pigmento frecuentemente considerado marcador etario, ya que se acumula con la edad, sin embargo, ha sido escasamente señalado como un indicador de neurodegeneración. En este trabajo logramos observar y cuantificar una distribución desigual de los agregados de lipofuscina, en hipocampo de ratones TrJ y WT. Además, un análisis de la fluorescencia en diferentes longitudes de onda nos sugiere un estudio cualitativo de los diferentes componentes y procesos metabólicos involucrados en la lipofuscinogénesis asociada a la neurodegeneración modelizada en los ratones Trembler-J. Esto parecería indicar que los agregados de lipofuscina podrían no ser únicamente un marcador etario, sino estar asociados a un metabolismo deficiente manifiesto durante la neurodegeneración. Así la presencia de agregados podría reflejar una ganancia de función tóxica, probablemente asociada al mal plegamiento y agregación de proteínas y glucolípidos. Además, recientemente se ha señalado en enfermedad de Alzheimer, agregados de lipofuscina asociados a placas seniles caracterizadas por la presencia del beta-amiloide, lo que parece indicar que nuestro hallazgo podría contribuir a la comprensión de un aspecto diferente de la neurodegeneración (Kun A, 2018) (Moreno-García A, 2018) (Giaccone G, 2011).

Como conclusión, se logró identificar un comportamiento diferencial en el SNC, en ratones TrJ y WT, lo que pone de manifiesto un compromiso del Sistema Nervioso Central en esta patología. Este compromiso se manifiesta tanto en modificaciones del volumen sanguíneo, como en la presencia de agregados lipoproteicos.

Históricamente, se ha observado que existe un compromiso vascular en las enfermedades neurodegenerativas (Govindpani K, 2019) (Nelson AR, 2015) (Roher AE, 2004) (Montagne A, 2015) (Martin JA, 2001) (Murphy MJ, 2012) (Abrahams S, 1996) (Winkler EA, 2013) (Kortekaas R, 2005) (Rosengarten B, 2010) (Iadecola C, 2017), El hallazgo de un compromiso vascular en el encéfalo, asociado a la neuropatía periférica CMT1E, modelizada en los ratones Trembler-J, sugiere un

aspecto sistémico de la patología, que podría estar en la base de fenómenos más transversales como eventos inflamatorios, altos niveles de estrés oxidativo y/o disfunción mitocondrial, que nuestro grupo ha comenzado a explorar. En este sentido, entendemos que el compromiso vascular debe también ser analizado y eventualmente confirmado, con los registros DUF y MCC correlativos de la red femoral que irriga el SNP.

Conclusiones generales:

1.-Se puso a punto la técnica DUF, en la exploración de la red vascular cerebral murina.

2.- Se observaron diferencias significativas en los volúmenes de flujo sanguíneo y en las áreas vasculares de cerebros de ratones WT y TrJ, sugiriendo que asociado al genotipo TrJ, se desarrolla un fenotipo neurodegenerativo con un compromiso vascular, que a nivel del SNC muestra un menor calibre y una mayor intensidad de volumen sanguíneo. Estos resultados indican que la mutación afecta al organismo en aspectos poco estudiados con anterioridad.

3.- Se realizó por primera vez un análisis correlativo DUF-MCC, de la red vascular del SNC murino WT a nivel del hipocampo anterior en ratones de genotipo WT. Así se observó la existencia de una suborganización de vasos sanguíneos en grupos de pequeños vasos que podrían encontrarse unidos funcionalmente.

4.- En el hipocampo anterior se observó una organización de agregados de lipofuscina diferente en cerebros TrJ respecto de WT, sugiriendo que estos agregados no solo se acumulan con la edad, sino que también pueden estar relacionados a condiciones de neurodegeneración. Esto podría estar indicando aspectos inexplorados del daño al SN en el fenotipo neurodegenerativo Trembler-J, no observado anteriormente.

Perspectivas:

1- Una vez optimizada la técnica DUF, se puede obtener otro tipo de información, como la direccionalidad del flujo, lo que puede ser de gran ayuda para comprender el sistema sanguíneo cerebral, discriminando la red arterial de la venosa.

2.- Se podrá determinar la velocidad de flujo sanguíneo para cada genotipo, determinando la velocidad axial a partir de la frecuencia central de la señal sanguínea, que es proporcional a la velocidad axial de la sangre.

3.- Además se podrán realizar estudios funcionales en respuesta a un estímulo exterior y registrando cambios correlativos en el registro DUF. Por ejemplo, se explorará la conectividad anatómica y funcional de la corteza somatosensorial (bigote/barril), innervada por el par craneal periférico derivado del trigémino (cita), en ratones de genotipo WT y en TrJ.

4.- Se seguirá perfeccionando la correlación DUF-MCC, estando proyectado un registro completo del encéfalo entre lambda y bregma.

5.- Se realizarán estudios con mayor cantidad de datos, y en diferentes grupos etarios, para confirmar lo observado en cuanto a las diferencias en el volumen sanguíneo TrJ-WT.

6.- Se estudiarán otros aspectos del sistema vascular que puedan verse alterados, como el funcionamiento vascular a nivel del SNP.

7.- Se realizarán estudios posteriores, sobre los agregados de lipofuscina en el modelo TrJ, investigando cómo se relacionan los agregados con la progresión de la afección en función del tiempo.

Bibliografía

Abrahams S, Goldstein LH, Kew JJ, et al. Frontal lobe dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. A PET study. *Brain*. 1996;119 (Pt 6):2105- 2120. doi:10.1093/brain/119.6.2105

Adeeb N, Mortazavi MM, Tubbs RS, Cohen-Gadol AA. The cranial dura mater: a review of its history, embryology, and anatomy. *Childs Nerv Syst*. 2012;28(6):827- 837. doi:10.1007/s00381-012-1744-6.

Alzheimer's Association. 2013 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2013;9(2):208- 245. doi:10.1016/j.jalz.2013.02.003.

Bennett RE, Robbins AB, Hu M, et al. Tau induces blood vessel abnormalities and angiogenesis-related gene expression in P301L transgenic mice and human Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(6):E1289- E1298. doi:10.1073/pnas.1710329115

Berciano J, Combarros O. Hereditary neuropathies. *Curr Opin Neurol*. 2003;16(5):613- 622. doi:10.1097/01.wco.0000093105.34793.dd

Bercoff J, Montaldo G, Loupas T, et al. Ultrafast compound Doppler imaging: providing full blood flow characterization. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*. 2011;58(1):134- 147. doi:10.1109/TUFFC.2011.1780

Bergel A, Deffieux T, Demené C, Tanter M, Cohen I. Local hippocampal fast gamma rhythms precede brain-wide hyperemic patterns during spontaneous rodent REM sleep. *Nat Commun*. 2018;9(1):5364. Published 2018 Dec 18. doi:10.1038/s41467-018-07752-3.

Bird TD. Charcot-Marie-Tooth (CMT) Hereditary Neuropathy Overview. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., eds. *GeneReviews*®. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993. PMID: 20301532

Bradley JP, Levine JP, Roth DA, McCarthy JG, Longaker MT. Studies in cranial suture biology: IV. Temporal sequence of posterior frontal cranial suture fusion in the mouse. *Plast Reconstr Surg*. 1996;98(6):1039- 1045. doi:10.1097/00006534-199611000-00018.

Brooks AP. Abnormal vascular reflexes in Charcot-Marie-Tooth disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1980;43(4):348- 350. doi:10.1136/jnnp.43.4.348

J. Brum¹, M. Martinez, J. Baranger, M. Calero, M. Tanter, C. Negreira, A. Kun. Ultrafast Ultrasound Doppler vs. confocal microscopy in a mouse brain model. International Congress on Ultrasonics, Burges, Belgium, 2019.

Ceballos D, Cuadras J, Verdú E, Navarro X. Morphometric and ultrastructural changes with ageing in mouse peripheral nerve. *J Anat*. 1999;195 (Pt 4)(Pt 4):563- 576. doi:10.1046/j.1469-7580.1999.19540563.x

Chaplygina AV, Vekshin NL. *Adv Gerontol*. 2018;31(2):197- 202.

Charcot, JM, Marie P (1886) Sur une forme particulière d'atrophie musculaire proessive souven familiale, deutant par les pieds e les jambes et atteignant plus tard les mains, *Rev. Med* 6:97.-138

Chiao-Chi V Chen, Yu-Chen Chen, Han-Yun Hsiao, Chen Chang and Yijuang Chern. Neurovascular abnormalities in brain disorders: highlights with angiogenesis and magnetic resonance imaging studies. *Journal of Biomedical Science*. doi: 10.1186/1423-0127-20-47 (2013)

Crouch RK, Koutalos Y, Kono M, Schey K, Ablonczy Z. A2E and Lipofuscin. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2015;134:449- 463. doi:10.1016/bs.pmbts.2015.06.005

Dasgupta K, Jeong J. Developmental biology of the meninges. *Genesis*. 2019;57(5):e23288. doi:10.1002/dvg.23288.

De Gasperi R, Gama Sosa MA, Naumowicz Z, et al. Peripheral myelin protein-22 is expressed in cns myelin. *Transl Neurosci*. 2010;1(4):282- 285. doi:10.2478/v10134-010-0038-3

Demene C, Baranger J, Bernal M, et al. Functional ultrasound imaging of brain activity in human newborns. *Sci Transl Med*. 2017;9(411):eaah6756. doi:10.1126/scitranslmed.aah6756.

Demené C, Deffieux T, Pernot M, et al. Spatiotemporal Clutter Filtering of Ultrafast Ultrasound Data Highly Increases Doppler and fUltrasound Sensitivity. *IEEE Trans Med Imaging*. 2015;34(11):2271- 2285. doi:10.1109/TMI.2015.2428634

Di Guardo G. Lipofuscin, lipofuscin-like pigments and autofluorescence. *Eur J Histochem*. 2015;59(1):2485. Published 2015 Feb 6. doi:10.4081/ejh.2015.2485

Eichinger K, Burns J, Cornett K, et al. The Charcot-Marie-Tooth Functional Outcome Measure(CMT-FOM).*Neurology*.2018;91(15):e1381- e1384.
doi:10.1212/WNL.0000000000006323.

Errico C, Osmanski BF, Pezet S, Couture O, Lenkei Z, Tanter M. Transcranial functional ultrasound imaging of the brain using microbubble-enhanced ultrasensitive Doppler. *Neuroimage*. 2016;124(Pt A):752- 761. doi:10.1016/j.neuroimage.2015.09.037

Errico C, Pierre J, Pezet S, et al. Ultrafast ultrasound localization microscopy for deep super-resolution vascular imaging. *Nature*. 2015;527(7579):499- 502. doi:10.1038/nature16066

Farley A, Johnstone C, Hendry C, McLafferty E. Nervous system: part 1. *Nurs Stand*. 2014;28(31):46- 51. doi:10.7748/ns2014.04.28.31.46.e7004

Farley A, McLafferty E, Johnstone C, Hendry C. Nervous system: part 3. *Nurs Stand*. 2014;28(33):46- 50. doi:10.7748/ns2014.04.28.33.46.e8187

Feng FK, E LL, Kong XP, Wang DS, Liu HC. Lipofuscin in saliva and plasma and its association with age in healthy adults. *Aging Clin Exp Res*. 2015;27(5):573- 580. doi:10.1007/s40520-015-0326-3

Fortun J, Li J, Go J, Fenstermaker A, Fletcher BS, Notterpek L. Impaired proteasome activity and accumulation of ubiquitinated substrates in a hereditary neuropathy model [published

correction appears in J Neurochem. 2005 May;93(3):766-8]. J Neurochem. 2005;92(6):1531-1541. doi:10.1111/j.1471-4159.2004.02987.x

Georgakopoulou EA, Tsimaratou K, Evangelou K, et al. Specific lipofuscin staining as a novel biomarker to detect replicative and stress-induced senescence. A method applicable in cryopreserved and archival tissues. *Aging (Albany NY)*. 2013;5(1):37- 50. doi:10.18632/aging.100527

George Paxinos, Keith B.J. Franklin, MA, PhD. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Elsevier Science. 2007.

Giaccone G, Orsi L, Cupidi C, Tagliavini F. Lipofuscin hypothesis of Alzheimer's disease. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*. 2011;1(1):292- 296. doi:10.1159/000329544

Govindpani K, McNamara LG, Smith NR, et al. Vascular Dysfunction in Alzheimer's Disease: A Prelude to the Pathological Process or a Consequence of It?. *J Clin Med*. 2019;8(5):651. Published 2019 May 10. doi:10.3390/jcm8050651

Gray DA, Woulfe J. Lipofuscin and aging: a matter of toxic waste. *Sci Aging Knowledge Environ*. 2005;2005(5):re1. Published 2005 Feb 2. doi:10.1126/sageke.2005.5.re1

Greenberg RW, Lane EL, Cinnamon J, Farmer P, Hyman RA. The cranial meninges: anatomic considerations. *Semin Ultrasound CT MR*. 1994;15(6):454- 465. doi:10.1016/s0887-2171(05)80017-4.

Hamanaka G, Ohtomo R, Takase H, Lok J, Arai K. Role of oligodendrocyte-neurovascular unit in white matter repair. *Neurosci Lett*. 2018;684:175- 180. doi:10.1016/j.neulet.2018.07.016

Heinzer S, Kuhn G, Krucker T, et al. Novel three-dimensional analysis tool for vascular trees indicates complete micro-networks, not single capillaries, as the angiogenic endpoint in mice overexpressing human VEGF(165) in the brain. *Neuroimage*. 2008;39(4):1549- 1558. doi:10.1016/j.neuroimage.2007.10.054

Höhn A, Grune T. Lipofuscin: formation, effects and role of macroautophagy. *Redox Biol.* 2013;1(1):140- 144. Published 2013 Jan 19. doi:10.1016/j.redox.2013.01.006

Holtzman DM, Morris JC, Goate AM. Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med.* 2011;3(77):77sr1. doi:10.1126/scitranslmed.3002369

Hur JC, Blaise R, Limon I. Protocol for Isolating the Mouse Circle of Willis. *J Vis Exp.* 2016;(116):54352. Published 2016 Oct 22. doi:10.3791/54352

Iadecola C. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron.* 2017;96(1):17- 42. doi:10.1016/j.neuron.2017.07.030

Iadecola C. Vascular and Metabolic Factors in Alzheimer's Disease and Related Dementias: Introduction. *Cell Mol Neurobiol.* 2016;36(2):151- 154. doi:10.1007/s10571-015-0319-y

Inherited Peripheral Neuropathies Mutation Database. <http://www.molgen.vib-ua.be/CMTMutations/>

Jouaud M, Mathis S, Richard L, Lia AS, Magy L, Vallat JM. Rodent models with expression of PMP22: Relevance to dysmyelinating CMT and HNPP. *J Neurol Sci.* 2019;398:79- 90. doi:10.1016/j.jns.2019.01.030.

König J, Ott C, Hugo M, et al. Mitochondrial contribution to lipofuscin formation. *Redox Biol.* 2017;11:673- 681. doi:10.1016/j.redox.2017.01.017

Korovila I, Hugo M, Castro JP, et al. Proteostasis, oxidative stress and aging. *Redox Biol.* 2017;13:550- 567. doi:10.1016/j.redox.2017.07.008

Kortekaas R, Leenders KL, van Oostrom JC, et al. Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. *Ann Neurol.* 2005;57(2):176- 179. doi:10.1002/ana.20369

Kun A, Canclini L, Rosso G, et al. F-actin distribution at nodes of Ranvier and Schmidt-Lanterman incisures in mammalian sciatic nerves. *Cytoskeleton (Hoboken).* 2012;69(7):486- 495. doi:10.1002/cm.21011

Kun A, González-Camacho F, Hernández S, Moreno-García A, Calero O, Calero M. Characterization of Amyloid- β Plaques and Autofluorescent Lipofuscin Aggregates in Alzheimer's Disease Brain: A Confocal Microscopy Approach. *Methods Mol Biol.* 2018;1779:497- 512. doi:10.1007/978-1-4939-7816-8_31

Li HC, Chen PY, Cheng HF, Kuo YM, Huang CC. In Vivo Visualization of Brain Vasculature in Alzheimer's Disease Mice by High-Frequency Micro-Doppler Imaging. *IEEE Trans Biomed Eng.* 2019;66(12):3393- 3401. doi:10.1109/TBME.2019.2904702

Li Y, Xie L, Huang T, et al. Aging Neurovascular Unit and Potential Role of DNA Damage and Repair in Combating Vascular and Neurodegenerative Disorders. *Front Neurosci.* 2019;13:778. Published 2019 Aug 8. doi:10.3389/fnins.2019.00778

Love S, Miners JS. Cerebrovascular disease in ageing and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2016;131(5):645- 658. doi:10.1007/s00401-015-1522-0

Mace E, Montaldo G, Cohen I, Baulac M.,Fink M, Tanter M. Functional ultrasound imaging of the brain. *Nature methods* 2011; (vol 8,No.8):662-664;doi: 10.1038/nmeth.1641. .

Mace E, Montaldo G, Osmani BF, Cohen I, Fink M, Tanter M. Functional ultrasound imaging of the brain: theory and basic principles. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control.* 2013;60(3):492- 506. doi:10.1109/TUFFC.2013.2592

Martin JA, Craft DK, Su JH, Kim RC, Cotman CW. Astrocytes degenerate in frontotemporal dementia: possible relation to hypoperfusion. *Neurobiol Aging.* 2001;22(2):195- 207. doi:10.1016/s0197-4580(00)00231-1

Montagne A, Barnes SR, Sweeney MD, et al. Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron.* 2015;85(2):296- 302. doi:10.1016/j.neuron.2014.12.032

Morena J, Gupta A, Hoyle JC. Charcot-Marie-Tooth: From Molecules to Therapy. *Int J Mol Sci.* 2019;20(14):3419. Published 2019 Jul 12. doi:10.3390/ijms20143419

Morena J, Gupta A, Hoyle JC. Charcot-Marie-Tooth: From Molecules to Therapy. *Int J Mol Sci.* 2019;20(14):3419. Published 2019 Jul 12. doi:10.3390/ijms20143419.

Moreno-García A, Kun A, Calero O, Medina M, Calero M. An Overview of the Role of Lipofuscin in Age-Related Neurodegeneration. *Front Neurosci.* 2018;12:464. Published 2018 Jul 5. doi:10.3389/fnins.2018.00464

Mudarra Fraguas. Guía Anestesia y Analgesia en Ratón. Servicio de Experimentación Animal Unidad SEA - ELX, Universidad Miguel Hernández, 2011.

Murphy MJ, Grace GM, Tartaglia MC, et al. Widespread cerebral haemodynamics disturbances occur early in amyotrophic lateral sclerosis. *Amyotroph Lateral Scler.* 2012;13(2):202- 209. doi:10.3109/17482968.2011.625569

Myelin formation, structure and biochemistry. Quarles R, et al. (2006)

Nelson AR, Sweeney MD, Sagare AP, Zlokovic BV. Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1862(5):887- 900. doi:10.1016/j.bbadis.2015.12.016

Norreel JC, Jamon M, Riviere G, Passage E, Fontes M, Clarac F. Behavioural profiling of a murine Charcot-Marie-Tooth disease type 1A model. *Eur J Neurosci.* 2001;13(8):1625- 1634. doi:10.1046/j.0953-816x.2001.01535.x

Obenaus A, Ng M, Orantes AM, et al. Traumatic brain injury results in acute rarefaction of the vascular network. *Sci Rep.* 2017;7(1):239. Published 2017 Mar 22. doi:10.1038/s41598-017-00161-4

Ohsawa Y, Murakami T, Miyazaki Y, Shirabe T, Sunada Y. Peripheral myelin protein 22 is expressed in human central nervous system. *J Neurol Sci.* 2006;247(1):11- 15. doi:10.1016/j.jns.2006.03.004

Opperman LA. Cranial sutures as intramembranous bone growth sites. *Dev Dyn.* 2000;219(4):472- 485. doi:10.1002/1097-0177(2000)9999:9999::AID-DVDY1073>3.0.CO;2-F

Osmanski BF, Pezet S, Ricobaraza A, Lenkei Z, Tanter M. Functional ultrasound imaging of intrinsic connectivity in the living rat brain with high spatiotemporal resolution. *Nat Commun.* 2014;5:5023. Published 2014 Oct 3. doi:10.1038/ncomms6023

Pareyson D, Saveri P, Pisciotta C. New developments in Charcot-Marie-Tooth neuropathy and related diseases. *Curr Opin Neurol.* 2017;30(5):471- 480. doi:10.1097/WCO.0000000000000474.

Parmantier E, Braun C, Thomas JL, Peyron F, Martinez S, Zalc B. PMP-22 expression in the central nervous system of the embryonic mouse defines potential transverse segments and longitudinal columns. *J Comp Neurol.* 1997;378(2):159- 172.

Parmantier E, Cabon F, Braun C, D'Urso D, Müller HW, Zalc B. Peripheral myelin protein-22 is expressed in rat and mouse brain and spinal cord motoneurons. *Eur J Neurosci.* 1995;7(5):1080- 1088. doi:10.1111/j.1460-9568.1995.tb01095.x

Paula Grammas 1, Alma Sanchez, Debjani Tripathy, Ester Luo, Joseph Martinez. Vascular signaling abnormalities in Alzheimer disease. *Cleveland Clinic Journal of Medicine.* (2011) doi: 10.3949/ccjm.78.s1.09.

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al., editors. *Neuroscience.* 2nd edition. . Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2001.

Ramchandren S. Charcot-Marie-Tooth Disease and Other Genetic Polyneuropathies. *Continuum (Minneapolis, Minn).* 2017;23(5, Peripheral Nerve and Motor Neuron Disorders):1360-1377. doi:10.1212/CON.0000000000000529

Rangaraju S, Hankins D, Madorsky I, et al. Molecular architecture of myelinated peripheral nerves is supported by calorie restriction with aging. *Aging Cell.* 2009;8(2):178- 191. doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00460.x

Roher AE, Esh C, Rahman A, Kokjohn TA, Beach TG. Atherosclerosis of cerebral arteries in Alzheimer disease. *Stroke*. 2004;35(11 Suppl 1):2623- 2627. doi:10.1161/01.STR.0000143317.70478.b3

Rosengarten B, Dannhardt V, Burr O, et al. Neurovascular coupling in Parkinson's disease patients: effects of dementia and acetylcholinesterase inhibitor treatment. *J Alzheimers Dis*. 2010;22(2):415- 421. doi:10.3233/JAD-2010-101140

Rossor AM, Polke JM, Houlden H, Reilly MM. Clinical implications of genetic advances in Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(10):562- 571. doi:10.1038/nrneurol.2013.179.

Stokin GB, Goldstein LS. Axonal transport and Alzheimer's disease. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:607- 627. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142637

Suter U, Scherer SS. Disease mechanisms in inherited neuropathies. *Nat Rev Neurosci*. 2003;4(9):714- 726. doi:10.1038/nrn1196

Tata M, Ruhrberg C, Fantin A. Vascularisation of the central nervous system. *Mech Dev*. 2015;138 Pt 1:26- 36. doi:10.1016/j.mod.2015.07.001

Terman A, Brunk UT. Lipofuscin: mechanisms of formation and increase with age. *APMIS*. 1998;106(2):265- 276. doi:10.1111/j.1699-0463.1998.tb01346.x

Terman A, Brunk UT. Lipofuscin. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(8):1400- 1404. doi:10.1016/j.biocel.2003.08.009

Tesis Carlos Pizarrossa. Estudio de la expresión génica de pmp22 en el sistema nervioso central (hipocampo) de la cepa trembler j de mus musculus, portadora de la mutación puntual t1703c en el cromosoma 11.

Tesis Mariana Bresque. 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.
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/9065/1/uy24-17289.pdf>

Tiran E, Ferrier J, Deffieux T, et al. Transcranial Functional Ultrasound Imaging in Freely Moving Awake Mice and Anesthetized Young Rats without Contrast Agent. *Ultrasound Med Biol.* 2017;43(8):1679- 1689. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2017.03.011

Tobler AR, Liu N, Mueller L, Shooter EM. Differential aggregation of the Trembler and Trembler J mutants of peripheral myelin protein 22. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(1):483- 488. doi:10.1073/pnas.012593399

Tsuchida M, Miura T, Aibara K. Lipofuscin and lipofuscin-like substances. *Chem Phys Lipids.* 1987;44(2-4):297- 325. doi:10.1016/0009-3084(87)90055-7

Valentijn LJ, Baas F, Wolterman RA, et al. Identical point mutations of PMP-22 in Trembler-J mouse and Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet.* 1992;2(4):288- 291. doi:10.1038/ng1292-288

Vallat JM, Grid D, Magdelaine C, Sturtz F, Levy N, Tazir M. Formes autosomales récessives de la maladie de Charcot-Marie-Tooth [Autosomal recessive forms of Charcot-Marie-Tooth disease]. *Bull Acad Natl Med.* 2005;189(1):55- 69.

Villemagne VL, Burnham S, Bourgeat P, et al. Amyloid β deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol.* 2013;12(4):357- 367. doi:10.1016/S1474-4422(13)70044-9

Völgyi K, Gulyássy P, Todorov MI, et al. Chronic Cerebral Hypoperfusion Induced Synaptic Proteome Changes in the rat Cerebral Cortex. *Mol Neurobiol.* 2018;55(5):4253- 4266. doi:10.1007/s12035-017-0641-0

Wang Y, Yin F. A Review of X-linked Charcot-Marie-Tooth Disease. *J Child Neurol.* 2016;31(6):761- 772. doi:10.1177/0883073815604227

Wei Cai^{1,2}, Huan Liu¹, Jingyan Zhao¹, Lily Y. Chen¹, Jun Chen¹, Zhengqi Lu², and Xiaoming Hu. Pericytes in Brain injury and Repair after Ischemic Stroke. *Transl. Stroke Res.* 8, 107–121 (2017). <https://doi.org/10.1007/s12975-016-0504-4>

Wilson ER, Della-Flora Nunes G, Weaver MR, Frick LR, Feltri ML. Schwann cell interactions during the development of the peripheral nervous system [published online ahead of print, 2020 Apr 12]. *Dev Neurobiol.* 2020;10.1002/dneu.22744. doi:10.1002/dneu.22744

Winkler EA, Sengillo JD, Sullivan JS, Henkel JS, Appel SH, Zlokovic BV. Blood-spinal cord barrier breakdown and pericyte reductions in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol.* 2013;125(1):111- 120. doi:10.1007/s00401-012-1039-8

Xie C, Zhou X, Zhu D, et al. CNS involvement in CMTX1 caused by a novel connexin 32 mutation: a 6-year follow-up in neuroimaging and nerve conduction. *Neurol Sci.* 2016;37(7):1063- 1070. doi:10.1007/s10072-016-2537-6

Xiong B, Li A, Lou Y, et al. Precise Cerebral Vascular Atlas in Stereotaxic Coordinates of Whole Mouse Brain. *Front Neuroanat.* 2017;11:128. Published 2017 Dec 19. doi:10.3389/fnana.2017.00128.