

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

PEDECIBA

ÁREA Biología

SUB-ÁREA: Biología Celular y Molecular

Gonzalo Rosso

Orientador: Dra. Alejandra Kun

Co-Orientadores: Prof. José Roberto Sotelo

Prof. Dr. Hans Oberleithner

Departamento de Proteínas y Ácidos Nucleicos, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE)

Facultad de Ciencias, Universidad de la República

2011

ABREVIATURAS

- CSI células de Schwann Inmaduras
- CS células de Schwann formadoras de mielina
- CMT enfermedad de Charcot-Marie-Tooth
- DAPI 4', 6'- diamidino-2 - fenilindol
- +/+ ratón de genotipo salvaje
- *Tr-J/+* ratón de genotipo mutante (Trembler-J)
- LB Lámina Basal
- MEC Matriz extracelular
- MFA Microscopía de Fuerza Atomica
- PMP-22 Proteína Periférica de Mielina
- PsSC células precursoras de Schwann
- SNP Sistema Nervioso Periférico
- SNC Sistema Nervioso Central
- SLI Incisura de Schmidt-Lantermann

ÍNDICE

1. RESUMEN

2. ANTECEDENTES

2.1 Células gliales del Sistema Nervioso Periférico: origen y desarrollo.

2.2 Relación entre axones y glías

2.2.1 Regulación de la supervivencia y maduración de las células de Schwann

2.2.2 Proceso de mielinización del Sistema Nervioso Periférico

2.2.3 Funciones y organización de la matriz extracelular y lámina basal de las células de Schwann

2.3 Estructura del axón periférico mielínico: “desde la morfología a la funcionalidad”

2.3.1 Nodos de Ranvier

2.3.2 Paranodos

2.3.3 Juxtaparanodos

2.3.4 Región Internodal

2.3.5 Incisuras de Schmidt-Lanterman

2.4 Neuropatías periféricas de origen genético: Charcot-Marie-Tooth (CMT)

2.4.1 Funciones conocidas de la proteína PMP-22

2.4.2 PMP-22 y su rol en la mielinización periférica

2.4.3 Modelo animal de neuropatía periférica Charcot-Marie-Tooth tipo 1A (CMT-1A): ratones Trembler-J y Trembler

2.5 Nuevos abordajes experimentales para el estudio del Sistema Nervioso Periférico: Microscopía de Fuerza Atómica (MFA)

2.5.1 Conceptos Básicos de Microscopía de Fuerza Atómica (MFA)

2.5.2 Modos de Operación del MFA

2.5.3 Aplicaciones de la MFA en el área de la neurobiología celular

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis general

3.2 Objetivo general

3.3 Objetivos específicos

3.4 Estrategia de Investigación

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Obtención de muestras biológicas y diferenciación fenotípica de ratones adultos normales y Trembler-J.

4.2 Preparación de Fibras aisladas de nervio ciático de ratones normales y Trembler-J para MFA.

4.3 Microscopía de Fuerza Atómica

4.3.1 Tratamiento con enzima Colagenasa

4.3.2 Análisis de rugosidad media de superficie (Ra): procesamiento de imágenes

4.3.3 Medidas de Elasticidad

4.4 Microscopía Confocal

4.4.1 Inmunocitoquímica

4.4.2 Anticuerpos y sondas fluorescentes

4.4.3 Cuantificación de intensidad promedio de fluorescencia en células de Schwann +/+ y Tr-J/+.

4.4.4 Análisis bioquímico

5. RESULTADOS

5.1 Las células de Schwann mutantes Trembler-J muestran alteraciones estructurales.

5.2 La proteína PMP-22 permanece retrasada y se acumula en las regiones perinucleares de las células de Schwann Tr-J/+.

5.3 Las fibras de nervio periférico de ratones adultos Tr-J/+ presentan alteraciones en la matriz extracelular y la lámina basal.

5.4 Alteración de la MEC en células de Schwann: tratamiento enzimático en fibras de nervio ciático con colagenasa.

5.5 Análisis de rugosidad de superficie (Ra) en fibras de nervio ciático de ratón adulto +/+ y Tr-J/+.

5.6 Presencia de colágeno tipo IV en las regiones perinucleares de células de Schwann Tr-J/+.

5.7 Las fibras Tr-J/+ presentan cambios en las propiedades mecánicas y en la organización del citoesqueleto de actina-F.

6. DISCUSIÓN

7. CONCLUSIONES

8. PERSPECTIVAS

9. REFERENCIAS

10. ANEXO

10.1 Análisis Bioquímico

10.2 Esquema de indentación de una punta de MFA en una célula

10.3 Cálculo de Módulo de Young Aparente

1. RESUMEN

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth de tipo 1A (CMT1A) es la neuropatía periférica desmielinizante más frecuente que afecta a seres humanos (frecuencia 1 en 2500) y está asociada a la duplicación de *pmp-22*, un gen que codifica la proteína periférica de mielina PMP-22. Mutaciones en *pmp-22* también han sido identificadas en familias humanas portadoras de CMT1A. PMP-22 es un glicoproteína con cuatro dominios transmembrana la cual es expresada en altos niveles por las células de Schwann mielinizantes y juega un rol clave en la formación, ensamblaje y mantenimiento de las vainas de mielina en el Sistema Nervioso Periférico. Los ratones Trembler-J (Tr-J) portan una mutación puntual en *pmp-22* (substitución de Leucina por Prolina en la posición 16 de PMP-22) por lo que son considerados como modelo animal válido para el estudio de CMT1A. La mutación Tr-J previene el normal plegamiento e inserción de PMP-22 en la mielina compacta de las células de Schwann. En el sistema nervioso periférico (SNP) la presencia de lámina basal y el correcto ensamblaje de la matriz extracelular cumplen funciones importantes. Estas son cruciales para la formación y mantenimiento de la mielina así como la correcta propagación del impulso nervioso y la organización del citoesqueleto de las células de Schwann. Un aspecto poco explorado en esta neuropatía es el gradual remodelamiento de la matriz extracelular (MEC) y la lámina basal (LB) durante el proceso de desmielinización de las fibras nerviosas. Estudios bioquímicos han demostrado una disminución de componentes de la MEC y la LB (fibronectina y colágeno tipo IV) en nervio ciático de ratones Tr-J. El colágeno IV es el componente ubicuo más abundante de la lámina basal en las fibras nerviosas periféricas y presenta una organización en forma de red. En este trabajo se estudió la mielinización y desmielinización del nervio ciático de ratones adultos normales y Trembler-J heterocigotos (Tr-J/+) por Microscopía de Fuerza Atómica (MFA) y Conofocal con el objetivo de caracterizar los cambios estructurales extracelulares e intracelulares en esta neuropatía. La MFA es una herramienta que permite obtener imágenes topográficas de la superficie de las células con muy alta resolución y evaluar sus propiedades biomecánicas (elasticidad y rigidez). Los resultados obtenidos mostraron diferencias en la organización de la MEC y la LB entre los genotipos normal y Tr-J/+ así como también en la distribución de PMP-22. Las imágenes topográficas por MFA indican que las fibras nerviosas de los ratones Tr-J/+ carecen de filamentos de colágeno de tipo-IV formadores de red sobre su superficie en comparación con las fibras normales. El análisis por microscopía confocal mostró una acumulación de colágeno de tipo-IV alrededor del núcleo de las células de Schwann Tr-J/+, que colocaliza parcialmente con PMP-22. Se estudió además las propiedades biomecánicas de las fibras nerviosas y se observó que las fibras de ratones con genotipo +/+ son más elásticas que las de ratones con genotipo Tr-J/+, presentando valores de elasticidad de 4.5MPa (n=8) y 3.3MPa (n=8), respectivamente. Análisis complementarios por microscopía confocal y ensayos bioquímicos mostraron que ambos genotipos presentan además diferencias en la organización y expresión de componentes del citoesqueleto (actina y tubulina) de las células de Schwann y del axón. La investigación desarrollada en esta Tesis de Maestría, indica que la MFA es una herramienta valiosa para el estudio de aspectos estructurales y fisiológicos concernientes a la relación entre glías y axones en fibras nerviosas periféricas en condiciones normales y patológicas y potencialmente relevantes en el diagnóstico de neuropatías periféricas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Células gliales del Sistema Nervioso Periférico: origen y desarrollo.

Durante el desarrollo embrionario, las células gliales del Sistema Nervioso Periférico (SNP), tanto mielinizantes como no-mielinizantes son generadas a partir de las células de la cresta neural. De las células madre de la cresta neural derivan varios tipos celulares tales como las células precursoras de Schwann (PsSC, por sus siglas en inglés) las cuales mantienen contacto íntimo con los axones espinales, las células satélite las cuales se encuentran asociadas a los cuerpos neuronales en los ganglios sensoriales y las "Boundary Cup cells" localizadas a nivel de la médula espinal en zonas de entrada y salida de las raíces dorsales y ventrales, respectivamente (Bron et al., 2007). El período embrionario de gliogénesis involucra en primer lugar la generación de las PsSC las cuales conforman la glía embrionaria (E14-15 en nervios de rata y E12-13 en ratón) y células de Schwann inmaduras (CSI) las cuales se desarrollan a partir de estas (días E15-17 en ratas y E13-15 en ratón). La subsecuente generación pos-natal de las células de Schwann (CS) mielinizantes y no-mielinizantes a partir de CSI involucra el cese de la proliferación y la resistencia a la muerte celular. El crecimiento inicial de los nervios periféricos consiste en la emisión de prolongaciones axonales (hasta llegar a los tejidos específicos) y es acompañado por el íntimo contacto entre estos y las PsCS. La característica post-natal de las CSI es determinada al azar por los axones que establecen contacto íntimo con estas células. De esta forma, la mielinización es selectivamente activada en aquellas células que envuelven axones de gran diámetro. Por razones que todavía se desconocen, únicamente los axones de calibre ($> 1\mu\text{m}$) son envainados por CS mielinizantes, mientras que axones de menor diámetro son envainados por CS no-mielinizantes. La razón fisiológica de este aparente umbral es que el modo saltatorio de conducción podría no conferir tasas de activación significativas en la transmisión del impulso nervioso en fibras de pequeño calibre (Bunge 1993b; Garbay et al. 2000; Jessen and Mirsky 2002; Lobsiger et al. 2002; Corfas et al. 2004; Sherman and Brophy 2005). La sucesión de eventos que conduce a la formación del linaje de las CS puede ser interpretada en tres etapas de transición representadas en la Figura 1.

(1) Transición de las células madre migratorias de la cresta neural hacia la formación de PsSC. (2) Transición desde las PsSC hacia la formación de las CSI. (3) Transición desde células inmaduras a células de Schwann maduras pro-mielinizantes y mielinizantes o a células de Schwann no-mielinizantes.

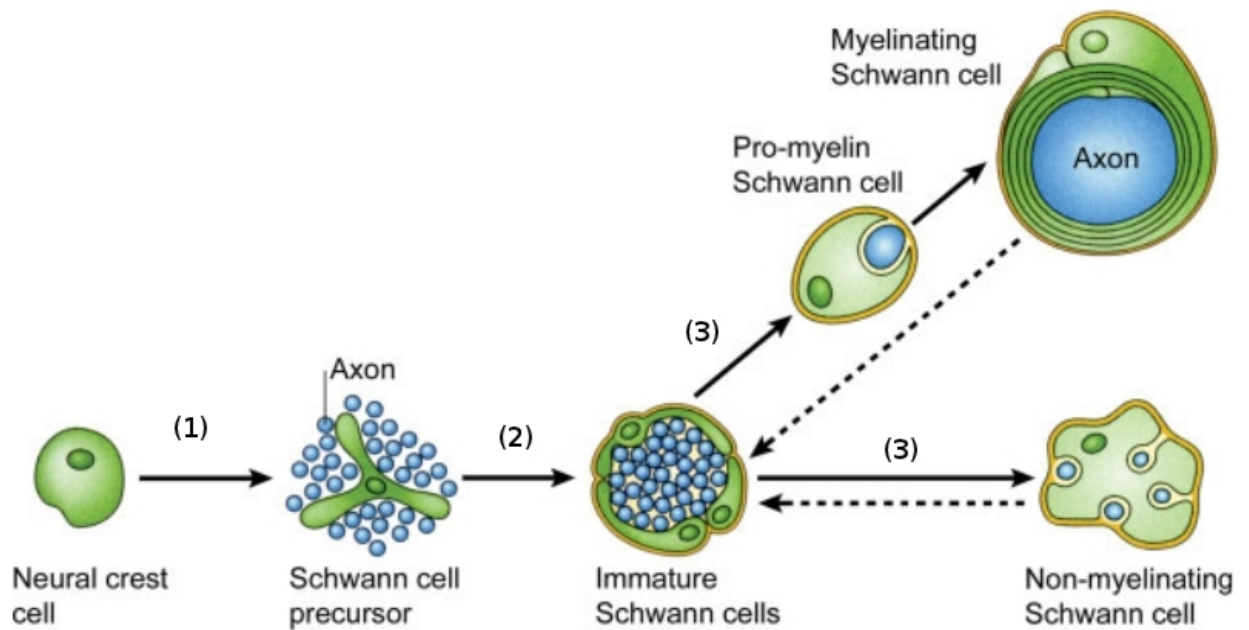


Figura 1. Linaje de las Células de Schwann. Ilustración esquemática representando la transición y tipos celulares involucrados en la formación, desarrollo y maduración de las células de Schwann. Las líneas punteadas representan fases en las cuales se puede revertir el fenotipo. La fase embrionaria del desarrollo involucra tres tipos de poblaciones celulares. Primero, células migratorias de la cresta neural. Segundo, células precursoras de Schwann (PsCS). Tercero, células de Schwann inmaduras (CSI), las cuales poseen el mismo potencial de desarrollo, quedando determinado por el tipo de asociación con los axones los cuales establecen contacto. Estas últimas se desarrollan formando células de Schwann mielinizantes y no-mielinizantes. (Ilustración tomada y modificada de Jessen y Myrsky 2008).

Cabe mencionar que todos estos eventos de transición celular de la glía son estrictamente dependientes de factores tróficos y de supervivencia, mitógenos y señales de diferenciación celular emitidas por los axones con los cuales se encuentran en asociación.

Una característica particular de las CS maduras mielinizantes y no-mielinizantes, es su capacidad de revertir su fenotipo en respuesta a la injuria o daño celular transformándose en CSI. Esta notable propiedad le confiere una plasticidad celular importante a las CS, pudiendo demielinizar y remielinizar axones afectados o dañados, un mecanismo observado frecuentemente asociado a patologías neurodegenerativas. Por otro lado, únicamente el periodo de transición desde las PsSC hacia CSI es irreversible. Las células de la cresta neural, las PsSC y las CSI proliferan muy rápidamente y solamente la llegada al estadio final de mielinización o no-mielinización es el único paso en la diferenciación de todo el linaje que se encuentra claramente ligado a una salida del ciclo celular (Jessen y Mirsky, 2008).

Existen una serie de marcadores moleculares asociados a los distintos estadios de diferenciación. Estos son usados para determinar y caracterizar cada uno de los estadios del linaje de las CS (Figura 2).

Este tipo de marcadores pueden clasificarse en 5 grupos:

- (1) Los que se encuentran presentes en todas las etapas del desarrollo (Ejemplo: proteína SOX10, (Kuhlbrodt et al., 1998).
- (2) Los que se expresan en las células de la cresta neural y PsSC, pero no en las CSI (Ejemplo: Activator protein 2 α , AP2 α por su nombre en inglés)
- (3) Los expresados únicamente por PsSC (Ejemplo: Cadherin 19) (Jessen y Mirsky, 2005).
- (4) Los expresados únicamente en las PsSC y las CSI, pero no en las células migratorias de la cresta neural (Ejemplo: Brain fibrillary acidic protein, BFABP por sus siglas en inglés).
- (5) Los presentes en las CSI pero ausentes, o en bajos niveles en PsSC (Ejemplo: GFAP o S100) (Jessen y Mirsky, 2005).

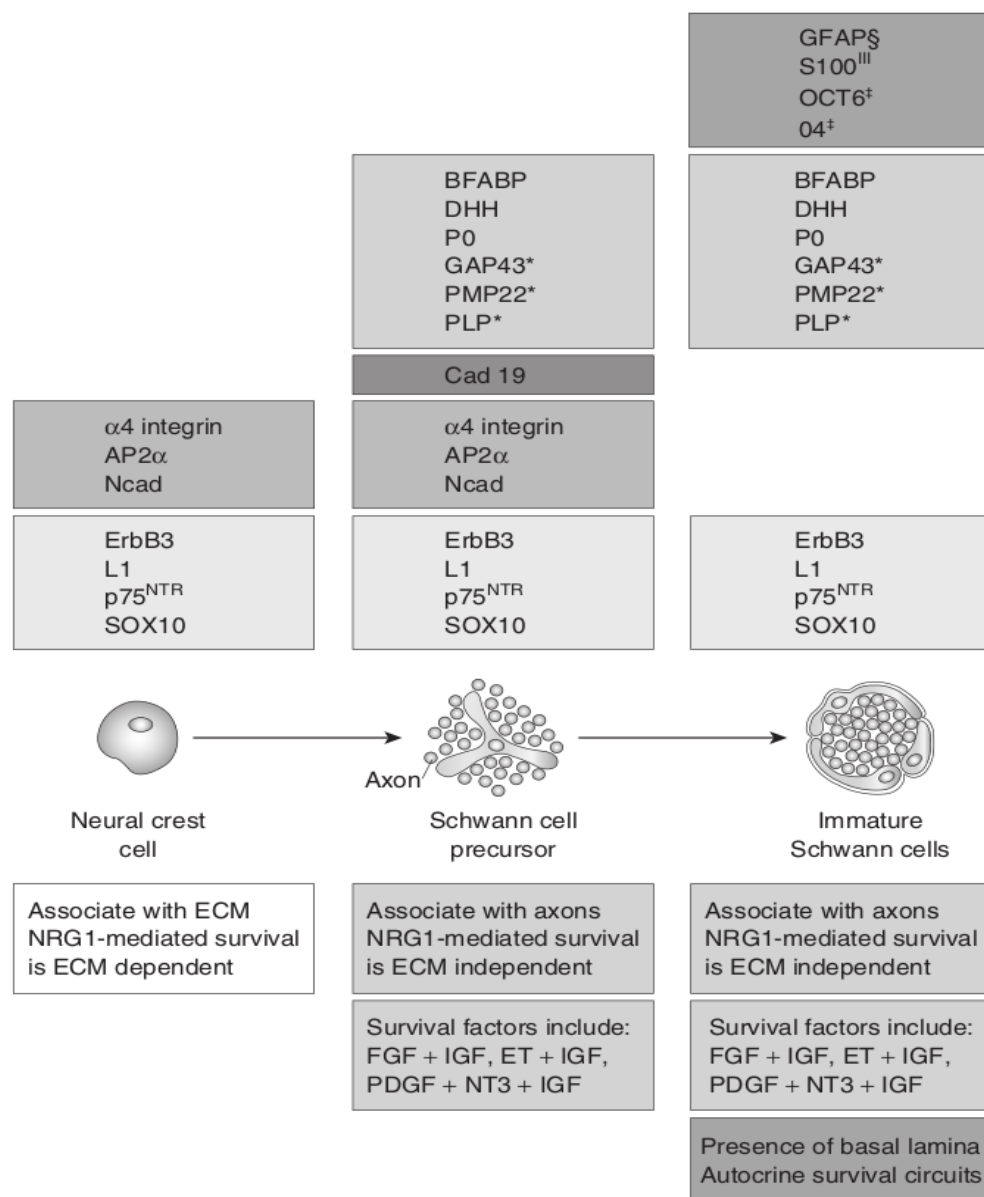


Figura 2. Perfil molecular y fenotípico del linaje de las células de Schwann durante el desarrollo embrionario. Los recuadros superiores indican cambios en los perfiles de expresión génica que transcurren a lo largo del desarrollo. Cada estadio del linaje involucra relaciones características con los

tejidos que los rodean así como también distintas propiedades en cuanto a la señalización celular (recuadros de abajo). Las células de la cresta neural migran a través de la matriz extracelular mientras que las PsSC y las CS se encuentran embebidos entre las neuronas (axones) con mínimos espacios extracelulares. La lamina basal se encuentra ausente en las células migratorias de la cresta neural y en PsSC, pero aparece en las CSI mielinizantes como no-mielinizantes. Las CSI poseen circuitos autocrinos de supervivencia los cuales se encuentran ausentes desde las PsSC. *(Imagen tomada de Jessen and Mirsky 2005).*

Por otra parte, existen otras diferencias entre las células que forman este linaje. Primero, únicamente las PsSC y las CSI se encuentran en asociación con los axones, en contraste a lo que ocurre con las células migratorias de la cresta neural. Segundo, las PsSC y las células migratorias de la cresta neural muestran numerosas diferencias en respuesta a factores de supervivencia. Tercero, a nivel morfológico es la presencia de lámina basal en las CSI, mientras que ésta está ausente en las PsSC y migratorias. Cuarto, las CS poseen la capacidad de asegurar y reforzar su propia supervivencia a través de la ayuda de circuitos y mecanismos de regulación autócrinos. Estos mecanismos autocrinos de regulación se encuentran ausentes en las PsSC, lo cual requiere de parte de éstas una completa dependencia de señales de supervivencia provenientes desde los axones. Este tipo de señales probablemente se encuentran mediadas en su mayoría por la molécula neuregulina I beta (NRG β , ver más adelante).

Finalmente, una característica importante de las CS ocurre en respuesta a la injuria del nervio, en donde estas generan un ambiente propenso que permite la regeneración axonal. Los mecanismos autócrinos que conducen a las CS a sobrevivir incluso en ausencia de contacto axonal junto con la dramática respuesta de éstas a la injuria del nervio, establecen las bases de la regeneración y reparación de los nervios en el SNP.

2.2 Relación entre axones y glías

2.2.1 Regulación de la supervivencia y maduración de las células de Schwann.

A lo largo del desarrollo se genera una comunicación axón-glía por medio de señales que involucran la regulación de mecanismos de supervivencia y diferenciación de estos tipos celulares. La supervivencia de las PsSC es estrictamente dependiente de señales químicas provenientes del axón, mientras que la supervivencia de las CSI es independiente de señales axonales en un mecanismo llamado "bucle de supervivencia" ("survival loop" por su nombre en inglés) (Figura 3).

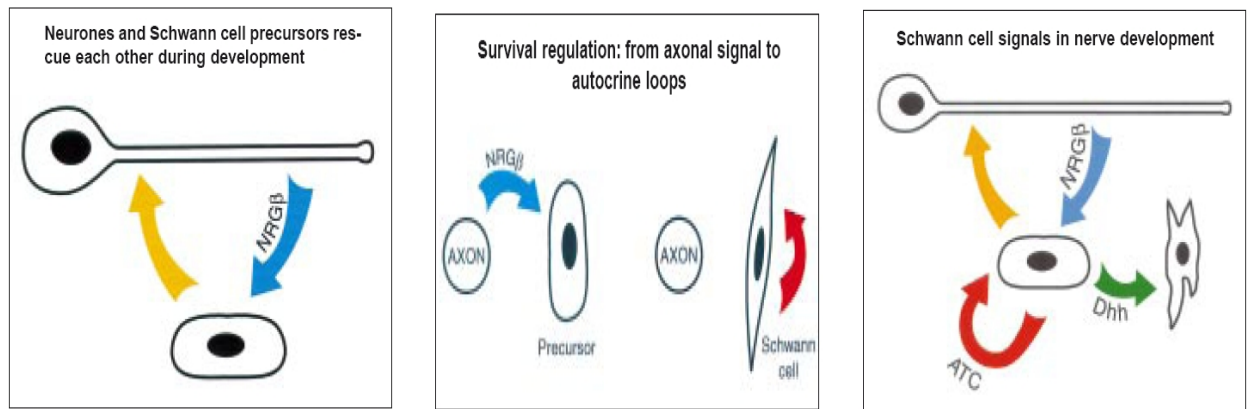


Figura 3. Señales de supervivencia entre axones y células gliales durante el desarrollo del SNP.

Izquierda - Esquema hipotético mostrando como el número de neuronas en desarrollo y células gliales esta reguladas por señales reciprocas de supervivencia. No está aún establecida la identidad molecular (flecha amarilla) de la señal derivada de las células gliales de supervivencia neuronal. Las PsSC mantienen su supervivencia por la señal neuronal neuregulina I β (NRG β), flecha azul). *Centro* - A medida que avanza el desarrollo ocurre un cambio en la procedencia de las señales de supervivencia. En principio, estas son provenientes exclusivamente del axón (NRG β flecha azul) y luego se establecen circuitos "loops" autocrinos de señalización (desde PsSC y hacia la generación de la CS). *Derecha* - Señales autocrinas (ATC) secretadas por las CS: (a) mantienen su propia supervivencia (flecha roja), (b) señales de supervivencia hacia el axón (flecha amarilla) y de supervivencia (Dhh: Desert hedgehog, flecha verde) que ayudan a la organización del perineuro que rodea los fascículos nerviosos. (Imágenes tomadas de R. Myrsky & K.R. Jessen: The neurobiology of Schwann cells 1999).

Ciertos estudios indican que es una única señal por intermedio de la molécula neuregulina 1 β la que tendría un rol importante en la supervivencia y maduración de las PsSC y el avance hacia las siguientes estadios de maduración del linaje de las CS (Birchmeier y Nave 2008). Actualmente existe una fuerte evidencia de que la isoforma β de la neuregulina promueve la supervivencia de PsSC *in vitro* fomentando además la diferenciación hacia CS maduras. Por otro lado, la acción de la señal secretada por neuronas simpáticas en cultivo que promueven la supervivencia de las PsSC y la diferenciación es bloqueada por una proteína híbrida soluble que contiene un dominio extracelular de unión al receptor ErbB4, un receptor de la neuregulina-1 de muy alta afinidad expresado por las CS (Birchmeier y Nave 2008). Algunos autores resaltan la capacidad de los receptores ErbE3-ErbB4 más relevante respecto a la unión a neuregulina-1 (Nave y Salzer, 2006). La unión de neuregulina-1 al complejo receptor ErbE3-ErbB4 induce la formación de un heterodímero que conduce a su fosforilación y el posterior reclutamiento de moléculas con dominios (SH3) que amplifican la activación de la señal que promueven la supervivencia. Algunos investigadores han señalado que son en sí mismos los niveles de expresión axonal de neuregulina-1, más que el calibre axonal en sí, el factor clave e instructivo del proceso de mielinización. La expresión de neuregulina-1 de tipo III en la superficie de los axones se encuentra en relación con el envaine de los axones y su característica mielínica. Por otro lado, las neuronas autónomas no-mielinizantes expresan bajos niveles de neuregulina-1 tipo III en la superficie del axón (Nave y Salzer, 2006).

Los mecanismos de auto-supervivencia existentes en la célula glial, son cruciales para el mantenimiento de las CS en ausencia de contacto axonal: por ejemplo durante la degeneración axonal (Grinspan et al. 1996; Trachtenberg & Thompson, 1996; Meier et al. 1999). Algunas moléculas y receptores han sido identificadas en el

mecanismo de "bucle de supervivencia", tales como IGF-2, neurotrofina-3 (NT3) y el factor de crecimiento plaquetario (platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB)). Este cambio en los mecanismos de supervivencia posee varios sentidos biológicos. La dependencia de asociación entre las PsSC con los axones confiere cierta eficacia biológica ya que podría emparejar el número de PsSC que están en relación con los axones en cada fibra o paquete. Además, este mecanismo podría promover que aquellos precursores que se encuentran "rezagados" o simplemente alejados de los axones en posiciones inapropiadas no sobrevivan (Jessen y Mirsky, 1997).

2.2.2 Proceso de mielinización del Sistema Nervioso Periférico

Durante el desarrollo las CS comienzan a proliferar, migrar y rodear a los paquetes de axones. El punto final del desarrollo de las CS es la formación de células mielinizantes y no-mielinizantes rodeando axones de gran diámetro en el SNP. Una vez que estos axones son rodeados por las CS, moléculas de la matriz extracelular son depositadas y organizadas en una lámina basal que rodea a cada CS y el paquete axonal. Cada CS luego selecciona un axón individual del paquete de axones a través de un proceso llamado de selección radial ("radial sorting" por su nombre en inglés, Figura 4A) que por precede al inicio de la mielinización (Figura 4B).

A medida que avanza el proceso de mielinización las CS comienzan a enrollarse formando múltiples vueltas sobre el axón. El siguiente paso del proceso es la compactación de la mielina que tiene como desenlace final la formación de la típica estructura multilaminar. Las CS mielinizantes polarizan sus superficies de membrana en dominios molecular y funcionalmente distintos (Trapp et al., 1995). Inicialmente, existen dos regiones membranosas o dominios principales bien caracterizados a nivel ultraestructural. Uno es la membrana plasmática abaxonal, mas externa, la cual interacciona con la lámina basal y el medio externo. Otro es la membrana adaxonal o también llamada periaxonal, que se encuentra en contacto directo con la superficie del axón. La mielinización es iniciada por una primer vuelta de la envoltura espiral de las membranas de la CS alrededor del axón formando el mesaxón interno. Las membranas del mesaxón conectan las membranas periaxonal y abaxonal y son ultraestructuralmente caracterizadas por una brecha de 12-14nm de espesor entre las hojas extracelulares y citoplasmáticas de la CS (Trapp & Quarles, 1982). Una vez que el mesaxón forma un espiral sobre sí mismo entre 2 a 6 veces, varia la periodicidad de gran parte de la membrana mesaxonal y se convierte en mielina compacta; las hojas extracelulares se caracterizan por una brecha de 2.5nm de espesor y las hojas citoplasmáticas aparecen fusionadas (Peters et al., 1991; Yin et al., 2000).

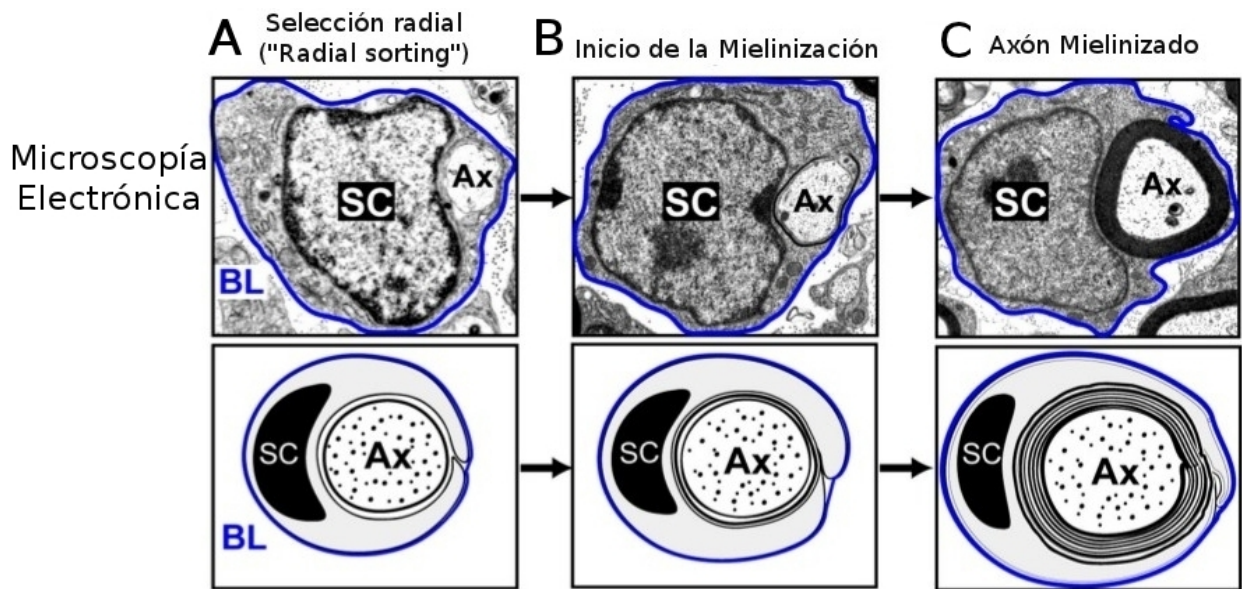


Figura 4. Proceso de mielinización del Sistema Nervioso Periférico - Ilustración de los procesos celulares durante el desarrollo de las Células de Schwann en el nervio ciático de ratón mediante microscopía electrónica (imágenes superiores). Durante el desarrollo de los nervios periféricos las células de Schwann (SC) proliferan, migran y envainan los axones (Ax) durante el proceso denominado selección radial (A). Las células de Schwann comienzan a organizar la lámina basal (línea azul, BL), la cual rodea completamente a cada célula individual y su axón asociado. Luego de recibir las señales apropiadas del ambiente local, las células de Schwann comienzan a aislar a cada axón para luego iniciar el proceso de mielinización (B) que tiene como fin la formación del axón mielinizado (C). Los paneles inferiores representan de forma esquemática los eventos celulares mostrados en las microscopías electrónicas superiores.

Como veremos luego, las lamininas (proteínas de la matriz extracelular y la lámina basal) han sido estudiadas extensamente durante el desarrollo del SNP. Participan en múltiples procesos en las CS incluyendo la proliferación, la migración y la diferenciación (Feltri y Wrabetz, 2005). Aunque la interrupción de los procesos de señalización de las lamininas resulta en una gran cantidad de alteraciones patológicas, se ha señalado que la señalización de estas por intermedio del complejo $\alpha 6 \beta 1$ Integrina en las CS es necesario para la correcta selección radial (Bradley and Jenkinson, 1973; Feltri et al., 2002; Chen and Strickland, 2003; Previtali et al., 2003; Yang et al., 2005). Estos estudios han estimulado las discusiones sobre cómo y de qué manera un componente de la lámina basal en la superficie externa de las CS, es capaz de transmitir señales que influyen la selección radial, un proceso que, de forma dinámica, organiza y reestructura el interior y las superficies laterales de membrana de las CS.

Un evento clave durante el proceso de mielinización es que todas las moléculas de adhesión, canales iónicos y proteínas asociadas al citoesqueleto entre el contacto axón-glía están inicialmente expresadas de manera uniforme, pero se redistribuyen hacia distintas regiones o dominios a medida que avanza la mielinogénesis. Estos dominios son críticos para el funcionamiento de las fibras mielínicas así como también para la correcta propagación saltatoria de los potenciales de acción.

Concomitante con los cambios ocurridos en la periodicidad de las membranas del mesaxón y la formación de la mielina compacta, se producen cambios moleculares en las membranas mielínicas. Las membranas periaxonal y del mesaxón interno son enriquecidas por MAG (Myelin Associated Glycoprotein, por sus siglas en Inglés). Esta misma proteína no se detecta en la mielina compacta o en las membranas abaxonales de las CS mielinizantes (Peters et al., 1991) pero si en regiones adaxonales internodales y de mielina laxa como son las incisuras de Schmidt-Lanterman (Robertson, 1958; Gabriel & Allt, 1981; Hall & Williams, 1970; Peters et al., 1991), las cuales ofician de indicadores de una mielinización madura en cultivos *in vitro* de ganglios de la raíz dorsal (Päiväläinen et al., 2008).

La proteína P0, es el componente estructural mayoritario de la mielina compacta del SNP (Trapp et al., 1981) y pertenece a la familia de glicoproteínas del tipo I con un único dominio inmunoglobulina y una masa molecular de 30 kDa. Los mecanismos precisos mediante los cuales las membranas del mesaxón se convierten en mielina compacta son desconocidos, pero se cree que la inserción de P0 a la membrana y su consecuente unión homofílica en ambas orientaciones (cis y trans) es un evento clave de este proceso. Se postula que estas interacciones podrían excluir a la glicoproteína MAG de la mielina en estas regiones favoreciendo el proceso de compactación. MAG y P0 luego de ser sintetizadas se clasifican en vesículas transportadoras independientes a medida que salen de la red trans del aparato de Golgi (Trapp et al., 1995; Yin et al., 2000). Estas vesículas son transportadas a través del internodo de mielina en un mecanismo de desplazamiento dependiente de microtúbulos para ser insertadas directamente en el dominio apropiado de la membrana (Hall y Williams 1970). Este direccionamiento sitio-específico de P0 y MAG juega un rol importante en el establecimiento de la polaridad de la fibra mielínica y de la expansión de las membranas de la CS (Trapp et al., 1995).

Cambios en los niveles de expresión o en la distribución de alguno de los componentes moleculares de la mielina es capaz de perturbar su equilibrio estructural desencadenando procesos de desmielinización tales como los ocurridos en el síndrome de Charcoth-Marie-Tooth (Vallat et al., 2003, 2005). La organización polarizada del axón y su estado fisiológico se manifiesta no solo en la distribución de las proteínas de membrana sino también en un número de parámetros interrelacionados: el diámetro del axón, la organización del citoesqueleto, la tasa de transporte axonal y la distribución de organelos membranosos en el axoplasma (Salzer, 2003).

2.2.3 Funciones y organización de la matriz extracelular y lámina basal de las células de Schwann.

Las proteínas de la matriz extracelular (MEC) se integran en un sustrato sobre el cual se sostienen e integran diversos tipos celulares. Además de poseer un rol estructural importante, estas proteínas influyen el comportamiento celular por intermedio de su interacción con receptores específicos. Estos, proporcionan señales intracelulares que controlan respuestas tales como la proliferación, la supervivencia, la polarización y la morfogénesis (Aszodi et al., 2006). Ciertos estudios han demostrado

que la interacción de las CS con proteínas de la MEC es necesaria para el correcto ensamblaje y mielinización de los axones en el SNP (Aszodi et al., 2006).

Dentro de las proteínas más importantes que componen la MEC de las CS están las lamininas las cuales forman heterotrímeros de subunidades α , β y γ (Colognato and Yurchenco, 2000; Yin et al., 2003). Las lamininas cumplen tres roles esenciales en los mamíferos (Miner and Yurchenco, 2004): (1) brindan estructura a la membrana basal (Tabernero et al., 1998; Yurchenco et al., 2004); (2) proveen sitios de anclaje para las células vía proteínas de la superficie celular [ej: dystroglicanos (DS, por su silga en inglés)] (Henry and Campbell, 1996); y (3) actúan como ligandos de receptores celulares (ej: integrinas) promoviendo mecanismos de señalización celular que influyen el comportamiento y están vinculados a eventos de supervivencia (Schwartz, 2001). Particularmente, en el SNP se encuentran presentes la laminina 2 ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$), laminina 8 ($\alpha 4\beta 1\gamma 1$) y laminina 10 ($\alpha 5\beta 1\gamma 1$) (Feltri and Wrabetz, 2005) y estas juegan un rol importante en la mielinización de los axones por parte de las CS (Yu et al., 2007). Ciertos estudios *in vivo* han demostrado que mutaciones en el gen codifica la subunidad de laminina $\alpha 2$ causan neuropatías periféricas tanto en humanos (Helbling-Leclerc et al., 1995) como en ratones (Shorer et al., 1995; Sunada et al., 1995; Xu et al., 1994). Por otro lado, ratones "knock out" para el gen que codifica la subunidad de laminina $\gamma 1$ presentan una ausencia de otras lamininas y un fenotipo hipomielinizante severo caracterizado por temblores, debilidad muscular y parálisis de los miembros traseros (Yu et al., 2005). En cuanto a los receptores de las lamininas, las CS expresan varios tipos los cuales incluyen a las integrinas $\alpha 6\beta 1$ y $\alpha 6\beta 4$ así como también los DG (Previtali et al., 2003).

Los receptores DG están conformados por subunidades α y β las cuales son productos del mismo gen. En las CS mielinizantes ciertos hallazgos (Sherman et al., 2001) demostraron que la proteína asociada a Distroglican 2 (DRP2) y la molécula de periaxina forman un complejo con el receptor DG (Figura 5).

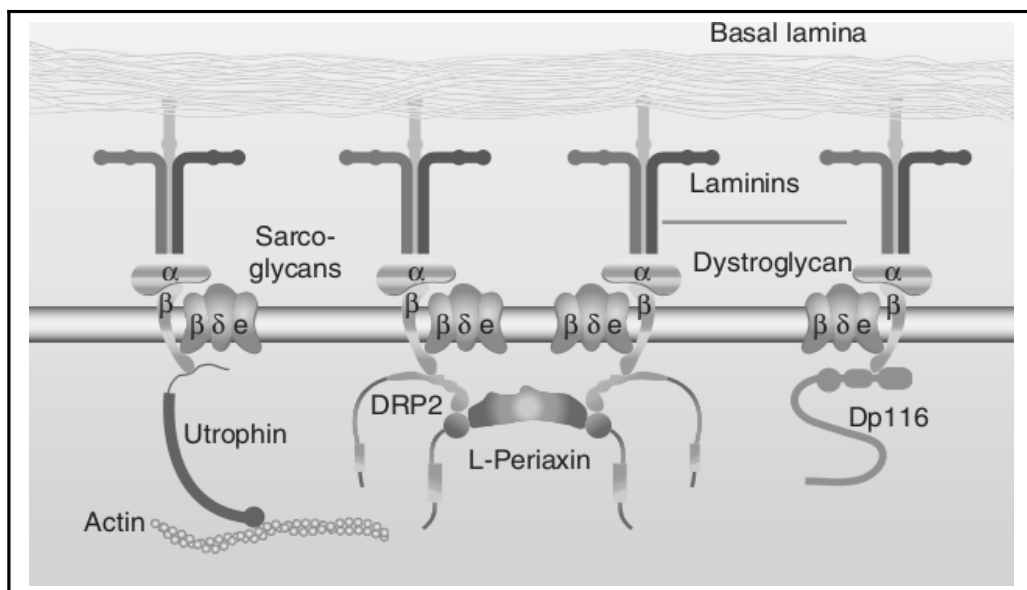


Figura 5. Organización molecular de la lámina basal y la matriz extracelular de las células de Schwann. El complejo dystroglican-distrofina (DG-DRP2) establece una conexión ente las moléculas de laminina de la lámina basal con el citoesqueleto de actina en las células de Schwann. La moléculas de α -dystroglican son extracelulares y unen las lamininas cuando están glicosiladas formando un complejo con

la molécula transmembrana β -dystroglican y con las subunidades $\beta\gamma\delta$ -sarcoglican. Intracelularmente, la molécula β -dystroglican probablemente forma tres diferentes complejos con las moléculas Utrophina, Dp116 o DPR2/periaxina. Imagen tomada del libro: The Biology of Schwann Cells, Aramati 2007.

Las moléculas de DPR2 se encuentran en el citoplasma de las CS yuxtapuestas a la vaina de mielina. Cabe destacar que además de los complejos ya mencionados, existen otros complejos moleculares estableciendo contactos con receptores DG, Dp116, L-periaxin y utrophina. La proteína L-periaxin es requerida para la formación de los complejos DG-DPR2 los cuales tienen un rol importante en el establecimiento de los contactos entre la MEC y el citoesqueleto de actina en las CS (Sherman et al., 2001). En CS carentes de L-periaxina se ha descrito interrupciones en la estructura de las Incisuras de Schmidt-Lanterman, eventualmente caracterizadas como estructuras de función nutritiva (Court et al., 2004).

Otro componente esencial de la MEC de las CS son las moléculas de colágeno. Las CS expresan tres clases generales de moléculas de colágeno: (1) moléculas de colágeno formadoras de fibras (tipos I, III y V); (2) moléculas de colágeno de la membrana basal (tipo IV); (3) moléculas híbridas con sitios de unión a colágeno (ej: gliomedin). Las moléculas de colágeno son proteínas estructurales requeridas para el normal ensamblaje y organización de la MEC de las CS (Chernousov et al., 1998). Las CS expresan además receptores de integrinas y de no-integrinas que pueden interactuar con moléculas de colágeno (Milner et al., 1997; Stewart et al., 1997). Las moléculas poseen la capacidad de regular ciertas funciones de las CS a través de señales intercelulares y se postula que podrían ser requeridas para la correcta mielinización de los axones. Una característica que distingue a las moléculas de colágeno es su dominio-estructura helicoidal formado por la asociación de tres polipéptidos que contienen secuencias repetidas ricas en prolina. En estas, cada tres residuos de prolina uno es de glicina (Prockop y Kivirikko, 1995). Las moléculas de colágeno formadoras de fibras del endoneuro del nervio ciático de ratón aparecen primeramente alrededor de los 15 días de gestación (Osawa y Ide, 1986). Debido a que no existen fibroblastos en el endoneuro durante este periodo de gestación, estas fibras parecen ser sintetizadas por las CSI las cuales están en asociación con los axones embrionarios. Esto es consistente con estudios derivados de células en cultivo las cuales demuestran que las CSI son productoras activas de colágeno (Bunge et al., 1980; Chernousov et al., 1998, 2000). Las fibras de colágeno en el endoneuro poseen un diámetro de aproximadamente 250 Å, son más finas que las fibras de colágeno del epineuro y están en íntima asociación con la superficie externa de la membrana basal que rodea las CS y su correspondiente axón (Osawa y Ide, 1986). La mayoría de las moléculas de colágeno son heterotrimeros que consisten en dos o tres cadenas α diferentes (ej: $\alpha 1(I)_2/\alpha 2(I)_1$ para el tipo I; $\alpha 1(V)_2/\alpha 2(V)_1$ para el tipo V). Los dominios no-colágeno C-terminales inician y guían el ensamblaje de la triple hélice desde los 3 polipeptidos de colágeno por una asociación no-covalente mediada por un dominio de reconocimiento específico en cada región C-terminal (Khoshnoodi et al., 2006). Luego de completarse el ensamblaje del trímero, las regiones C-terminales y N-terminales no-colágeno son removidas en las moléculas de colágeno tipo-I y tipo-III por endoproteasas específicas y no forman parte de las moléculas de colágeno maduras. En contraste, la región N-terminal no-colágeno del tipo-V es retenida en la

conformación madura. Los colágenos de tipo I/III se presentan exclusivamente en forma de fibras de pequeño diámetro asociadas a la cara externa de la lámina basal de las CS (Osawa y Ide, 1986) mientras que el tipo-V colocaliza con los colágenos de tipo-I/III en estas fibras y además está presente en la lámina basal que rodea las CS mielinizantes (Chernousov et al., 2006). En las CS maduras formadoras de mielina la localización del colágeno tipo-V se concentra en las regiones perinodales de las MEC (Melendez-Vasquez et al., 2005).

El colágeno de tipo-IV es un miembro de la familia de moléculas de colágeno formadoras de redes y un componente ubicuo de las membranas basales (hojas de la matriz que se encuentra por debajo de las células epiteliales o que rodean a las CS y su axones asociados). Las moléculas de colágeno tipo-IV son las más abundantes en el SNP. Son heterotrímeros con la composición $(\alpha 1(IV)_2/\alpha 2(IV)_1$ (Miner and Sanes, 1994). Estas moléculas de colágeno forman una extendida red producto de la asociación de los dominios no-colágeno C-terminales y la oligomerización de los dominios no-colágeno N-terminales. Los máximos productores de moléculas de colágeno, laminina y fibronectina en las nervios periféricos de ratón adulto son las CS y los fibroblastos (Obremski et al., 1993a, 1993b) siendo estas moléculas esenciales para el correcto ensamblaje y formación de la MEC en las CS.

Poco se conoce acerca de los cambios que acontecen en la MEC de los nervios periféricos durante el desarrollo de las neuropatías periféricas y en especial durante el síndrome Charcot-Marie-Tooth. Por consiguiente, un importante e inexplorado aspecto de este tipo de enfermedades son los cambios graduales y la remodelación que ocurre a nivel de la MEC en las fibras nerviosas. Algunas evidencias han sido reportadas respecto a variaciones en los niveles de expresión de componentes de la MEC de las CS en ratones Trembler-J. En las fibras nerviosas de ratones Trembler-J adultos por técnicas de Microscopia de Fluorescencia y western-blott se determinó una disminución de los niveles de moléculas de la MEC tales como el colágeno tipo IV y fibronectina respecto a las fibras normales, mientras que los niveles de laminina permanecieron invariables (Misko et al., 2002).

En las neuropatías periféricas los componentes de la MEC de las fibras del SNP y la función de la lámina basal no han sido completamente elucidados. En la piel y los tendones estas fibras proporcionan fuerza mecánica y flexibilidad a estos tejidos. Debido a las fuerzas mecánicas que deben soportar los nervios periféricos durante los ciclos de contracción muscular se piensa que las moléculas de colágeno formadoras de fibras podrían tener una función similar en el SNP.

2.3 Estructura del axón periférico mielínico: de la morfología a la funcionalidad.

El territorio en el cual se extiende, en íntimo contacto, una CS a lo largo del axón es denominado internodo. Dentro de este, existen dominios específicos caracterizados por la presencia de determinados complejos moleculares que definen cada compartimiento celular (Figura 6).

El establecimiento de la polaridad celular en las fibras nerviosas del SNP requiere de interacciones extracelulares e intracelulares las cuales generan asimetrías

en las membranas tanto en la CS como en el axón. Estas además, son enriquecidas en moléculas de adhesión en sitios donde se realiza el contacto entre ambas células. Este tipo de mecanismos de distribución son promovidos por selectivos procesos de recambio proteico y localización y se encuentran estabilizados mediante interacciones moleculares entre complejos extracelulares e intracelulares (Mostov et al., 2003). En términos morfológicos y en relación a la mielina, el internodo puede dividirse en dos dominios: uno de mielina compacta y otro de mielina no compacta. Las regiones no compactas de la mielina en una misma CS son las incisuras de Schmidt-Lanterman y los paranodos. Ellos representan un porcentaje menor respecto a las regiones de mielina compacta. La mielina no compacta provee dominios citoplasmáticos gliales en los extremos del internodo (paranodo) y en el internodo (incisuras de Schmidt-Lanterman), siendo la región de más fluído contacto entre las zonas abaxonal mielínica y adaxonal de la CS.

Ambos tipos de mielina (compacta y no compacta) son caracterizados por composiciones proteicas únicas y específicas las cuales cumplen funciones importantes en el mantenimiento y correcto ensamblaje de las estructuras en condiciones normales. Alteraciones en los componentes proteicos, como el caso de mutaciones en genes específicos relacionados con proteínas estructurales (gliales o axonales) conllevan al desarrollo de neuropatías tanto a nivel del sistema nervioso central como del SNP.

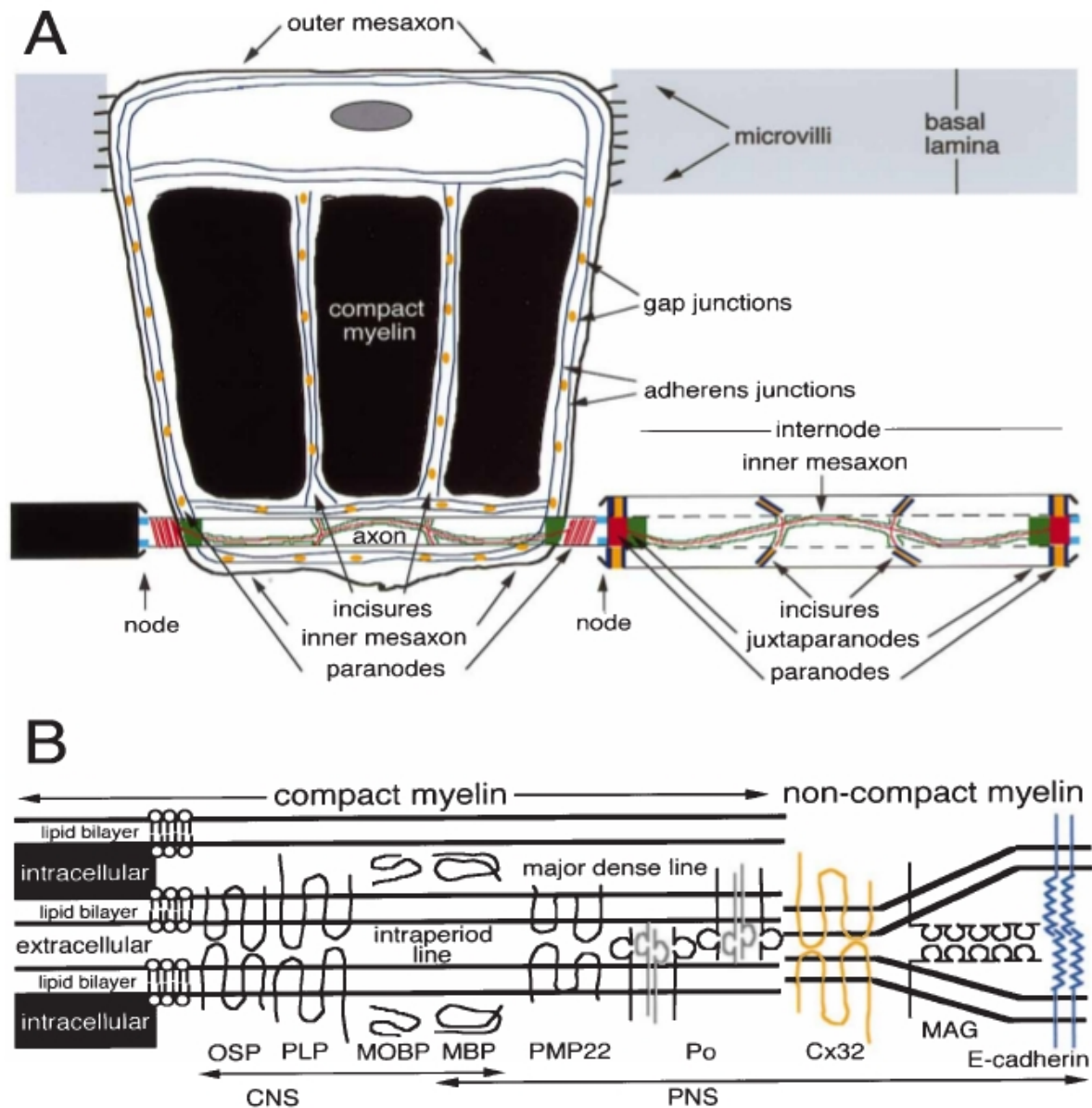


Figura 6. Organización del axón mielinado. (a) Dibujo representativo de una célula de Schwann desarrollada mostrando las regiones que conforman la mielina compacta y no compacta. Se muestra la distribución de las uniones "tight junctions" como dos líneas contiguas (verde); estas forman un cinturón circunferencial y se encuentran también en las Incisuras. Las uniones Gap (ovalito naranja) son encontradas entre las uniones "tight junctions" y son más abundantes en las regiones internas de las Incisuras y paranodos. Las uniones adherentes (ovalito púrpura) son más numerosas en las regiones externas de las Incisuras y paranodos. La región nodal, paranodal y juxtaparanodal de la membrana axonal son representadas en azul, rojo y verde respectivamente. (b) Proteínas de la mielina compacta y no compacta (Modificado de Scherer y Arroyo 2002).

La mayoría de los componentes estructurales y funcionales de la mielina son sintetizados en el citoplasma perinuclear de la CS. Las Incisuras de Schmidt-Lanterman pueden considerarse canales citoplasmáticos espiralados que se extienden desde las superficies abaxoniales hacia las regiones más internas. Son necesarios para expandir y mantener la estructura mielínica del internodo y para comunicar las regiones perimiélicas gliales entre sí. Estos canales contienen componentes del citoesqueleto (tubulina, actina, viementina) que ofician como vías para el transporte de vesículas (proteínas y ácidos nucleicos) a través de estas estructuras (Kun et al., 2007, 2011).

2.3.1 Nodos de Ranvier

Los nodos de Ranvier son regiones de las fibras mielínicas en donde dos CS contiguas emiten prolongaciones en forma de microvellocidades las cuales establecen contacto íntimo con la región nodal del axón. Este contacto es mediado por moléculas de reconocimiento ubicadas en ambas células (axones y glías) (Figura 7, imagen izquierda). Tanto en el SNP como en el SNC, los nodos cumplen idénticas funciones, sin embargo no son morfológicamente idénticos. En el SNP los dominios axonales nodales están cubiertos por glías mielinizantes, en tanto que en el SNC los nodos no están cubiertos por los oligodendrocitos, sino por otras células, los astrocitos perinodales. Además, cada fibra mielinada en el SNP formada por el axón y sus CS, están rodeados de una lámina basal haciendo de ella una unidad funcional y estructural única. En el SNC la lámina basal no existe.

El diámetro axonal a la altura del nodo usualmente difiere con respecto a las regiones paranodales e internodales y presenta una leve constricción. A este nivel se acumulan una mayor cantidad de mitocondrias y vesículas. Los neurofilamentos se encuentran más empaquetados y es debido a una menor fosforilación de sus cadenas (pesada y mediana), las cuales además determinan una disminución del calibre axonal y un tránsito axonal más lento (Mata et al., 1992).

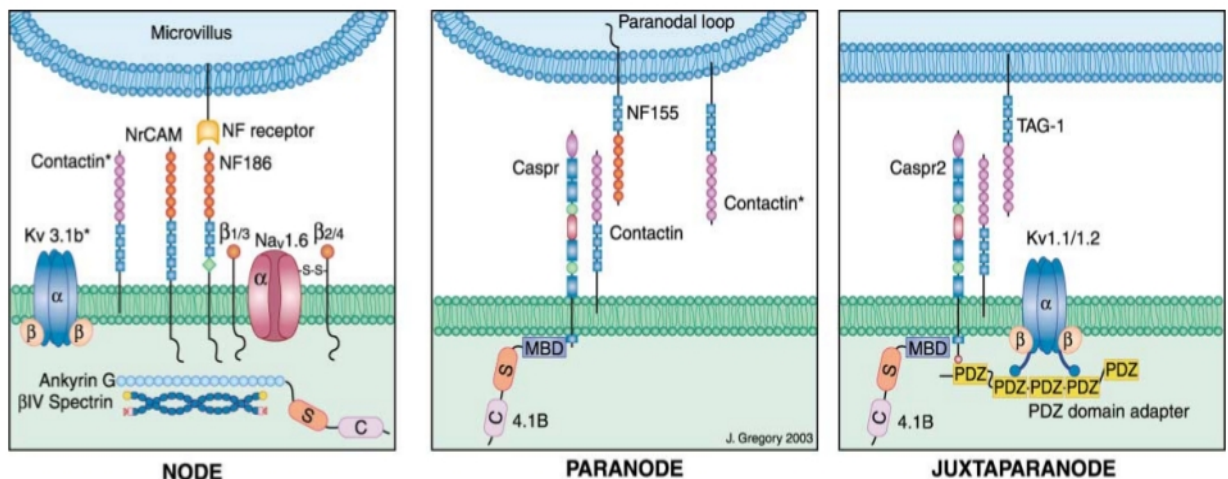


Figura 7. Organización molecular de las regiones nodales, paranodales y juxtaparanodales de las fibras nerviosas periféricas. Imagen izquierda: Nodos; Imagen central: Paranodos y los Juxtaparanodos (Imagen derecha) en el Sistema Nervioso Periférico. En cada figura se representan los complejos de moléculas y sus interacciones que caracterizan a cada una de estas estructuras en el nervio periférico maduro. (Imagen tomada de Salzer, 2003)

Los nodos de Ranvier se caracterizan por estar enriquecidos en canales de Na^+ voltaje dependientes. Estos canales son complejos hetero-triméricos compuestos por una larga subunidad α pre-formada y dos subunidades β transmembrana. Los diferentes canales de Na^+ son funcionalmente similares pero presentan diferencias a nivel de su cinética de activación (Yu y Catterall, 2003). Los canales de Nav1.6 son los predominantes en los nodos de las fibras mielínicas de vertebrados adultos tanto en el SNC como en el SNP (Caldwell et al., 2000; Tzoumaka et al., 2000). La subunidad α presenta una transición molecular durante la ontogenia en los vertebrados (Boiko et al.,

2001). La isoforma del canal de Nav1.2 es expresada durante el desarrollo embrionario y luego es remplazada a medida que avanza el desarrollo por la conformación Nav1.6. Esta isoforma está presente en los nodos de los individuos adultos en el SNP, y en la mayoría de los nodos adultos en el SNC (Boiko et al., 2001). Cabe mencionar que una porción de estos nodos del SNC adulto también continúan expresando la conformación Nav1.2 y Nav1.8 (Arroyo et al., 2002).

Con respecto a la formación de los nodos de Ranvier durante el desarrollo, ésta es inicialmente algo difusa según la distribución de las moléculas que conforman por último la estructura madura. Los nodos inicialmente se forman como complejos difusos asociados a los extremos de las CS para luego fusionarse y condensarse (Vabnick y Shrager, 1998) (Figura 8).

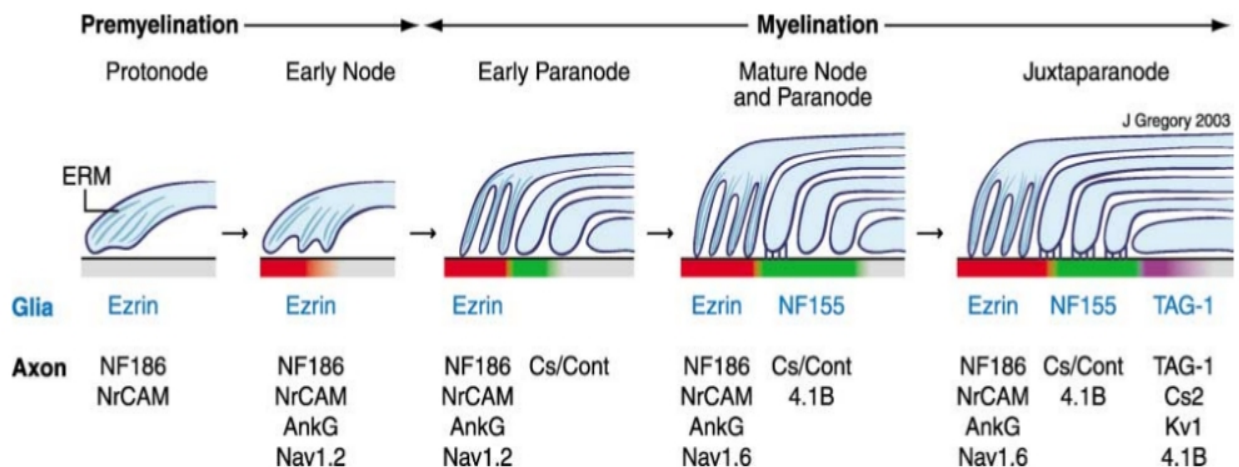


Figura 8. Maduración de los nodos de Ranvier periféricos durante la mielinización. El dibujo corresponde a la maduración de los nodos de Ranvier y los diferentes tipos de moléculas y complejos moleculares que caracterizan los estadios de pre-mielinización y mielinización en el Sistema Nervioso Periférico (Imagen tomada de Poliak et al., 2001).

El ensamblaje de los dominios que conlleva a la formación de los nodos se produce de forma secuencial y ordenada a medida que avanza la mielinización desde la formación del proto-nodo hasta alcanzar la madurez del paranodo y los juxtaparanodos (Melendez-Vasquez et al., 2001; Poliak et al., 2001). Un componente clave en la formación del nodo es la proteína multivalente ankirina G (AnkG) (Bennet y Lambert, 1999). Esta molécula se encuentra implicada en la organización de la membrana del citoesqueleto y es fundamental para alcanzar la polaridad característica de esta estructura (Mohler et al., 2002). Además, la ankirina G se une directamente a las subunidades α de los canales de Na^+ vía un motivo conservado en el segundo loop citoplasmático (Garrido et al., 2003; Lemaillet et al., 2003) y también lo hace a la β IV-spectrina, una isoforma que se localiza en los segmentos iniciales del axón y en los nodos (Berghs et al., 2000; Komada y Soriano, 2002). Existen además de estas, una gran variedad de proteínas que se localizan en el nodo y que interaccionan a través de motivos conservados con la ankirina G, incluidas las moléculas de adhesión neural Nr-CAM y la isoforma de 186kDa de la neurofascina (Hortsch, 2000; Bennett & Lambert, 1999).

2.3.2 Paranodos

Los loops paranodales representan los extremos laterales del internodo mielínico. Los mismos consisten en una orientación longitudinal espiralada del citoplasma de la CS el cual se encuentra adherido al axón por complejos de anclaje de tipo unión septada y entre si por uniones de tipo hemi-desmosoma, gap (Salzer, 2003). A medida que la mielina compacta se aproxima al nodo, las Major Dense Lines (MDLs) se abren y reordenan su citoplasma. Las membranas extracelulares de las láminas vecinas se abren formando los denominados "loops paranodales" que se encuentran separados uno de otro por aproximadamente 12 a 14nm. El arreglo de los "loops paranodales" en las fibras mielínicas ocurre de manera ordenada con la llegada de las láminas de mielina mas internas primero hacia la región nodal y por último las más externas, que se disponen más adyacentes al nodo. Dentro del espacio existente entre los loops paranodales y el axón se encuentra una región densa que se encarga de conectar las dos membranas, denominada "bandas transversales". Estas bandas densas representan uniones septadas y conforman el mayor aparato de adhesión entre la mielina y el axón. Las membranas paranodales y del axolema contienen moléculas intermembranosas que se disponen enfrentadas para anclar las dos membranas (Figura 7, imagen central). Los mayores componentes proteicos en esta región son: las moléculas de contactina y Caspr, las cuales se encuentran tanto en el axolema del SNC como en el SNP (Einheber et al., 1997; Menegoz et al., 1997; Rios et al., 2000). Estas moléculas funcionan como heterodímeros y se postula que podrían ensamblarse antes de la inserción en el axolema. Los loops paranodales contienen además la isoforma de neurofascina (NF155), la cual co-localiza y forma complejos con contactina/Caspr (Charles et al., 2002; Tait et al., 2000) y contactina formando parte de las uniones septadas (Poliak. La ausencia tanto de Caspr como contactina en ratones knockout resulta en la perdida de las uniones tipo septadas (Bhat et al., 2001; Boyle et al., 2001). Ciertas investigaciones sugieren que las uniones paranodales axo-gliales juegan un rol clave en la separación espacial y en la distribución de canales Na^+ y K^+ en el nodo de Ranvier, siendo los primeros los confinados a la región nodal y los segundos a la región juxtaparanodal.

2.3.3 Juxtaparanodos

Las regiones juxtaparanodales de las fibras mielínicas se encuentran adyacentes a los loops paranodales. Las regiones juxtaparanodales se caracterizan por la presencia de canales de potasio del tipo Kv1.1 y Kv1.2 (Rasband et al., 1998). Además, en esta región se encuentra presente una molécula homóloga de Caspr denominada Caspr2 (Figura 7, imagen derecha). Esta proteína se encuentra enriquecida en el axolema juxtaparanodal tanto en el SNC como en el SNP y se ha determinado por microscopía que su distribución co-localiza con los canales Kv1.1/1.2/ $\beta 2$ (Poliak et al., 1999). Caspr2 y Caspr poseen estructuras similares especialmente en la región extracelular, pero únicamente Caspr2 posee un dominio PDZ de unión a otras proteínas. Los canales Kv1.1 y Kv1.2 también poseen dominios PDZ y forman complejos con Caspr2, probablemente mediados por una proteína con múltiples sitios de unión PDZ adaptadora. La Glicoproteína transitoria axonal (TAG-1 por su sigla en inglés), se encuentra también en los juxtaparanodos a nivel de la membrana glial y

forma complejos en trans con Caspr2 (Poliak et al., 2003; Traka et al., 2003). A nivel del juxtapanodo, en la membrana glial también se encuentran presentes hemicanales de Connexina-29 los cuales se cree que juegan un rol en la remoción de iones K^+ en exceso hacia el espacio periaxonal (Altevogt et al., 2002). Los canales de potasio juxtapanodales parecen desempeñar un rol fisiológico importante en la excitabilidad de las fibras mielinizadas, aunque todavía esto sigue siendo un punto controversial. Esta idea es apoyada por ciertos hallazgos usando ratones knockout para el canal Kv1.1 donde se observó la generación anormal de impulsos cerca de la unión neuromuscular (Smart et al., 1998; Zhou et al., 1998b).

2.3.4 Región Internodal

Un internodo representa por definición el segmento de una fibra mielinizada por una única CS o por un oligodendrocito comprendido entre dos juxtapanodos. De forma aproximada, este segmento tiene en promedio de 200 micras pudiendo alcanzar varios cientos de micras de longitud en vertebrados de gran tamaño. Es posible determinar en fibras peñadas y teñidas con osmio, la presencia en el internodo de estructuras más translúcidas tales como las incisuras de Schmidt-Lanterman que atraviesan de forma radial la mielina compacta. El núcleo de la CS se dispone en la región internodal de la fibra mielínica por fuera de las vueltas de mielina que rodean al axón.

La membrana internodal axonal en fibras del SNP es organizada de forma coordinada con la vaina de mielina. La glicoproteína asociada a la mielina MAG, se encuentra enriquecida en las regiones abaxonales a lo largo del internodo de las CS así como también en las Incisuras de Schmidt-Lanterman (Xu et al., 2000). Estudios realizados por Microscopía Electrónica de criofractura demostraron que los internodos poseen una composición molecular similar a la región juxtapanodal (Stolinski & Breathnach, 1977; Stolinski et al., 1981, 1985). La membrana internodal de los axones en el SNP contiene complejos Caspr/contactina flanqueados por complejos Kv1.1/1.2/ β 2/Caspr2 (Arroyo et al., 1999; Rios et al., 2000).

2.3.5 Incisuras de Schmidt-Lanterman

Como parte de los estudios y reportes morfológicos en axones mielínicos del SNP, tanto Schmidt (1874) como Lanterman (1877), de manera independiente, describieron una serie de hendiduras o incisuras con forma de “embudo” que interrumpían la apariencia densa de la mielina (Figura 9). Estas hendiduras, se denominaron incisuras de Schmidt-Lanterman. Dichas estructuras fueron observadas además por Ranvier (1878) y Ramón y Cajal (1928). Estas incisuras son propias de las regiones internodales y muy abundantes entre las regiones perinuclear y paranodal en el SNP. Bajo diferentes condiciones patológicas y en ciertas enfermedades del SNP pueden alterarse la frecuencia de las incisuras a lo largo del internodo. El número total de incisuras incrementa con el grosor de la mielina, la longitud internodal (Sotnikov 1965; Ghabriel & Allt, 1980a) y en respuesta a numerosos estímulos como injuria axonal o el daño por compresión, así como también en nervios en regeneración (Berger & Gupta, 2006).

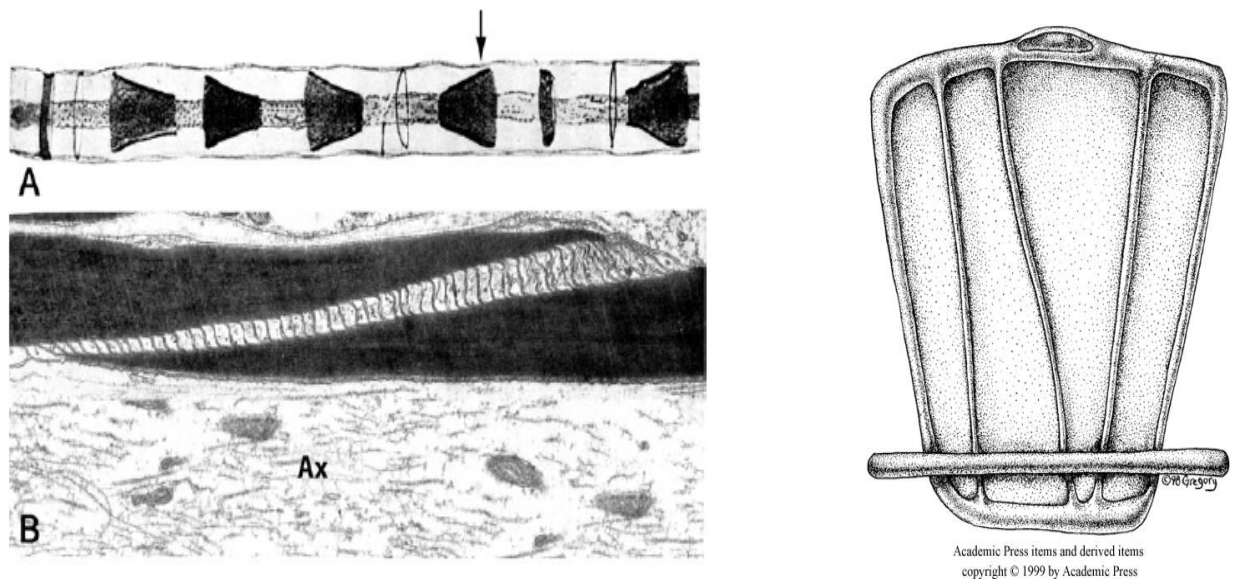


Figura 9. Incisuras de Schmidt-Lanterman. (A) Dibujo de Ramón y Cajal (1928) mostrando el arreglo tipo “embudo” de las incisuras en una fibra miélnica del SNP. (B) Sección longitudinal de una incisura examinada bajo microscopia electrónica. La imagen derecha muestra una célula de Schwann completamente desenrollada del axón, las líneas casi verticales representan regiones de mielina no compacta que conforman las incisuras. Ax=axón. Imagen (B), Mugnaini et al., 1977. Tomado de Lazarini, Myelin Biology and Disorders.

Las largas fibras del nervio ciático de rata poseen en promedio 25 incisuras por internodo. Estas están presentes durante los primeros estadios de mielinización y en los internodos remielinizados. Se han establecido criterios ultraestructurales para su identificación por medio de microscopia electrónica.

Cuando se examina la ultraestructura en secciones longitudinales, las incisuras de Schmidt-Lanterman aparecen como una serie de aberturas citoplasmáticas de la mielina compacta (Robertson, 1958; Gabriel & Allt, 1981; Hall & Williams, 1970; Peters et al., 1991) (Figura 9-B). Orientadas tanto de manera longitudinal como transversal, las membranas de las incisuras de Schmidt-Lanterman se distinguen de la mielina compacta por la presencia de citoplasma de la CS, presencia de microtúbulos, desmosomas, filamentos de actina, orgánulos tipo mitocondrias y algo de retículo endoplásmico (Blakemore, 1969; Singer, 1968, Landon & Hall, 1976). Además, las incisuras contienen una gran variedad de proteínas tales como: fosfatasa alcalina, MAG, proteína básica P2 y la proteína gap Conexina-32 (Novikoff, 1967; Trapp et al. 1979; Schober et al., 1981; Xu et al., 2000).

La función y el rol biológico de las incisuras de Schmidt-Lanterman no han sido aún completamente elucidados. Clásicamente se ha postulado que están involucradas en el crecimiento y mantenimiento de las vainas de mielina especialmente en aquellos internodos remielinizados donde su frecuencia se encuentra incrementada. Roberson (1962) sugiere que las incisuras de Schmidt-Lanterman cumplen alguna función en el mantenimiento y metabolismo de la mielina. Otras hipótesis, sugieren que las incisuras actúan como atajo citoplasmático para sustancias que atraviesan la vainas de mielina desde las regiones más externas hacia las mas internas hasta alcanzar el axón (Singer & Salpeter, 1966; Singer, 1968; Hall & Williams, 1971; Singer et al., 1972; Rawlins,

1973). El rol funcional de estos “atajos” es también analizado desde la óptica del mantenimiento o soporte trófico “local” alejado de los centros celulares de abastecimiento de proteínas, tanto para los axones como las CS (Kun et al, 2007; 2011).

2.4 Neuropatías periféricas de origen genético: Charcot-Marie-Tooth (CMT)

Muchas neuropatías humanas del SNP son causadas por la desmielinización y degeneración de los axones mielínicos, proceso en el cual la vaina de mielina es parcial o completamente degradada. La neuropatía del SNP más frecuente es conocida como síndrome de Charcot-Marie-Tooth (CMT), esta incluye la enfermedad de Dejerine Sottas (DSS), la neuropatía congénita hipomielinizante (CH) y la HNPP (del inglés: hereditary neuropathy with liability to pressure palsies), conformando en conjunto un grupo de alteraciones hereditarias neuromusculares que afectan a seres humanos.

Clásicamente, los tipos de CMT se han organizado para su estudio según la alteración genética que portan y que puede afectar tanto a las CS como a los axones (neuronas). La más común de las variantes CMT es la CMT-1, caracterizada por velocidades de conducción nerviosa (VCN) menores a 38 m/s, desmielinización segmentaria, remielinización paranodal y formaciones conocidas a nivel de diagnóstico histopatológico como bulbos de cebolla, donde la mielina, vista en secciones transversales de nervio periférico, se presenta completamente desestructurada. CMT-2 por el contrario, posee como características VCN iguales a levemente menores a 38 m/s, acortamiento internodal, degeneración y pérdida de axones y grandes fibras mielínicas (Vallat., 2003; Dyck et al., 1993).

Dentro del grupo CMT-1A, cerca del 70 % de estas afecciones es caracterizada por alteraciones en el gen que codifica la proteína PMP-22 (conocida por su nombre en inglés como Peripheral Myelin Protein-22). La principal alteración de CMT1A es la duplicación de *pmp22* que representa el 90% de los casos. Además, se observó mutaciones en PMP-22 que representan entre el 5-10% de CMT1A.

No están aun completamente esclarecidos los cambios estructurales y funcionales que acontecen en las vainas de mielina periférica durante los estadios tempranos de mielinización y desmielinización en esta neuropatía. Muchas moléculas han sido identificadas e involucradas en los procesos de formación, ensamblaje y mantenimiento de la mielina periférica (Scherer & Arroyo, 2002), tales como PMP-22, MBP (myelin basic protein), MAG (myelin associated glycoprotein) entre otras. El metabolismo de estas moléculas podría también estar alterado en el desarrollo de neuropatías periféricas (Vallat et al., 2003; 2005)

En cuanto a PMP-22 (22kDa), esta representa el 5% de la proteína mielínica total del SNP y se encuentra principalmente involucrada en los procesos tempranos de mielinización. En contraste a P0, la cual es específica de nervios, PMP-22 se expresa en muchos otros tejidos. Pertenece a la familia de proteínas de membrana con cuatro dominios transmembrana hidrofóbicos tal como PLP en el SNC. La PMP-22 se encuentra asociada estructuralmente a la membrana de la CS y como otras proteínas de la mielina compacta, es sintetizada cuando ésta comienza a formarse durante los

primeros estadios del desarrollo embrionario (Snipes et al., 1992). Si bien la PMP-22 se localiza principalmente en la mielina compacta del SNP, se desconoce si sus dominios extracelulares o citoplasmáticos cumplen otros roles además del estructural importantes para la mielina. La cantidad relativamente pequeña de PMP-22 y el hecho de que esté presente en las membranas plasmáticas tanto de las CS mielinizantes como en las no mielinizantes reafirma esta hipótesis y sugiere que PMP-22 podría tener una función dinámica en el ensamblaje, mantenimiento y estabilidad proteica de la mielina (D'Urso et al., 1999).

PMP-22 es capaz de formar complejos con P0, y esta interacción podría ser relevante para su propia función. Alteraciones en el gen PMP-22 (mutaciones, duplicaciones, deleciones) causan fenotipos desmielinizante tales como los observados en ratones Trembler-J y en neuropatías humanas tales como el síndrome CMT1A.

2.4.1 Funciones conocidas de la proteína PMP-22

Las funciones de la proteína PMP-22 se encuentran todavía bajo investigación y requieren ser mejor caracterizadas. Evidencias derivadas del análisis de ratones deficientes en PMP-22 y observaciones en humanos portadores de la neuropatía hereditaria CMT-1A, demuestran que PMP-22 es crucial para el correcto desarrollo de los nervios periféricos. Además, esta es requerida para el mantenimiento de los axones y de la vaina de mielina, la determinación del grosor mielínico así como también de su estabilidad (Adlkofer et al., 1995; Bronstein 2000; Carenini et al., 1999 Quarles et al., 2002; Amici et al., 2007).

La localización de PMP-22 en las uniones y contactos entre célula-célula de varios epitelios, sugiere una posible función de ésta en la mediación del proceso de enrollamiento e interconexión de las vainas de mielina (adhesión intercelular) (Notterpek et al., 2001; Roux et al., 2004, 2005). Otras funciones adicionales propuestas para PMP-22 incluyen la regulación del ciclo celular y la proliferación celular (Jetten et al., 2000; Zoidl et al., 1995; Roux et al., 2005; Atanasoski et al., 2002; Giambonini-Brugnoli et al., 2005) además de mediar las interacciones entre la lámina basal y la CS (Amici et al., 2006), proceso crucial en el inicio de la mielinización.

Los mecanismos mediante los cuales PMP-22 podría tener un rol en la formación y mantenimiento de la mielina, incluyen la interacción con la proteína P0 (para estabilizar la mielina compacta) y con el complejo alfa6 β 4 integrina para mediar el vínculo entre la lámina basal y la CS (Hasse et al., 2002; Amici et al., 2006). En relación con algunas neuropatías periféricas, los efectos causados por alteraciones en el gen *pmp22* (CMT-1A, HNPP, DSS, entre otras) se relacionan con cambios en la expresión normal del gen *pmp22* y la cantidad de proteína sintetizada. Como resultante, pueden desencadenarse ciertos eventos celulares adversos de efecto citotóxico (vías lisosomales saturadas, formación de agregosomas, participación de proteínas de shock térmico (hsp) y vías de degradación mediadas por el complejo proteosoma) en las CS, provocando a término el desensamblaje estructural de la mielina compacta (Fortun et al., 2007, 2005). La función exacta de PMP-22 en el mantenimiento y su función en la mielina de las CS se encuentra aun bajo investigación. Su importancia fisiológica en el

SNP durante toda la vida del individuo (desde el desarrollo embrionario, la mielinogénesis y el mantenimiento estructural de la mielina) y las consecuencias de su alteración en condiciones patológicas hacen que el estudio de PMP-22 adquiera especial importancia siendo un objeto de investigación para la comprensión de los mecanismos de acción subyacentes que desencadenan los procesos neuropatológicos.

2.4.2 PMP-22 y su rol en la mielinización periférica

Antes del proceso de mielinización, las CS deben establecer contactos específicos con la lámina basal, que son en gran medida mediados por la familia de los receptores para integrinas. La mielinización en el SNP es dependiente de la formación de la lámina basal por la CS (Bunge, 1993; Amici et al., 2006). El vínculo con la matriz extracelular estabiliza los contactos axón-CS y permite la iniciación de la mielinización (Eldridge et al., 1987, 1989). Ciertos estudios (Chies et al., 2003) sugieren que PMP-22 tiene una función significativa en procesos celulares básicos, extendiéndose más allá de su participación en la mielinización (Huxley et al., 1998; Brancolini et al., 1999, Roux et al., 2005). Estudios *in vitro* sugieren un rol de PMP-22 en la regulación de la proliferación celular y la apoptosis (Fabbretti et al., 1995; Zoidl et al., 1995).

La importancia de la PMP-22 se destaca por su asociación con varias enfermedades del SNP, incluyendo las neuropatías humanas hereditarias más frecuentes entre las que se encuentra el síndrome CMT (Van Itallie et al., 2006, Kursula. et al., 1999). Los diferentes fenotipos pueden surgir por cambios en la dosis génica o por mutaciones en el gen *pmp22*, para las cuales la severidad del fenotipo es dependiente de la naturaleza exacta de la mutación. Las mutaciones dominantes llevan generalmente a un único cambio en los aminoácidos de PMP-22 que resultan en un ensamblaje incorrecto de la proteína, la pérdida de función y una acumulación tóxica de la proteína mal plegada en la CS (Lorch et al., 2004; Nagy et al., 2004; Seddon et al., 2004). Como hemos mencionado, la más común de las variantes humanas CMT es causada por la presencia de un tercer alelo *pmp22* del tipo salvaje debido a una recombinación desigual durante la meiosis (fenotipo CMT-1A, crossing-over incompleto) (Popot, J.L et al., 1990; Pentao et al., 1992), mientras que la rara duplicación en homocigosis de ambos alelos resulta en una forma más severa de la neuropatía, conocida como síndrome Dejerine-Sottas (DSS, por sus siglas en inglés).

La proteína PMP-22 ha atraído la atención dentro del campo de la neurociencia durante los últimos años por algunas razones que destacamos a continuación:

Primero, se han hallado mutaciones en el gen *pmp22* de dos formas alélicas mutantes en ratones que presentan desmielinización del SNP, ratones Trembler (Falconer, 1951; Suter et al., 1992b) y Trembler-J (Henry et al., 1983; Henry & Sidman, 1983; Suter et al., 1992a). El empleo de ratones Trembler-J como modelo animal para el estudio de las CMT-1A, ha sido aplicado y validado por numerosos y reconocidos grupos de investigación en neuropatías periféricas (Fortun et al., 2007, 2005; Khajavi et al., 2007; Devaux & Sherer, 2005; Notterpek et al., 1997). Estos mutantes naturales son una potencial herramienta como modelo animal para el estudio de neuropatías congénitas hereditarias motoras y sensoriales.

Segundo, el gen *pmp22* humano está contenido dentro de la duplicación intracromosómica de 1.5 Mb del cromosoma 17 asociado con la forma más común de la neuropatía hereditaria humana CMT-1A (Skre, 1974; Patel et al, 1992; Valentijn et al., 1992; Timmerman et al., 1992; Lupski et al., 1991; Raeymaekers et al., 1991;; Matsunami et al., 1992). En algunos pacientes humanos se ha descrito la misma mutación en la región codificante del gen *pmp22* que en los ratones Trembler-J (Valentijn et al., 1992) y Trembler (Ionasescu et al., 1997a) lo que contribuye a validar el uso del modelo animal para el estudio de estas neuropatías.

Tercero, se ha demostrado posteriormente que la misma región de 1.5 Mb conteniendo el gen *pmp22* que se encuentra duplicada en el fenotipo CMT-1A esta presente en pacientes con la enfermedad HNPP (Chance et al., 1993).

2.4.3 Modelo animal de neuropatía periférica Charcot-Marie-Tooth tipo 1A (CMT-1A): ratones Trembler-J y Trembler

Los ratones Trembler-Jackson (Tr-J) y Trembler (Tr) son ratones usados como modelos animales de la neuropatía hereditaria humana periférica CMT-1A (Suter, 1992; Nave, 1994; Fortum et al, 2007, 2005; Khajavi et al, 2007; Devaux & Sherer, 2005). En los ratones Tr-J o Tr, mutaciones hereditarias semidominantes y dominantes resultan en un cambio aminoacídico de leucina a prolina (L16P) o de glicina a ácido aspártico (G160D) en la proteína resultante, respectivamente. Como consecuencia de la mutación puntual se produce una modificación estérica en la estructura final de la proteína PMP-22 que impide su normal plegamiento e inserción en la mielina compacta de las CS. Aparentemente, PMP-22 juega un rol estructural en la estabilidad de la mielina por sí misma y en conjunto con la otras proteínas tales como P0, MBP (Notterpek et al., 1997), aunque su mecanismo de acción exacto no está aun claramente esclarecido. Algunos autores señalan que el equilibrio de las interacciones entre PMP-22 y P0 juegan un rol en la estabilidad de la mielina (Hasse et al 2004). En humanos, una larga proporción de pacientes con CMT y neuropatías hereditarias tales como HNPP son causadas por una alteración en la expresión génica de PMP-22 resultando en una duplicación o delección, respectivamente de una porción microscópica del cromosoma 17 que contiene el gen *pmp22* humano (Suter y Snipes, 1995a). En cuanto al los aspectos fenotípicos clínicos, los ratones Trembler-J poseen características similares a los pacientes CMT1A tales como el desarrollo progresivo de la neuropatía sensorio-motora, mientras que otras características se manifiestan de forma diferente. A pesar de la regulación negativa de PMP-22 encontrada en los nervios de ratones Tr-J adultos, se ha descrito que la proteína mutada es capaz de acumularse en regiones perinucleares de las CS y es degradada principalmente por la vía de degradación lisosomal (Notterpek et al., 1997). Por consiguiente, el no ensamblaje de la proteína mal plegada promueve la activación de las vías celulares de degradación alterando la estabilidad de la mielina, promoviendo además la degradación de otras proteínas mielínicas como P0 y MBP (Notterpek et al., 1997).

Ciertos autores sugieren, que la proteína PMP-22 mutante podría ser reconocida como defectuosa y quedar retenida en el retículo endoplásmico donde sería degradada. Otros, por el contrario, argumentan que la proteína mutante PMP-22 es

acumulada no solo en el RE sino también en el aparato de Golgi y en lisosomas. La degradación de proteínas incorrectamente plegadas del retículo endoplásmico es un mecanismo celular frecuentemente utilizado que asegura la integridad de la síntesis proteica (Bonifacino y Lippincott-Schwartz, 1991). El exceso de proteína representa una amenaza y es tóxico para la célula causando a posterior una saturación de la maquinaria celular encargada de su degradación. La proteína PMP-22 puede precipitar formando “agregosomas” junto con otras proteínas de la vía de ubiquitinación (Fortun, 2005, 2007). Los ratones Tr-J comparten hechos patológicos con el síndrome CMT-1A ya que se ha descrito también la acumulación de PMP-22 en el cuerpo celular de las CS mielinizantes obtenidas de biopsia de nervio en estos pacientes (D'Urso et al., 1998).

2.5 Nuevos abordajes experimentales para el estudio del Sistema Nervioso Periférico: Microscopía de Fuerza Atómica (MFA).

Frecuentemente el estudio de los procesos neurodegenerativos se realiza desde una óptica celular enfocados en la afección individual o tisular, abarcando aspectos fisiológicos y/o moleculares. Sin embargo, otras propiedades celulares, como las biomecánicas se alteran a consecuencia de los cambios moleculares ocurridos durante la patología y que por tanto, pueden ser usados también como indicadores de la evolución de la enfermedad. Hasta hace poco tiempo, la imposibilidad de tener una herramienta capaz de medir estas propiedades con eficiencia y facilidad había enlentecido el avance para el estudio y diagnóstico patológico en esta área. La Microscopía Electrónica y Óptica (de Fluorescencia y Confocal) han sido hasta el momento las principales herramientas para el estudio de la desmielinización del SNP (Berthold & Nilsson, 2002; Bischoff, 1973; Mc Donald, 1967). Para esta clase de microscopios, las muestras deben ser procesadas, generalmente se encuentran fijadas y embebidas en diversos medios, haciendo de la investigación funcional un recurso de uso limitado.

Un abordaje al estudio funcional del proceso de mielinización y desmielinización puede ser el empleo del Microscopio de Fuerza Atómica (MFA) (Binnig et al., 1986), el cual es capaz de generar imágenes de muestras biológicas tanto fijadas como vivas en condiciones fisiológicas (Jena & Horber, 2002; Morris et al., 2001). Basado en la interacción local entre la punta (cantiléver) y la superficie de una muestra, el MFA proporciona imágenes tridimensionales de superficies con muy alta resolución espacial que permiten cuantificar la profundidad y morfología de las muestras en tiempo real, en el orden de los nanómetros (Czajkowsky & Shao, 1998; Scheuring et al., 2001). Además, es capaz de generar imágenes de procesos dinámicos (Kasas et al., 1997; Jiao et al., 2001), los cuales pueden combinarse de forma simultánea con técnicas de marcación específica gracias al acoplamiento con el MFA de un microscopio de óptica invertida de epifluorescencia (Callies et al., 2009; Lehenkari et al., 2000).

2.5.1 Conceptos Básicos de Microscopía de Fuerza Atómica (MFA)

2.5.2 Modos de Operación del MFA

El MFA es la extensión más directa del microscopio de efecto túnel y es especialmente útil en el estudio de las superficies de materiales no conductores. La mayoría de los MFA se componen de los siguientes componentes: la punta, el escáner, el fotodetector, el sistema de control electrónico (ver figura siguiente). La punta se selecciona de acuerdo al tipo de muestra y las propiedades que se desean obtener; esta puede ser de diferentes materiales, las más comunes son de Nitruro de Silicio o de Silicio. El diseño del escáner tiene forma de tubo y es de un material cerámico piezoeléctrico que cambia de dimensiones como respuesta al voltaje aplicado. Estos escáneres se caracterizan por tener tres grados de libertad, expandiéndose en una dirección y contrayéndose en otra como resultado del voltaje aplicado a sus electrodos. El MFA (Veeco Instruments. Inc) trabaja en diferentes modos de operación como son: contacto, contacto intermitente (Tapping) y volumen de fuerza (Force Volume) entre otros, los cuales se combinan para estudiar la topografía y las propiedades nanomecánicas de tejidos, células y moléculas. El rango de barrido del escáner que posee el MFA utilizado en este estudio (Bioscope Catalyst) es de 120 micras en movimiento lateral y 20 micras en movimiento vertical. El MFA monitorea la superficie de la muestra con una punta de radio de curvatura de entre 2 a 60 nm (según el tipo de punta) que se localiza al final del cantilever. Las fuerzas entre la punta y la muestra provocan la deflexión del cantilever. De forma simultánea un detector mide esta deflexión a medida que la punta se desplaza sobre la superficie de la muestra generando una micrografía de la superficie. La fuerza interatómica que contribuye a la deflexión del cantilever es la fuerza de Van der Waals. Las adaptaciones principales que tiene el MFA (Bioscope Catalyst) para su aplicación en biología incluyen entre otras cosas, una platina termostatzada para mantener a las células a temperatura adecuada y una micro-cámara de aislamiento de vibraciones que evita fluctuaciones de la punta en el medio líquido que pueden afectar la adquisición de imágenes durante el escaneo.

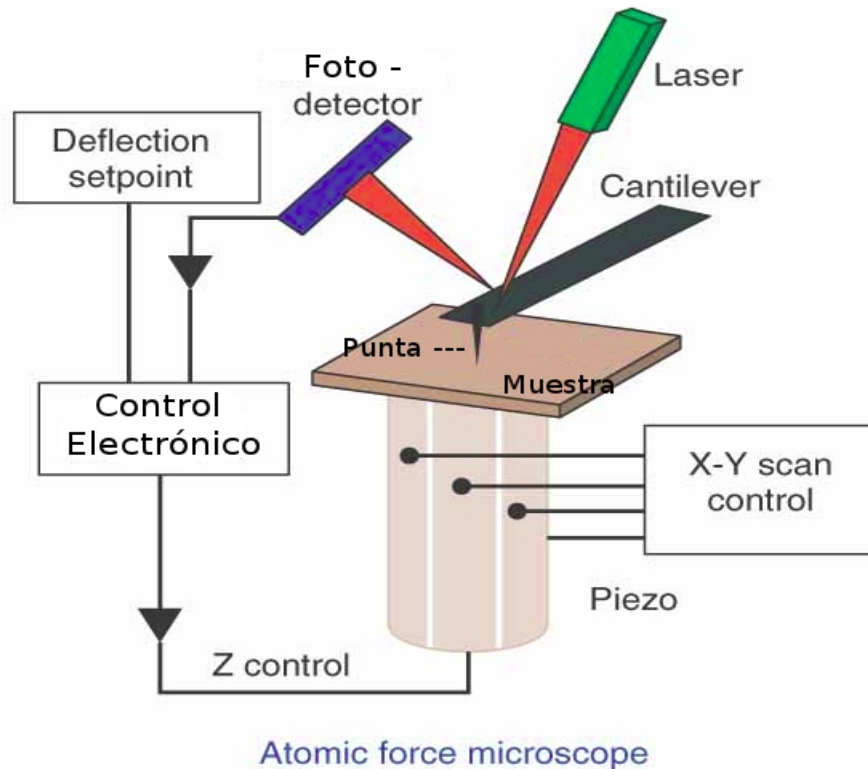


Figura. Componentes principales del Microscopio de Fuerza Atómica. La imagen representa de forma esquemática los componentes principales del microscopio de fuerza atómica: la punta, la platina donde se coloca la muestra, el fotodetector, el laser, el escáner (material Piezoeléctrico) y los componentes electrónicos que incluyen el controlador del MFA y un computador para la obtención de imágenes y ajuste de los parámetros de escaneo.

Además de generar imágenes de muestras biológicas, el MFA puede ser usado para medir o aplicar pequeñas fuerzas. Así, las propiedades elásticas de cualquier muestra pueden ser estudiadas (evaluadas, analizadas, cuantificadas) de forma cualitativa usando el modo de volumen de fuerza (Radmacher et al., 1993), el cual ha sido empleado desde el comienzo en células vivas (Radmacher et al., 1992).

El principio básico mediante el cual se generan las curvas y mapas de fuerzas se basa en la capacidad de registrar la fuerza ejercida entre la punta "cantilever" y la muestra, a medida que este se aproxima, toca y retrae en un punto sobre su superficie. Los mapas de volumen de fuerza contienen un arreglo de curvas de fuerza a lo largo de un área o superficie de la muestra. Cada curva de fuerza es medida en un único punto (x,y) del área de la muestra. Un arreglo de curvas de fuerza de muchos puntos x_n, y_n pertenecientes a distintos planos en el eje z, se combinan para formar un mapa tridimensional o volumétrico (x,y,z) de datos, que contienen información acerca de las propiedades mecánicas, químicas, magnéticas o electroestáticas de la superficie. Las curvas de fuerza pueden además ser usadas para investigar las propiedades elásticas de los materiales o muestras biológicas midiendo la fuerza requerida para penetrar o deformarlas. De esta manera, el modo de volumen de fuerza puede por tanto producir mapas elastográficos que aportan información acerca de las propiedades mecánicas locales de muestras biológicas como son la rigidez o la elasticidad (Hassan et al., 1998).

Es así que el MFA puede generar mapas de la distribución espacial de las propiedades mecánicas celulares, que en cierta medida reflejan la estructura y función de componentes celulares tales como el citoesqueleto subyacente (Costa, 2003). Dichas medidas han contribuido al entendimiento de algunos mecanismos celulares y parecen actuar como marcadores sensibles para la detección de enfermedades en células individuales.

2.5.3 Aplicaciones de la MFA en el área de la neurobiología celular

En el campo de las neurociencias, el MFA ha sido usado en muy pocas ocasiones. (1) para generar imágenes en tres dimensiones (3D) de neuronas vivas (Nagayama et al., 1996; Parpura et al., 1993), (2) para estudiar la dinámica de los filamentos de actina de células gliales (Henderson et al., 1992; Henderson & Sakaguchi, 1993), (3) en secciones semifinas de nervio trigémino (Melling et al., 2001) y oculomotor (Melling et al., 2003), (4) en el análisis de la arquitectura 3D de ganglios dorsales y simpáticos de pollo (McNally et al., 2005) y (5) en el estudio de las propiedades mecánicas de conos de crecimiento (Grzywa et al., 2006; Xiong et al., 2009).

Poco se conoce acerca de las propiedades mecánicas de los axones y las CS durante el proceso de mielinogénesis normal o patológica en el SNP. La correcta formación y ensamblaje estructural de la mielina se encuentra estrechamente ligado a sus propiedades conductoras (Court et al., 2004), punto clave para el diagnóstico de patologías periféricas.

Existe un reporte donde se describen las propiedades elásticas de la mielina de las CS por MFA bajo condiciones normales y patológicas utilizando como modelo animal ratones Trembler-J (Heredia et al., 2007). En ese mismo trabajo, fueron observadas por primera vez diferencias en las propiedades elásticas de las vainas mielínicas de fibras nerviosas periféricas normales y patológicas aisladas de ratones Trembler-J adultos así como también diferencias topográficas.

El campo de la mecánica celular ha evolucionado radicalmente en las pasadas dos décadas (Akkas 1994; Mow, 1994; Boal, 2002). De particular interés es el creciente número de estudios que demuestran una estrecha asociación entre las propiedades nanomecánicas de las células y varias condiciones patológicas (Pasternak et al., 1995; Guilak 2000; Wu et al., 2000). Es así que, es posible mediante el uso de la MFA combinar el análisis funcional y morfológico del tejido nervioso a nivel de células aisladas.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las fibras nerviosas mielínicas del SNP constituyen una unidad funcional y estructural en su conjunto protagonizada por las CS mielinizantes y los axones que estas células envainan. En la conformación de tales entidades, es de gran importancia el aporte que realizan las CS. Estas, no solo cumplen un rol importante para el correcto desarrollo y mantenimiento de los axones durante el desarrollo embrionario y en el animal adulto, sino que además brindan soporte trófico y aislamiento, elementos clave para la correcta propagación del impulso nervioso. La formación de la mielina por parte de las CS es dependiente de la correcta formación y ensamblaje de la lámina basal (Chernousov et al., 2008). Esta última, se encuentra constituida por un gran número de moléculas secretadas por la propia CS entre las que figuran importantes componentes estructurales de la matriz extracelular como son los diferentes tipos de colágeno (tipo I, III, IV y V, que brindan estructura y organización a las fibras nerviosas), la fibronectina y las lamininas (isoformas 2, 8 y 10, de importante rol en la mielinización del SNP) entre otras. Durante las primeras fases del desarrollo, en las fibras nerviosas destinadas a ser mielinizadas, el contacto de la CS con la lámina basal incipiente en los dominios abaxonales, gatilla el proceso de mielinización (Chernousov et al., 2008; Obremsky, 1993a, 1993b, Yu et al., 2009).

La mutación puntual en *pmp22* es la alteración patognomónica que identifica a los ratones Trembler-J. Es posible caracterizar el fenotipo portador de la mutación a través de las profundas alteraciones que ocurren en las CS como consecuencia de la evolución de la patología y su cronicidad. Existen además, otros cambios estructurales que exceden las alteraciones patológicas vinculadas exclusivamente al incorrecto ensamblaje de la mielina, pudiendo verse afectadas otras estructuras celulares. Estas alteraciones pueden quedar de manifiesto no solo en la estructura y organización de componentes del citoesqueleto que afectan la fisiología normal de la propia CS, sino que pueden manifestarse en la constitución y arreglo de los componentes que conforman la lámina basal y la matriz extracelular. En otras palabras, las alteraciones patológicas producto de la mutación en el gen de la proteína PMP-22 abarcan cambios estructurales que pueden verse reflejados tanto dentro como fuera de las CS, involucrando otras moléculas citoplasmáticas y de membrana de la fibra (Amici et al., 2006; Sherman et al., 2001).

3.1 Hipótesis general

Las alteraciones de las fibras nerviosas de animales Trembler-J, portadores de una mutación puntual en el gen *pmp-22*, producen un fenotipo mutante que puede ser caracterizadas por MFA. Este fenotipo está expresado en la constitución del arreglo cito-estructural de la fibra (citoesqueleto de la CS y del axón), en la relación axon-glia y en la organización de los componentes de la lámina basal y la MEC.

La distribución de proteínas y su organización supramolecular se encuentran asociadas a las propiedades biomecánicas de las fibras. Estas propiedades podrían aportar información relevante para el estudio y mejor caracterización de los procesos neurodegenerativos del Sistema Nervioso Periférico (SNP), como en el caso de las

mielinopatías CMT1A en seres humanos. Igualmente, este enfoque podría permitir profundizar en una mejor comprensión de los mecanismos normales implicados en la mielinización, el mantenimiento de la célula de Schwann y del axón y la plasticidad de la fibra nerviosa periférica.

3.2 Objetivo general

Caracterización estructural, biomecánica y molecular del fenotipo neurodegenerativo Trembler J (modelo animal de la neuropatía humana CMT1A) en fibras del SNP.

3.3 Objetivos específicos:

- (1) Determinar la organización de los principales dominios estructurales de la fibra nerviosa periférica y la distribución de PMP-22 mediante el estudio de la expresión de marcadores específicos por microscopía confocal.
- (2) Caracterizar la topografía de las fibras mielínicas de nervio ciático adulto de ratón normal y Trembler-J, por MFA.
- (3) Estudiar las propiedades biomecánicas de las fibras mielínicas, en condiciones normales y patológicas (CMT1A), por MFA.
- (4) Caracterizar mediante estudios bioquímicos la expresión molecular de marcadores celulares en fibras periféricas de ratones normales y Trembler-J.

3.4 Estrategia de Investigación

Para cumplir con los objetivos planteados en esta tesis se ha diseñado la siguiente estrategia experimental:

- (1) se procesaron las muestras para ser analizadas por microscopía laser confocal con el fin de obtener datos comparativos. Mediante inmunohistoquímica utilizando diferentes marcadores celulares se identificaron los diferentes dominios estructurales de las fibras.
- (2) se prepararon las muestras para ser observadas por MFA y generar imágenes topográficas de las fibras para cada uno de los fenotipos. Con el fin de estudiar y comparar el efecto de la mutación en similares condiciones (en un mismo “contexto genético”) en cada ronda experimental se utilizaron ratones adultos (3 meses) hijos de la misma madre pero de diferente genotipo.
- (3) Las propiedades biomecánicas de las fibras para cada condición fueron estudiadas utilizando las mismas muestras previamente escaneadas por MFA.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Obtención de muestras biológicas y diferenciación fenotípica de ratones adultos normales y Trembler-J.

Las muestras biológicas que se utilizan a lo largo del trabajo de tesis se obtuvieron a partir de ratones normales y Trembler-J portadores de la mutación en la proteína PMP-22 (cepa: B6.D2-Pmp22<Tr-J>/J, Laboratorios Jackson, USA). La diferenciación y reconocimiento fenotípico de los ratones se realizó por el test modificado de elevación por la cola del animal (Modified Tail Suspension Test, MTST, por sus siglas en inglés, Rosso et al., 2010) y que se muestra en la Figura 10. Este diagnóstico es posible debido a que existe una correlación del 100% ente el genotipo del ratón y el test MTST. Este simple y rápido test permite reconocer y diferenciar, tras suspender a los animales por la cola, los ratones normales (Figura 10A) y los Trembler-J portadores de la mutación en PMP-22 L16P (Figura 10B).

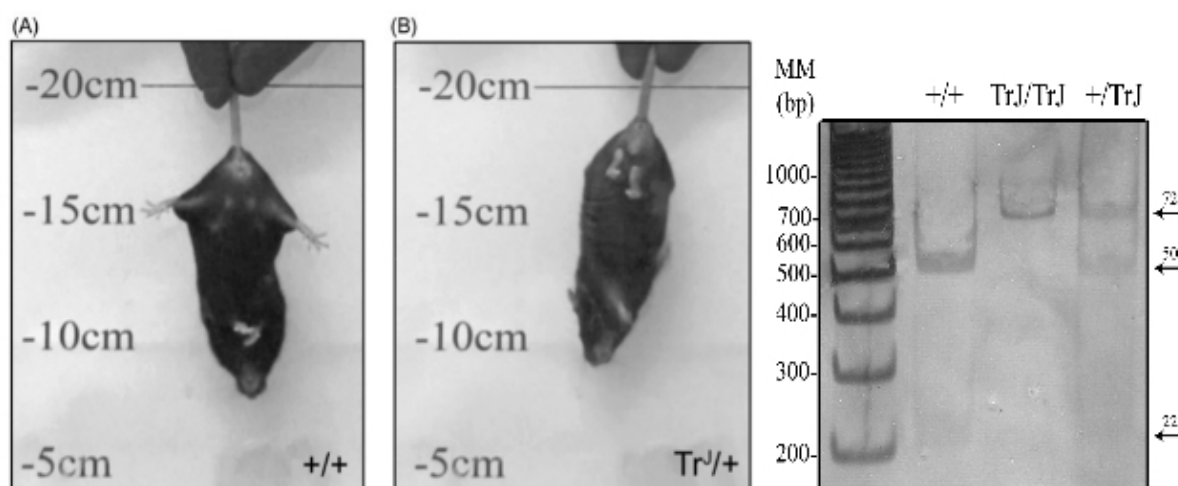


Figura 10. Determinación temprana del fenotipo Trembler-J (modelo animal CMT-1A) a partir de la observación fenotípica. Las imágenes en (A) y (B) representan la postura adoptada por los ratones normales y los Trembler-J al ser sujetados por la cola según el método MTST. La discriminación fenotípica se realiza observando la organización espacial que adopta el tren posterior y los miembros inferiores del animal. Los ratones Trembler-J portadores de la mutación en *pmp-22* presentan un encogimiento de los miembros posteriores (Figura B) que permite la diferenciación fenotípica (desde los 11 días de nacimiento) entre los mutantes y normales. El gel PAGE 6% de la imagen derecha muestra el resultado del genotipado a partir de una muestra de cartílago de la oreja obtenido de tres individuos (+/+, Tr-J/Tr-J, Tr-J/+). El marcador de peso molecular se indica a la izquierda MW (pares de bases). Luego de la digestión con la enzima de restricción BfaI, el fragmento +/+ muestra dos bandas de 221 y 500 pb mientras que la digestión de Tr-J/+ muestra tres bandas de 221, 500 y 721 pb (flechas) (Imágenes tomadas de Rosso et al., 2010).

4.2 Preparación de Fibras aisladas de nervio ciático de ratones normales y Trembler-J para MFA.

Los animales se manipularon siguiendo los protocolos de manejo establecidos por la comisión honoraria de experimentación animal (CHEA). Se disecó cuidadosamente el nervio ciático y posteriormente se lo colocó en buffer PHEM (EGTA 10mM, Pipes 60mM, Hepes 25mM, 2mM $MgCl_2$ filtrado). El buffer PHEM utilizado en el procesamiento de las muestras analizadas por MFA fue filtrado, pues se comprobó que esto mejoraba la calidad del escaneo, probablemente debido a la eliminación de cristales no disueltos. Luego de fijadas las fibras, se separó mecánicamente el epineuro que recubre los paquetes de fibras nerviosas. El peinado (procedimiento conocido por su nombre en inglés como "teasing") de las fibras nerviosas se realizó bajo la lupa, utilizando pinzas de cirugía N°5 sobre cubreobjetos previamente tratados con Poli-L-Lysina (Sigma, Aldrich). La Poli-L-Lysina es un pequeño homopolímero natural comunmente empleado en el recubrimiento de materiales (vidrio) usados para cultivos celulares. Este actúa como un factor que mejora la adhesión del material biológico (células o tejidos) a las superficies. El proceso de fijación de las muestras se realizó con Paraformaldehído al 3% en PHEM, preparado en el momento y filtrado para remover los restos de PFA no disueltos. Se fijó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Luego de la fijación, las muestras se lavaron 3 veces con buffer PHEM para remover el fijador, restos celulares y partículas remanentes. Las muestras se guardaron a 4°C hasta ser observadas en el MFA.

4.3 Microscopía de Fuerza Atómica

Para la obtención de imágenes y medidas de elasticidad se utilizó un Microscopio de Fuerza Atómica modelo Bioscope Catalyst, (Bruker Company, USA). Las muestras fueron observadas en medio líquido (buffer PHEM) utilizando el modo contacto. Las puntas utilizadas tanto para las imágenes como para las medidas elásticas fueron modelo "V-shaped" DNP-10 (Bruker, Company, USA) teniendo una constante de deflexión (kc) nominal especificada por el fabricante de 0.06 N/m aproximadamente, una longitud de 200µm, 25µm de ancho, 18kHz de frecuencia y un radio de curvatura de 20nm. Este tipo de puntas son consideradas como "puntas estandar" dentro de la gran variedad de modelos comerciables existentes. Estas tienen como ventaja principal la capacidad de ser útiles tanto para generar imágenes de las muestras como para su empleo en el estudio de las propiedades mecánicas.

4.3.1 Tratamiento con enzima Colagenasa.

Para el estudio de la matriz extracelular, algunas muestras fueron sometidas a tratamientos para la remoción de colágeno. Para el tratamiento se utilizó 0.225 mg/mL de la enzima Colagenasa XI (*Colagenasa XI Clostridium histolyticum*, Sigma-Aldrich) activada con 5mM $CaCl_2$ en buffer PHM (Pipes 60mM, Hepes 25mM + 2mM $MgCl_2$). Las fibras mecánicamente separadas y peinadas sobre cubreobjetos pre-tratados con poly-L-lysine se incubaron a diferentes tiempos: 15 y 30 minutos a 37°C. Durante la puesta a punto del protocolo, se intentó realizar periodos de incubación más

prolongados pero el tejido comenzaba a dañarse gravemente por efecto enzimático dificultando su uso para el análisis. Luego del período de incubación, las muestras lavaron cuatro veces con buffer PHEM (EGTA 10mM, Pipes 60mM, Hepes 25mM + 2mM MgCl₂) para remover el colágeno digerido y inactivar la enzima. Las fibras fueron luego fijadas con PFA 3% y preparadas para MFA.

4.3.2 Análisis de rugosidad media de superficie (Ra): procesamiento de imágenes.

Por definición, la rugosidad es el conjunto de irregularidades que posee una superficie real en aquellas secciones donde se corrigieron los errores en la forma y las ondulaciones. Por tanto, la rugosidad media (Ra) representa los valores absolutos de los alejamientos del perfil desde la línea central. El análisis de la distribución de la rugosidad en las imágenes topográficas de todas las fibras nerviosas (+/+ , Tr-J/+ y tratadas con collagenasa) se realizó utilizando el programa computacional WSxM versión 4.0 (Horcas et al., 2007). Para medir la Ra sobre las fibras se emplearon 3 cuadrantes de 1,5µm² en donde los valores de rugosidad presentaran una distribución normal (Figura. 11 C). Esto se debió a que al tratar de medir la rugosidad de toda la imagen (6µm X 6µm) los valores mostraban distribuciones diferentes a la normal. En imágenes topográficas por MFA tomadas bajo las mismas condiciones de resolución (256x256) y tamaño (6µm X 6µm) se estudiaron los perfiles longitudinales de las superficies ("profile section") tal como muestra la línea amarilla en las imágenes A y B de la figura 11. Se analizaron un total de 37 imágenes. Debido a la morfología curva de las superficies analizadas (Figura. 11 A' offset) se debió realizar un tratamiento de flatten a las imágenes. El tratamiento de las imágenes por el método de flatten elimina ciertas características no deseadas en las imágenes de superficie producto de la interacción entre la punta y la muestra o del propio escaneo (ejemplo: líneas, ruido, inclinación de la superficie). El flatten de imágenes es recomendado para los análisis de la profundidad de la superficie, de rugosidad, perfil topográfico, etc) y cuando estas presentan inclinaciones, curvaturas, o ruido por baja frecuencia. Estos son detectables debido a que aparecen como corrimientos o rayas en la imagen. Según el perfil topográfico de cada superficie, es posible determinar que tipo de polinomio (0 orden, 1^{er} orden, 2° orden o 3^{er} orden) se adapta mejor y así substraer de cada línea de datos. Según nuestras imágenes, estas fueron sometidas a un método de corrección "flattening" de segundo orden que responde a la ecuación ($y = a + bx + cx^2$). De esta forma, se normalizaron todas las imágenes respecto a un nivel de "altura cero" que permite corregir el efecto de la forma de la superficie y descartar cualquier irregularidad producto de la estructura celular subyacente (Figura 11 B' Flatten). El análisis de la rugosidad de superficie (Ra) se llevó a cabo tomando las imágenes corregidas y colocando sobre estos tres cuadrados de 1.5µm² de lado tal como se indica en la figura 19 A. Los datos obtenidos se obtuvieron utilizando el programa Nanoscope Analysis el cual es recomendado y empleado por los proveedores del microscopio para este tipo de análisis (Bruker Co, USA). Los gráficos fueron producidos en Excel.

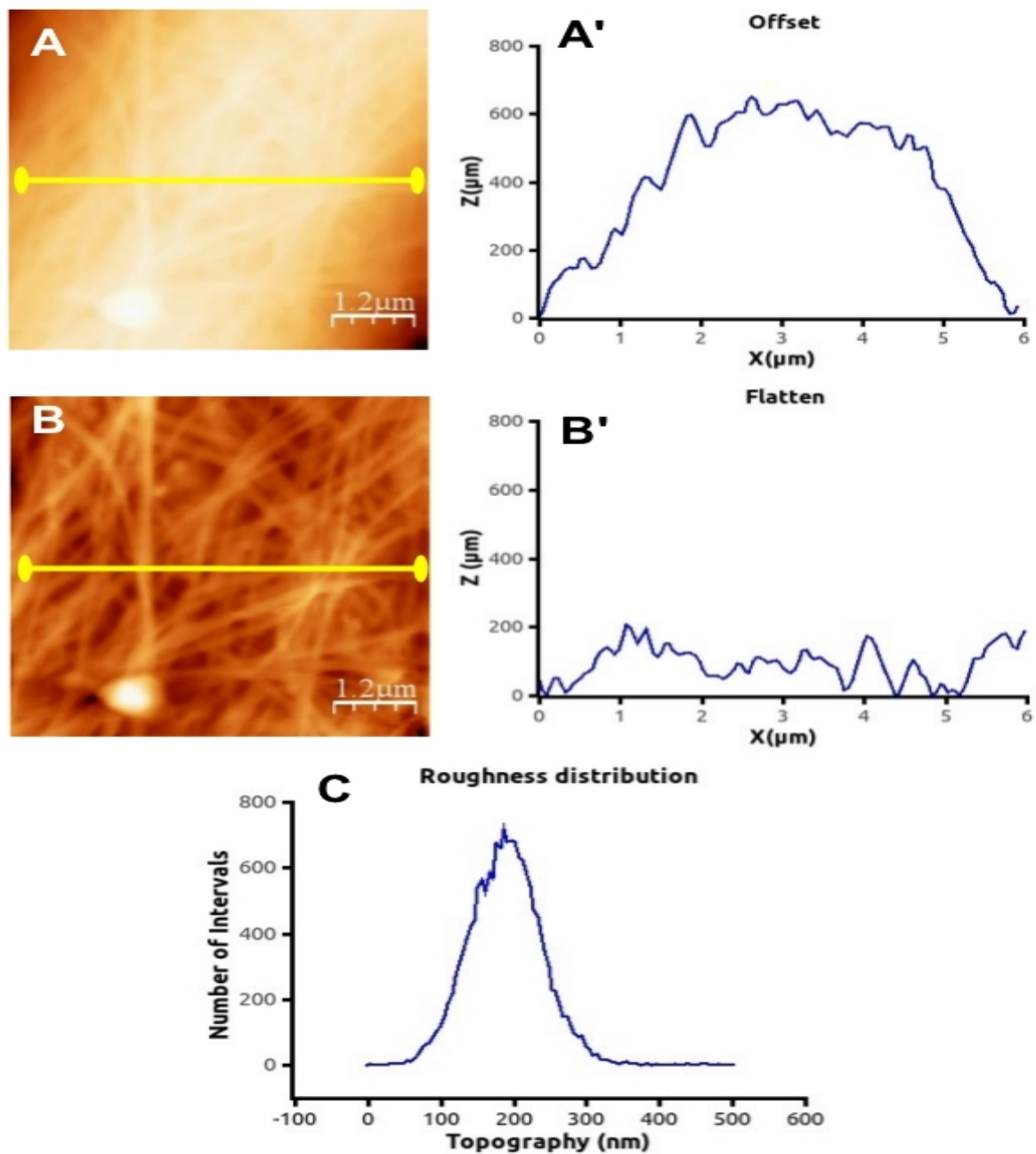


Figura 11. Procesamiento de las imágenes obtenidas por MFA para el análisis de rugosidad media (Ra). La línea amarilla en (A) y (B) sobre las imágenes de las fibras representa de qué forma se obtuvieron los perfiles topográficos antes (A', Offset) y después (B', Flatten) de realizado el ajuste o corrección de segundo orden (ver materiales y métodos). El gráfico de la figura (C) representa la distribución de los valores de rugosidad de la superficie de la imagen (B) que se obtienen producto de la corrección de segundo orden aplicada. Los datos presentan una distribución normal. Tamaño de imagen: 6 μm x 6 μm, resolución 256x256 pixels.

4.3.3 Medidas de Elasticidad (ver anexo).

Las curvas de fuerza versus distancia obtenidas tanto para las fibras normales como las fibras Trembler-J y el cálculo del módulo elástico de Young fueron analizadas considerando el modelo físico que se ajusta mejor a las condiciones experimentales empleadas. Existen dos modelos principales que describen el mecanismo de indentación de una muestra blanda utilizando un indentador rígido. El modelo de Hertz (Johnson et al., 1971) postula que la indentación es realizada por una esfera rígida sobre una superficie blanda y plana. Por otro lado, el modelo de Sneddon (1995) asume que el indentador es una punta rígida de forma cónica la cual penetra en una superficie blanda y plana. Ambos modelos no incluyen las propiedades adhesivas y viscoelásticas de las muestras. Para que el modelo de Hertz pueda ser aplicado, la indentación en la muestra debe ser menor que el radio de la esfera. En el modelo de Sneddon, se asume que la punta usada como indentador es considerada infinitamente fina. Este modelo se ajusta mejor cuando la penetración alcanzada por el punta cónica es menos del 10% del grosor total de la muestra. Para el caso de una punta rígida cónica la cual penetra en una superficie blanda y lisa (la cual podría ser considerada en nuestro caso) la relación entre la penetración (δ) y la fuerza aplicada, F , esta dada por la siguiente ecuación (1):

$$F = \delta^2 \frac{2}{\pi} \frac{E}{(1 - \nu^2)} \tan \alpha \quad (1)$$

donde,

F = fuerza entre la punta y la muestra. De acuerdo con la ley de Hooke la fuerza está dada por :

$$F = - k_c d \quad (2)$$

donde, k_c es la constante de resorte del cantilever (determinada por las propiedades intrínsecas físicas y geométricas).

En el anexo incluido al final de la tesis, en la sección 10.2 “Esquema de indentación de una punta de MFA en una célula”, se muestra de forma esquemática un dibujo explicativo del fenómeno de indentación junto con las ecuaciones y parámetros asociados al cálculo de la elasticidad.

Nota: el valor de k_c se encuentra típicamente entre un rango de 0,01 N/m a 1.0 N/m para aplicaciones al estudio de la mecánica celular. Un paso previo al cálculo de las medidas de elasticidad es el cálculo de la constante de deflexión del cantilever (k_c) por medio del método Thermal Noise (Cook et al., 2006; Butt & Jaschke, 1995). Mediante este método es posible calibrar el cantilever y determinar su constante elástica para luego poder expresar las medidas de elasticidad (F vs δ^2) en los parámetros apropiados. Comunmente, el valor de k_c es proporcionado por el fabricante. Por cuestiones prácticas, su cálculo o determinación por parte del operador es una tarea de rutina recomendada, no solo para confirmar la constante elástica del cantilever que se

esta usando antes de comenzar a realizar las medidas, sino además para calcular con precisión los posteriores datos de elasticidad de las muestras.

d = deflexión del cantilever

δ = penetración en la muestra ("indentación")

E = módulo elástico de Young

El módulo elástico de Young es el coeficiente básico de la elasticidad de los materiales y está determinado por la letra E . En el contexto de los materiales que estudiamos en esta tesis, las propiedades elásticas son definidas como módulo elástico aparente, ya que presentan propiedades viscoelásticas dentro de la respuesta celular. Los valores de E pueden variar desde 100 GPa para materiales duros tales como el vidrio o el acero, hasta 100 MPa para polímeros típicos (ej: poliestileno), y 1 MPa para materiales blandos tipo gel. Valores típicos para células se ubican entre 1 kPa y 100 kPa.

ν (ν) = razón de Poisson's de la muestra. Este parámetro determina la cantidad de expansión lateral que acompaña a la compresión axial del material y su valor está comprendido entre -1 y 0.5.

Nota: En esta tesis hemos adoptado el valor de 0.5 para la razón de Poisson. Dicho valor, que corresponde al de un material incompresible, es comúnmente utilizado para células en la literatura especializada (Mathur et al., 2001, Heredia et al., 2007).

α = semi-ángulo de apertura de la punta cónica. Para las puntas usadas en este trabajo el semi-ángulo considerado es de 15° (DNP-10, Bruker probes Company).

Es importante apreciar que estas formulas están basadas en un número de simplificadas asunciones que incluyen la homogeneidad, grosor y dimensiones infinitas, propiedades elásticas de comportamiento lineal. Es por estas razones que debe tenerse una particular precaución al aplicar las mencionadas formulas teóricas al problema así como también la interpretación de los resultados. Debemos tener en cuenta que tanto el modelo de Hertz como el de Sneddon no consideran la adhesión ni las propiedades viscosas de la muestra.

A modo de ejemplo ilustrativo, la figura 12 describe y explica esquemáticamente las interacciones entre punta-muestra durante la adquisición de curvas de fuerza sobre una superficie dura. El gráfico en (a) representa de forma esquemática una curva de fuerza (nN) versus distancia (nm) "ideal" durante un solo ciclo de aproximación (línea punteada) - retracción (línea completa) de la punta del MFA. A partir de estas curvas se obtiene información acerca de las propiedades elásticas de la superficie o la muestra biológica. Las letras (A-F) sobre la curva en la figura (a) representan la posición de la punta del MFA durante el ciclo (ilustración esquemática en b) y que se describen a continuación. En (A) la punta se aproxima a la muestra pero no se encuentra aún en contacto con la superficie. El contacto inicial entre la punta y la superficie es mediado por fuerzas atractivas de van der Waals (contacto) que conducen a la atracción de la punta hacia la superficie (B). A partir de este momento, la punta aplica una fuerza constante y pre-definida sobre la superficie la cual provoca la penetración de esta en la muestra junto con la deflexión del cantilever (C). Subsecuentemente, la punta comienza

a retraerse y perder contacto con la superficie (D). Varias fuerzas adhesivas intervienen entre la punta del MFA y la muestra que dificultan la retracción. Estas fuerzas adhesivas pueden ser medidas directamente de las curvas de fuerza vs distancia (E). En (F) la punta se retrae de la muestra superando las fuerzas adhesivas y volviendo a su posición inicial. Durante la adquisición de las curvas de fuerza el ciclo aproximación-retracción puede repetirse una gran cantidad de veces.

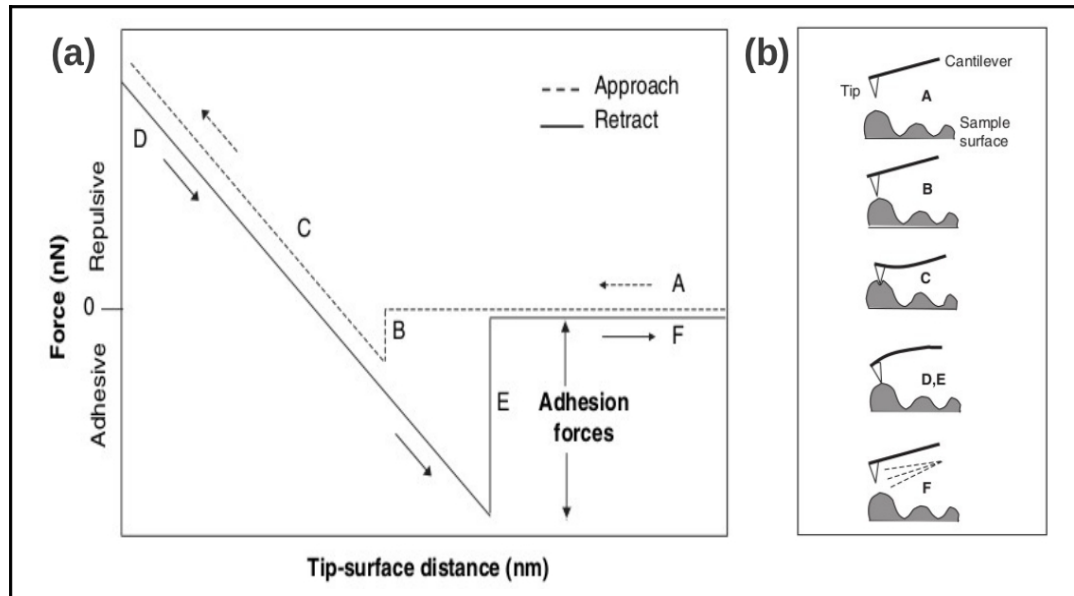


Figura 12. Curva de fuerza versus distancia (interacción punta-muestra). La imagen en (a) representa una curva de fuerza versus distancia típica tomada sobre una superficie rígida. El esquema en (b) representa los cambios en la deflexión de la punta del MFA con respecto a la interacción con la muestra durante un ciclo de aproximación – retracción (A-F). (Imagen tomada y modificada de Shahin et al., 2005).

4.4 Microscopía Confocal

La detección inmunohistoquímica de las fibras mielínicas se realizó en fibras peinadas mecánicamente (previamente escaneadas por MFA) usando un Microscopio Laser Confocal (OLYMPUS FV300) de uso institucional en el IIBCE. Se eligió esta microscopía para caracterizar in situ molecularmente nuestra muestra por presentar ventajas frente a la microscopía óptica convencional de fluorescencia. La microscopía confocal es un tipo de microscopía óptica que minimiza la difuminación de la imagen aumentando el contraste y la resolución pues refleja la imagen proyectada desde un único plano de interés iluminado. Esto es posible gracias a que la luz pasa por un filtro (máscara o pin hole) que bloquea la luz proveniente de los planos superiores e inferiores iluminando solo el plano de interés. El resto del volumen de la muestra no recibe iluminación eliminando así la dispersión. La luz devuelta desde el plano iluminado es enfocada por el objetivo en un plano situado por encima de la muestra. En ese plano se ubica la máscara. La luz reflejada por la muestra en su camino de regreso hacia el detector, es nuevamente filtrada al incidir en la cara inferior de la máscara (ver

figura C). La máscara elimina así los planos de luz por encima y por debajo del plano de la muestra iluminado (Lichtman, 1994).

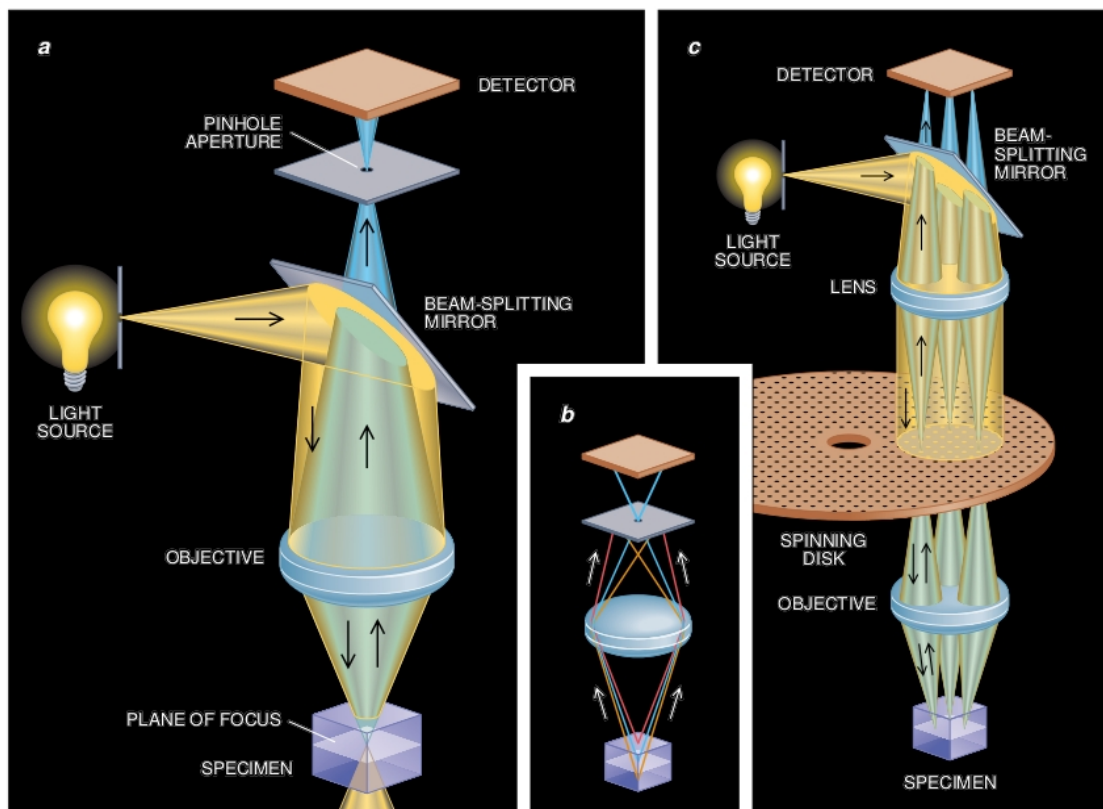


Figura. Principio básico del microscopio confocal. Las imágenes muestran el mecanismo de funcionamiento de la microscopía óptica convencional (a) en comparación con la microscopía confocal (b y c) y el principio de confocalidad. Imagen tomada de Lichtman (1994).

Las imágenes fueron transmitidas a la computadora utilizando el programa FLUOVIEW (versión 4.3). Antes de comenzar las observaciones, se calibraron los niveles de voltaje del fotomultiplicador (PMT) en intensidad por debajo de los niveles de saturación (para cada fluorocromo). Se obtuvieron imágenes de planos confocales de $0.5\mu\text{m}$ de espesor utilizando diferentes objetivos (20X, 40X, 60X o zoom digital 150X).

4.4.1 Inmunocitoquímica

Las muestras fueron lavadas con buffer PHEM (EGTA 10mM, Pipes 60mM, Hepes 25mM + 2mM MgCl_2) y permeabilizadas con buffer PHEM conteniendo detergente TRITON-X100 al 0.1% por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego incubadas con buffer de bloqueo (BSA 0,1% + glicina 0,56mM + PHEM), conteniendo 5% de suero normal de burro. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios toda la noche a 4°C . Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios: Alexa Fluor Goat anti-rabbit 488 (concentración 1/1000, Sigma) y Cy5 650-680nm (concentración 1/1000, Chemicon) 2 horas a 37°C . El montaje de las

muestras se realizó con anti-fade prolong (Invitrogen) y se guardaron a 4°C hasta el momento de ser observadas.

4.4.2 Anticuerpos y sondas fluorescentes

Las diferentes proteínas y marcadores celulares fueron reconocidas por técnicas de inmunotinción indirecta usando anticuerpos primarios específicos: anticuerpo policlonal anti-PMP-22 (concentración 1/75, Millipore-Chemicom); anticuerpo monoclonal anti-Colágeno IV (concentración 1/200, Hibridoma Bank o el policlonal anti-collagen-IV (concentración 1/200, abcam). Se utilizó la sonda fluorescente Alexa Fluor 568 Phalloidin (concentración 1/120, Molecular Probes) para marcar el citoesqueleto de actina. Los núcleos de las células fueron teñidos con la sonda fluorescente 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (concentración 1/800).

4.4.3 Cuantificación de intensidad promedio de fluorescencia en células de Schwann +/+ y Tr-J/+.

La cuantificación de señal PMP-22 se realizó en fibras peinadas obtenidas de 2 individuos normales (+/+, n=10) y 2 individuos heterocigotos (Tr-J/+, n=10). Para realizar la cuantificación de los niveles de PMP-22 perinuclear, las muestras de tejido se incubaron con anticuerpo anti-PMP-22 (concentración 1/75, Millipore-Chemicom) y DAPI (concentración 1/800). El criterio utilizado para medir los niveles de señal anti-PMP-22 se describe a continuación:

- (1) Para cada canal, se tomaron imágenes a 60X (con zoom digital 2.5) de planos confocales de 0.5µm de espesor. Las imágenes fueron guardadas con las correspondientes escalas para posterior calibración.
- (2) Utilizando el programa Image-J (National Institutes of Health, USA, versión 1.44i) se obtuvo una imagen que corresponde a la suma de todos los planos confocales para cada canal por separado, y se calibraron hasta dejarlas a igual escala.
- (3) Para cada canal (anti-PMP-22 o DAPI) se cuantifico mediante una línea (de 20µm de longitud) la intensidad de señal medida desde el borde de la membrana nuclear 10µm en dirección citoplasmática y 10µm en dirección contraria (hacia el interior del núcleo).
- (4) Los datos de intensidad obtenidos a lo largo de esta línea fueron graficados y analizados estadísticamente mediante los programas QtiPlot 0.9.8.2 y Statistic.

4.4.4 Ensayos Bioquímicos (ver anexo)

Muestras de nervio ciático provenientes de 8 ratones (4 +/+ y 4 Tr-J/+) de entre 3 y 5 meses de edad se homogenizaron en buffer RIPA [Tris-HCl 10mM (pH 7.5), 5mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 0.5% deoxicolato y 150mM NaCl]. Las muestras fueron centrifugadas a 15.000 g por 30 min a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se resuspendió el pelet en buffer conteniendo Tris-HCL 10mM + 3% SDS. Las muestras resuspendidas fueron sonicadas y posteriormente se evaluó la cantidad de proteína total de cada muestra por medio de método de calibración por BCA usando el "Micro BCA Protein Assay Kit" (Thermo Scientific). Las muestras fueron corridas en gel de acrilamida/bis-acrilamida entre el 12-15%. Para la visualización de las bandas se usó Azul de Comassie. La digitalización de las imágenes se obtuvo por intermedio de un scanner convencional. Para los ensayos de western-blot se utilizó membrana de PVDF. Luego de la transferencia las membranas se bloquearon usando leche en polvo 50% en buffer TBS-T 1X por 1 hora. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti- β -actina (concentración 1/4000, Sigma), anti β -tubulina (concentración 1/1000, Covance). Los anticuerpos secundarios fueron: Alexa Fluor Goat anti-Rabbit 488 (Invitrogen), Alexa Fluor Goat anti-Mouse 488 (Invitrogen) y Cy5 Goat anti-mouse 633 (Invitrogen). La digitalización de las imágenes se realizó utilizando el Scanner FUJIFILM FLA-9000 modelo Starion usando el software Image Reader FLA-9000 ver 1.02.

5. RESULTADOS

Actualmente en la literatura, existe un solo reporte en el cual se empleó la Microscopía de Fuerza Atómica para generar imágenes de la superficie de las fibras de nervio ciático de ratones adultos normales y Trembler-J (Heredia et al., 2007). Desafortunadamente, dicho estudio menciona diferencias entre ambos fenotipos, pero de manera poco detallada e incompleta respecto de la organización de estas estructuras y su asociación con los procesos celulares vinculados a la patología. El presente trabajo pretende aportar datos acerca de la organización estructural y funcional de estas fibras a nivel topográfico y la relación de sus componentes celulares (células de Schwann y axones) tanto en condiciones normales como durante la manifestación del fenotipo mutante Trembler J. Con tal motivo, se estudiaron por MFA los nervios periféricos de ratones normales y Trembler-J. Estos resultados se consideran igualmente a la luz de otro análisis molecular in situ aportado por la microscopía confocal y complementados con estudios bioquímicos, del mismo tipo de muestra.

Básicamente, en el primer enfoque de esta tesis se determinó por Microscopía Confocal los principales dominios estructurales y moleculares de las fibras de nervio ciático de ratones adultos normales (+/+) y Trembler-J (Tr-J/+; modelo animal CMT1A). Mediante el método de peinado mecánico de las fibras nerviosas (técnica de “teasing”, ver materiales y métodos) y utilizando la marcación de proteínas axonales o gliales con anticuerpos y colorantes específicos, se pudo determinar que existen diferencias en la arquitectura celular y en el relacionamiento axo-glial al comparar las imágenes obtenidas entre los fenotipos +/+ y Tr-J/+.

5.1 Las células de Schwann mutantes Trembler-J muestran alteraciones estructurales.

Las imágenes obtenidas por Microscopía Confocal (Figura 13) corresponden a planos confocales donde se muestran las diferencias en la organización estructural de las fibras peinadas de nervio ciático para cada uno de los genotipos. La marcación de la proteína de mielina PMP-22 en la imagen superior correspondiente al fenotipo normal (Figura 13, +/+) el cual mostró una organización espacial confinada a compartimientos mielínicos (probables regiones de mielina compacta). En contraste con este resultado, la distribución de PMP-22 en la imagen inferior que corresponde al fenotipo Trembler-J mostró una localización diferente (Figura 13, TrJ-/+). Para este caso, se pudo observar una elevada señal de fluorescencia de anticuerpo anti-PMP-22 en el citoplasma de las CS mielinizantes, principalmente concentrada de forma intensa en la zona perinuclear de las CS (Figura 13, Tr-J/+ flecha).

En cuanto a la organización del citoesqueleto de actina-F, se observó que la distribución de estos filamentos en el genotipo +/+ se encuentra propiamente restringida a regiones celulares específicas como son el axoplasma neuronal (axón) y en regiones

de mielina laxa en el internodo de las CS (ej: Incisuras de Schmidt-Lanterman, SLI, flecha – Figura 13, +/+). Además, estas fibras presentaron regiones mielínicas a lo largo del internodo de las CS en la cuales no se detectó la presencia de actina (posible mielina compacta) pero si la presencia de la proteína PMP-22 (Figura 13, +/+, cm). Por otro lado, en las fibras Tr-J/+ (Figura 13, Tr-J/+) la distribución del citoesqueleto de actina parece ser más homogénea dificultando el reconocimiento y diferenciación de los dominios neuronales (axón) y gliales (Incisuras de Schmidt-Lanterman).

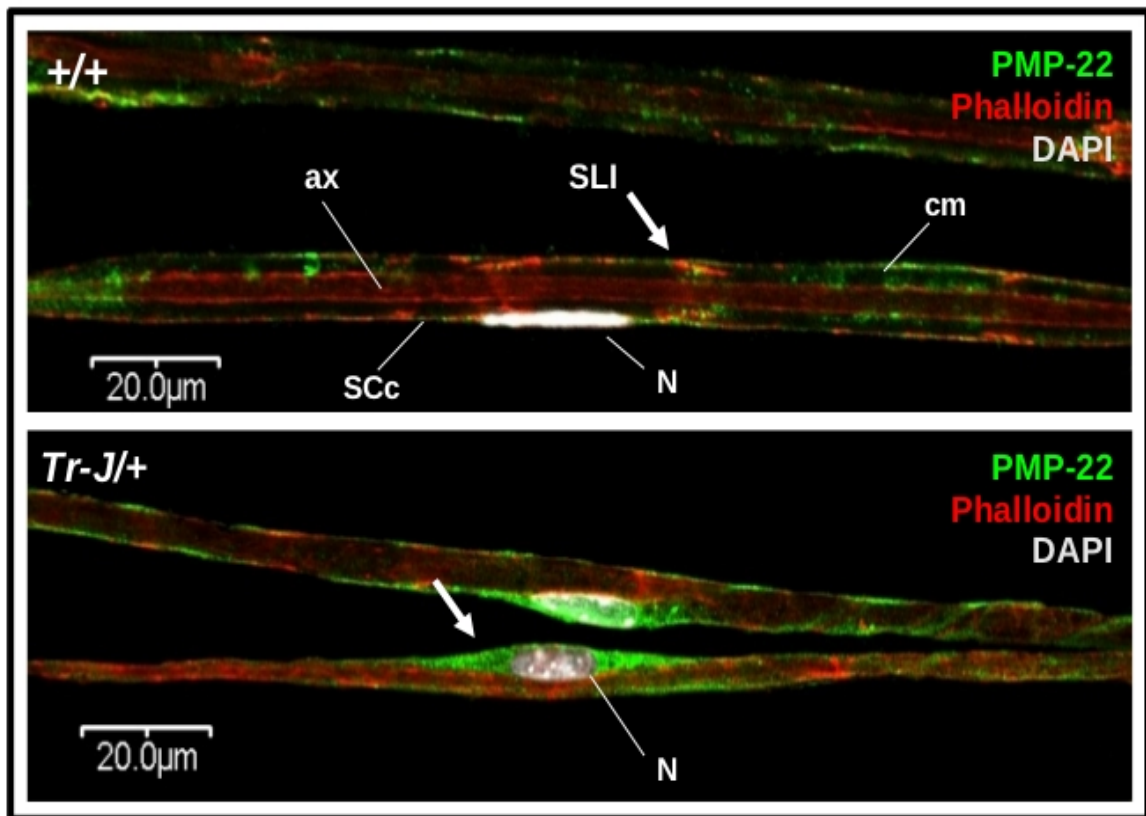


Figura 13. Distribución de la proteína PMP-22 y organización del citoesqueleto de actina. Las imágenes +/+ y Tr-J representan secciones confocales (0.5μm) de fibras de nervio ciático adulto de ratón normal y Trembler-J, respectivamente. Las muestras fueron incubadas con el anticuerpo anti-PMP-22 (verde) y la sonda fluorescente para el reconocimiento del citoesqueleto de actina-F (Phalloidin, rojo). Los núcleos de las células de Schwann se marcaron con el colorante DAPI (blanco). Las fibras +/+ presentan una distribución de PMP-22 en regiones de mielina compacta mientras que esta se encuentra restringida a las regiones perinucleares en el fenotipo Tr-J/+ (flecha). cm: mielina compacta; N: núcleo, flecha en +/+: Incisura de Schmidt-Lanterman (SLI).

5.2 La proteína PMP-22 permanece retrasada y se acumula en las regiones perinucleares de las células de Schwann Tr-J/+.

El efecto de la mutación en PMP-22 sobre las fibras mielínicas de nervio ciático de ratones normales y TrJ/+ fue evaluado a través de la cuantificación de su acumulación citoplasmática. Dicha acumulación se evaluó mediante la técnica de inmunohistoquímica utilizando un colorante nuclear (DAPI) y un anticuerpo anti-PMP-

22, midiendo la cantidad de señal fluorescente a lo largo de una región celular específica comprendida entre el núcleo y el citoplasma de la CS (línea amarilla en la imagen de la Figura 14 A y B). Los resultados obtenidos a partir de este experimento indican que la proteína PMP-22 posee muy altos niveles de acumulación citoplasmática, formando agregados “agregosomas” donde esta se encuentra más acumulada [flecha en figura 14 B']. La acumulación intracelular de PMP-22 en las CS de ratones Tr-J/+ podría ser un indicador de mal procesamiento de esta durante su síntesis así como también la alteración en el transporte de la misma desde los compartimientos celulares como el Aparato de Golgi o el retículo endoplásmico hacia la mielina. Según los datos obtenidos, la acumulación de la proteína PMP-22 en la región citoplasmática de las CS se encuentra incrementada al menos dos veces con respecto al fenotipo normal (Figura 14 C). Para las células Tr-J/+, la intensidad de PMP-22 en la región citoplasmática inmediata a la salida del núcleo tiene un valor aproximado de intensidad superior a los 200 unidades (Figura 14 C, línea negra en región “cytoplasm”), mientras que en la condición normal en esta misma región el valor es inferior a 100 (Figura 14 C, línea negra en región “cytoplasm”). Se observó, además, la presencia de la proteína PMP-22 en la región nuclear de las CS tanto para el genotipo +/+ como TrJ/+. Sin embargo, esta señal se encuentra incrementada en las CS Tr-J/+ (Figura 14 C, línea gris en región “nucleus”).

La figura 15 muestra una serie de planos confocales correspondientes a dos células de Schwann Tr-J/+ provenientes de un mismo individuo y paquete nervioso, teñidas con un marcador nuclear (DAPI) y con un anticuerpo contra la proteína PMP-22. Los planos confocales fueron seleccionados de tal forma que abarcase todo el volumen nuclear para ambas células. Las imágenes muestran claramente que solo una de estas células presenta marcación de PMP-22 dentro del núcleo, mientras que ambas células presentan marcación perinuclear de PMP-22.

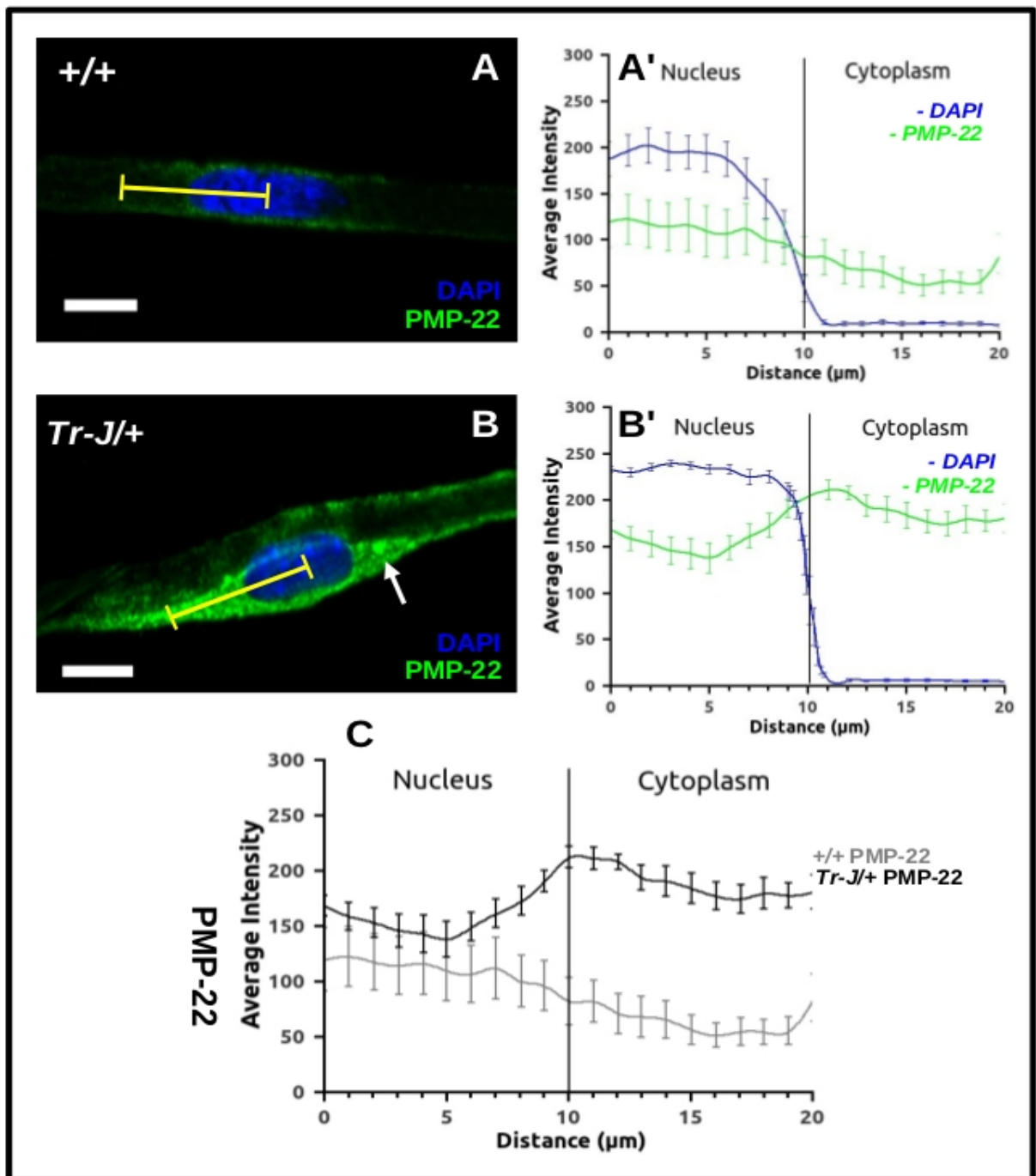


Figura 14. Acumulación perinuclear de PMP-22 en células de Schwann *Tr-J/+*. Las imágenes (A) y (B) corresponden a imágenes confocales representativas de células de Schwann formadoras de mielina normal (+/+) y Trembler-J (*Tr-J/+*), respectivamente. Las células fueron marcadas con anticuerpo anti-PMP22 (verde) y con el colorante DAPI (azul) para teñir el núcleo. La flecha blanca en (B) representa un agrosoma de PMP-22. Las gráficas (A') y (B') representan el promedio de intensidad de fluorescencia medido para anti-PMP-22 (línea verde, n=10) y DAPI (línea azul, n=10) a lo largo de la línea amarilla de 20µm de longitud comprendida entre el núcleo y el citoplasma de las CS tal como se muestran en (A) y (B). El gráfico en (C) compara la variación de señal anti-PMP-22 normal (+/+, línea gris) y Trembler-J (*Tr-J/+*, línea negra). La señal perinuclear de PMP-22 en las CS *Tr-J/+* está incrementada al menos dos veces en comparación con las CS +/+. Imágenes a 150X, 8 bit, tamaño 95.11µm x 95.11µm. Barra en (A) y (B) = 10µm.

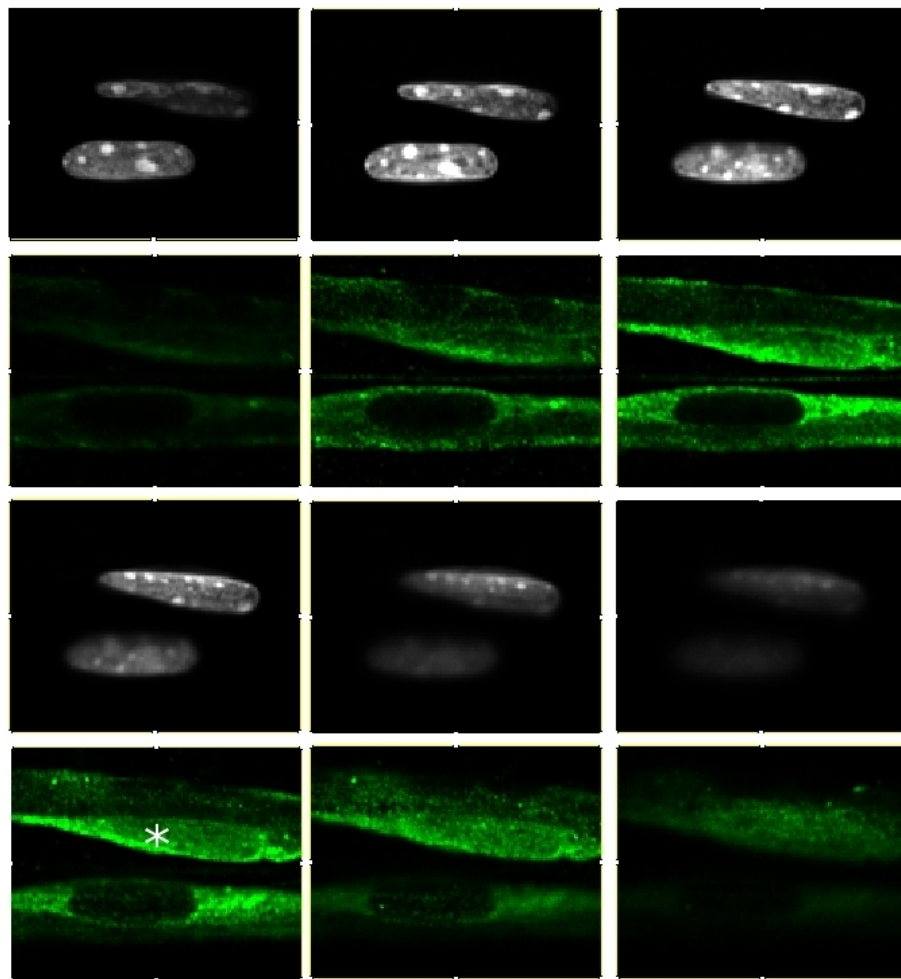


Figura 15. Localización perinuclear y nuclear de la proteína PMP-22 en células de Schwann Tr-J/+. Las imágenes representan 6 planos confocales de 0.5µm de espesor correspondientes a dos células de Schwann Tr-J/+ marcadas con el sonda fluorescente DAPI (gris) y con anticuerpo anti-PMP-22 (verde). Claramente, una de las células de Schwann presenta una marcación de PMP-22 dentro del núcleo (asterisco), mientras que ambas células muestran acumulación de PMP-22 en la región perinuclear. Magnificación 150X.

5.3 Las fibras de nervio periférico de ratones adultos Tr-J/+ presentan alteraciones en la matriz extracelular y la lámina basal.

El análisis topográfico por MFA de las fibras nerviosas periféricas de ratones +/+ y TrJ/+ nos permitió reconocer la expresión extracelular del genotipo Trembler J. De esta forma, mediante MFA, fue posible generar imágenes topográficas de alta resolución de las fibras. El estudio de la matriz extracelular reveló diferencias estructurales en la organización de la superficie exterior de las fibras entre ambos genotipos.

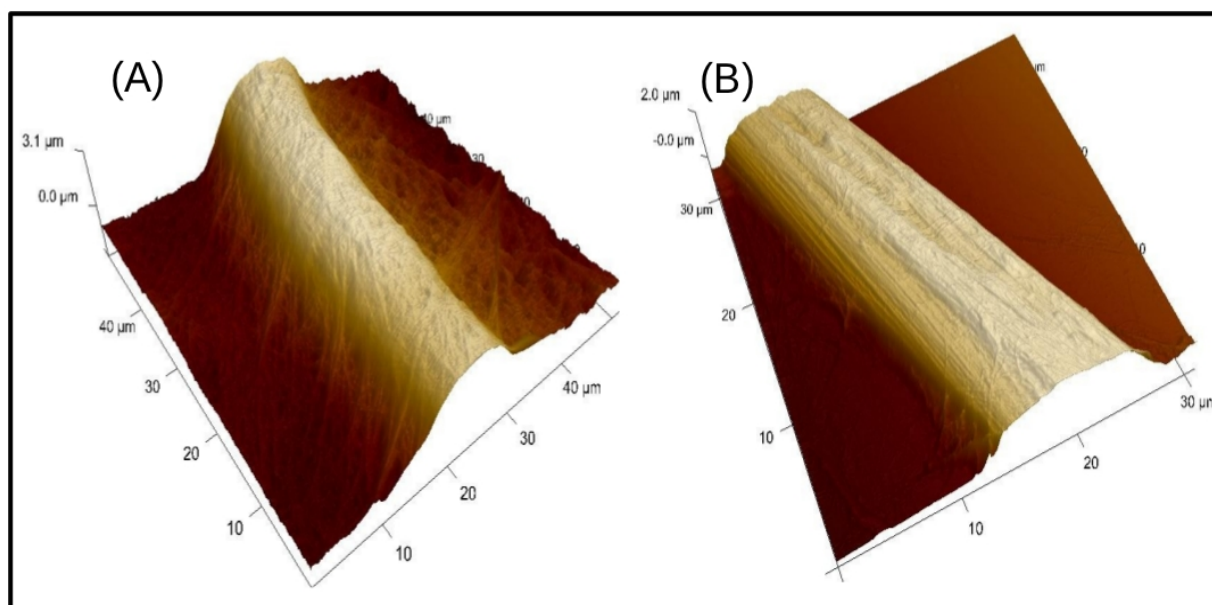


Figura 16. Topografía superficial representativa del nervio ciático de ratón adulto vista por MFA.

Las imágenes en (A) y (B) representan reconstrucciones en 3D de la topografía de las fibras de nervio ciático de ratón adulto (3 meses) normal (+/+) y Trembler-J (Tr-J/+), respectivamente. Las imágenes fueron tomadas en modo contacto bajo condiciones líquidas (buffer fisiológico). La topografía de las fibras +/+ presenta una mayor cantidad de estructuras filamentosas que forman una malla sobre el conjunto axón-célula de Schwann. La superficie externa de las fibras Tr-J/+ muestra un patrón “mas liso” comparado con +/+. Resolución 512 x 512 pixeles.

Las imágenes topográficas por MFA que se muestran en la figura 16 fueron obtenidas de fibras aisladas de nervio ciático provenientes de ratones hermanos adultos (3 meses) +/+ (A) y Tr-J/+ (B). A partir de la observación de las imágenes topográficas, los resultados obtenidos sugieren que existen diferencias entre las superficies de la fibras nerviosas +/+ y Tr-J/+, en particular, a nivel de la organización estructural de la MEC y la lámina basal. Se generaron así, las imágenes de altura y deflexión. Las imágenes de deflexión brindan información acerca de los cambios en la deflexión del cantilever durante el escaneo. De esta forma pueden observarse los detalles de la superficie de la muestra, mientras que las imágenes de altura contienen información cuantitativa acerca de la topografía de la superficie. El rango de alturas para las fibras +/+ y Tr-J/+ medidas fue de 2-10μm y el ancho de 6μm hasta más de 12μm. La imagen topográfica correspondiente al genotipo Tr-J/+ (Figura 16B) mostró una superficie más lisa en comparación con las fibras +/+ (Figura 16A).

Un análisis estructural más en detalle de la superficie de las fibras se muestra en la figura 17. La superficie de las CS Tr-J/+ mostró una organización de la MEC y la lamina basal diferente a las fibras nerviosas +/+. En las imágenes correspondientes al genotipo +/+ (Figura 17 A, A', A''), se observó como característica principal la presencia de un patrón de organización en el cual estructuras formadoras de filamentos se organizan formando un malla o red sobre la superficie de la CS, principalmente en las regiones internodales. La superficie de las fibras Tr-J/+ carecen de este patrón

estructural en su superficie (Figura 17 B-B'') presentando una disposición mayormente longitudinal y paralela al eje mayor del axón (Figura 17 B).

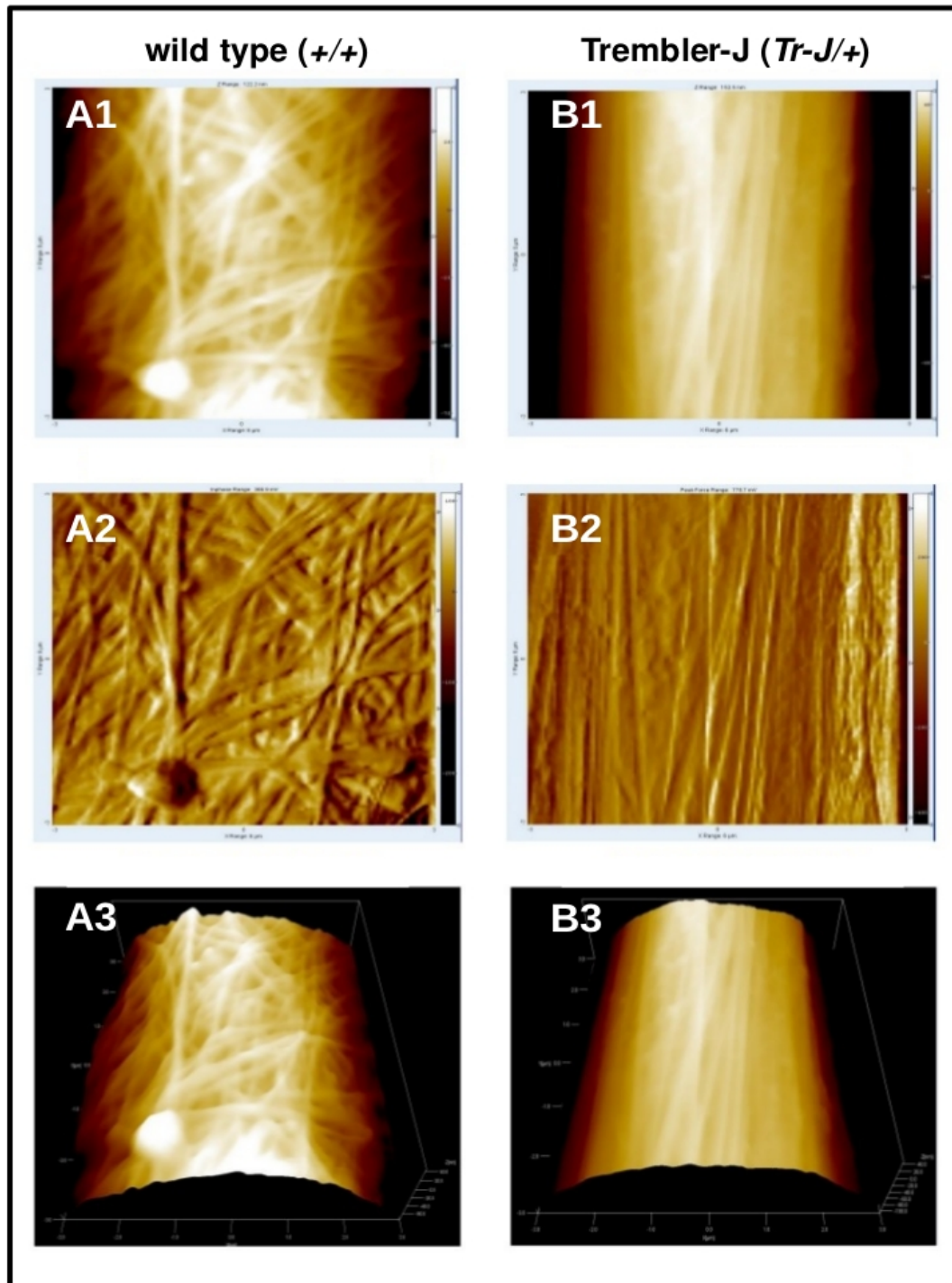


Figura 17. Imágenes topográficas representativas de la superficie de las Células de Schwann +/+ y *Tr-J/+* por MFA. Las imágenes fueron obtenidas en modo contacto utilizando puntas de forma cónica (V-shaped, DNP-10, $k_c=0.06$ N/m, Bruker probes) en medio líquido (buffer salino, PHEM) bajo condiciones "tipo fisiológicas". Las imágenes (A y B) representan imágenes de altura (A1 y B1), deflexión (A2 y B2) y reconstrucción en tres dimensiones (3D) de las fibras nerviosas para los genotipos +/+ (A, A1, A2) y *Tr-J/+* (B, B1 y B2) respectivamente. Las imágenes topográficas de la lámina basal de las

fibras +/- mostraron un típico arreglo en forma de red o malla podría corresponder a fibras de Colágeno IV. De forma interesante, las fibras Tr-J/+ no presentan este patrón representativo. Tamaño de las imágenes: 6µm x 6µm. Resolución: 512 x 512 pixels.

5.4 Alteración de la MEC en células de Schwann: tratamiento enzimático en fibras de nervio ciático con collagenasa.

Se estudiaron las alteraciones extracelulares en la topografía de las fibras inducidas por la digestión con enzima collagenasa. A través de un tratamiento enzimático sobre las fibras mecánicamente separadas, se investigó las modificaciones en la organización de la MEC y lamina basal. Las fibras +/- y Tr-J/+ separadas mecánicamente se sometieron a un tratamiento bioquímico con enzima collagenasa a tiempos variables de incubación (entre 0-30 minutos). Utilizando el MFA en modo contacto en condiciones líquidas “tipo fisiológicas” se generaron imágenes de la superficie celular de las fibras. Las imágenes de la figura 18 muestran el aspecto topográfico de superficie de las fibras +/- y Tr-J/+ antes y después de 30 minutos de incubación con la enzima collagenasa.

Como primer observación, tanto las fibras +/- como Tr-J/+ que recibieron tratamiento enzimático mostraron diferencias topográficas respecto sus respectivos controles (sin tratamiento). Tanto para las fibras +/- como Tr-J/+, luego del tratamiento enzimático no se observaron fibras de tipo colágeno sobre las superficies [Figura 18 (+/+ + 30 min colag) y (Tr-J/+ + 30 min colag)]. En las fibras +/-, la organización en forma de red que caracteriza la superficie de las CS desaparece completamente luego de 30 minutos de incubación con la enzima (Figura 18, +/- + 30 min colag). Las imágenes de las fibras Tr-J/+ luego del tratamiento enzimático mostraron una topografía de superficie de aspecto comparable a la presentada por las fibras +/- incubadas con la enzima [Figura 18 (+/+ + 30 min colag) y (Tr-J/+ + 30 min colag)]. Se observó además que la mayoría de las fibras sometidas a tratamiento enzimático presentan estructuras de la superficie que posiblemente se corresponden con “parches de membrana” o restos de lámina basal y proteínas de superficie remanentes producto de la acción enzimática.

La digestión enzimática controlada con collagenasa exógena, mostró que, al menos, la estructura en forma de red desaparece cuando fibras nerviosas de ratones +/- son sometidas a este tratamiento.

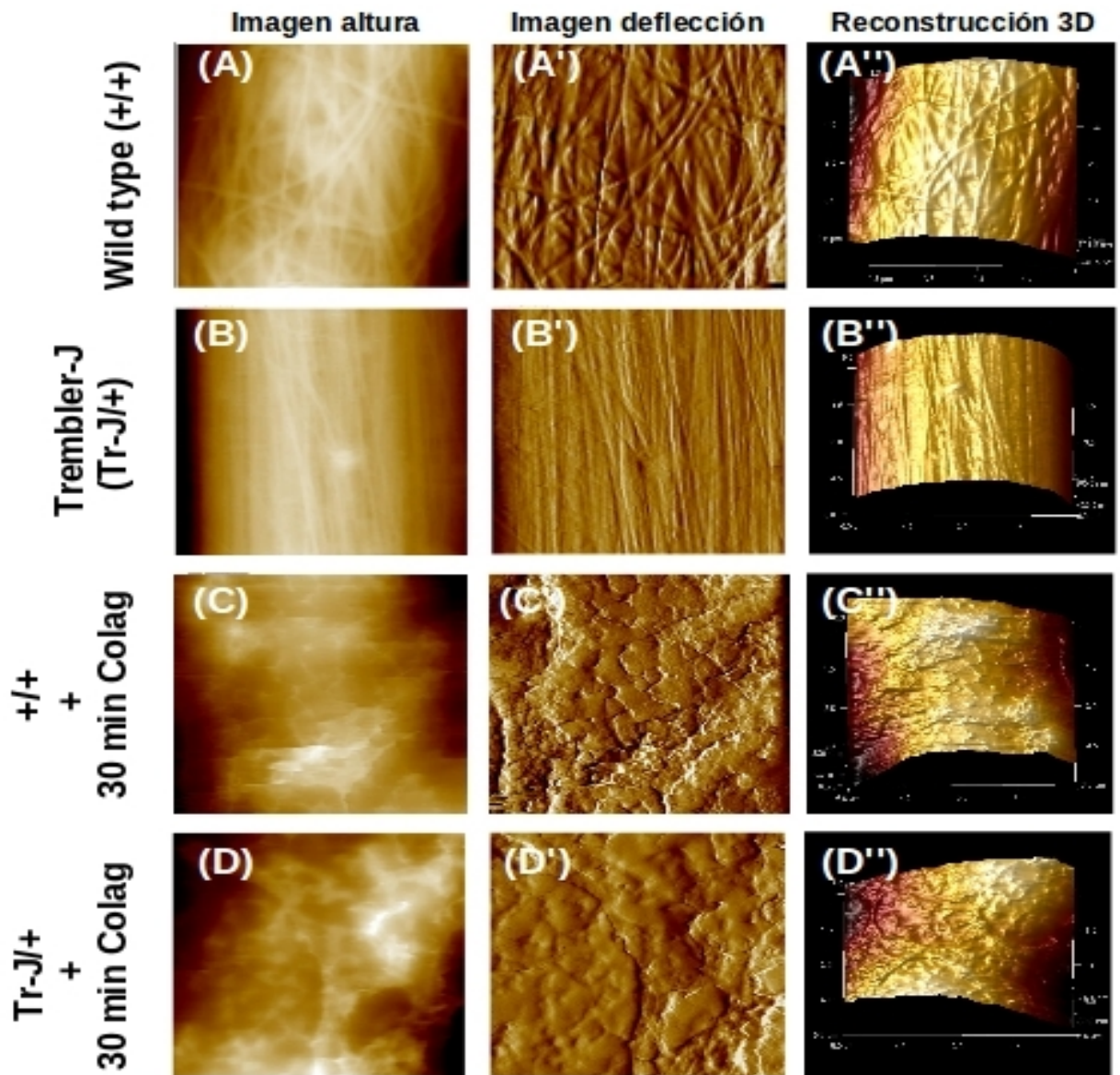


Figura 18. Tratamiento de las fibras de nervio ciático con enzima collagenasa. Imágenes topográficas de superficie de las células de Schwann obtenidas por MFA en modo contacto en condiciones buffer “tipo fisiológicas” antes y después de la incubación con enzima collagenasa (0.225 mg/mL). Las imágenes (A-D) representan imágenes de altura, (A'-D') de deflexión y (A''-D'') de reconstrucción en 3D. Las imágenes (A-A'') y (B-B'') corresponden a la topografía de las células de Schwann +/+ y Tr-J/+ que no recibieron tratamiento enzimático. Las imágenes (C-C'') y (D-D'') corresponden a la topografía de las células de Schwann +/+ y Tr-J/+, incubadas con la enzima collagenasa por un periodo de 30 minutos. Tamaño de las imágenes 6µm x 6µm. Resolución 256 x 256 pixeles.

5.5 Análisis de rugosidad de superficie (Ra) en fibras de nervio ciático de ratón adulto +/+ y Tr-J/+.

Una de las ventajas de la MFA no solo es su capacidad de generar imágenes de alta resolución de muestras biológicas en condiciones “fisiológicas”, sino además aporta información relevante acerca de la organización estructural de las superficies.

En otras palabras, a partir de imágenes topográficas de las muestras es posible medir y cuantificar de forma precisa las dimensiones y organización de estructuras y complejos de moléculas en la superficie de las células. Propiedades de superficie tales como la profundidad de la rugosidad media (Rz) y la rugosidad media (Ra) podrían ser capaces de aportar datos acerca de la organización estructural de la superficie de las fibras de nervio periférico. Con el objetivo de profundizar en el análisis de la estructura de superficie de las células de Schwann y los axones, se analizó la rugosidad media (Ra) de superficie de las fibras de nervio ciático de ratones +/+ y Tr-J/+. Durante este análisis, se emplearon además imágenes correspondientes a fibras +/+ y Tr-J/+ antes y después de ser incubadas por 30 minutos con colagenasa.

El método empleado y la disposición de los cuadrantes de $1.5\mu\text{m}^2$ usados sobre las imágenes topográficas de MFA para el cálculo la rugosidad media de superficie (Ra) se representa en la figura 19A. Los valores de Ra promedio (nm) para cada condición estudiada se representan en la Figura 19B. Los resultados obtenidos mostraron que las fibras +/+ sin tratamiento poseen los valores de rugosidad más altos en comparación al resto de las condiciones analizadas. Los valores de Ra obtenidos para las fibras sin tratamiento enzimático fue de 36.4 ± 2.2 y 19.4 ± 3.6 para los genotipos +/+ y Tr-J/+, respectivamente (Figura 19B).

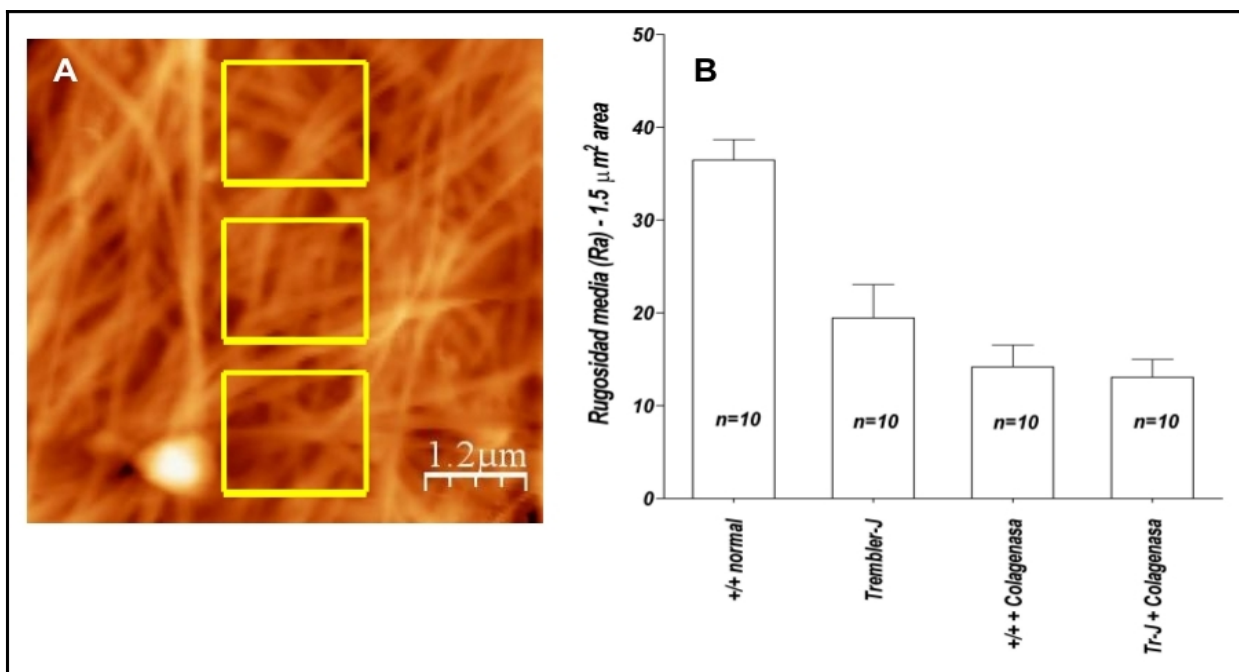


Figura 19. Análisis de rugosidad de la superficie de las células de Schwann normales y Trembler-J. En este análisis se emplearon imágenes topográficas para cada condición (ej: tratamiento y no-tratamiento). La imagen topográfica por MFA en (A) representa el posicionamiento de los 3 cuadrantes (recuadros amarillos = $1.5\mu\text{m}^2$) utilizados para el cálculo de (Ra). El gráfico en (B) representa los valores de (Ra) promedio obtenidos para el genotipo +/+ (n=10) y Tr-J/+ (n=10) no tratadas, y los obtenidos para +/+ (n=10) y Tr-J/+ (n=10) después de 30 minutos de incubación con colagenasa. Imagen A= $6\mu\text{m} \times 6\mu\text{m}$. Resolución 256X256 (flatten). Tamaño de escala = $1.2\mu\text{m}$.

Luego del tratamiento enzimático, se obtuvieron valores de Ra similares tanto para los genotipos +/+ como Tr-J/+ (Figura 19B). Los valores de Ra obtenidos fueron de: 14.6 ± 2.2 para las fibras +/+ y 13.1 ± 1.7 para las Tr-J/+.

5.6 Presencia de colágeno tipo IV en las regiones perinucleares de células de Schwann Tr-J/+.

De qué forma se ve afectada la MEC y la lamina basal de las CS y como este fenómeno se encuentra asociado a la mutación en el gen *pmp-22*, son aspectos de esta enfermedad que aún se desconocen. Según nuestros datos, las imágenes por MFA proveen de evidencia experimental acerca de la organización de la MEC y la lámina basal de las fibras individuales aisladas de nervio ciático de ratón +/+ y Tr-J/+. Un aspecto relevante que nos propusimos investigar es de que manera estos componentes estructurales se distribuyen sobre las CS +/+ y Tr-J/+ en asociación con los axones que estas envainan. Con el objetivo de profundizar en el estudio de la MEC y la lámina basal de estas fibras de nervio ciático, empleamos la microscopía confocal para investigar la distribución de las moléculas de colágeno tipo IV y su asociación con la proteína PMP-22.

El correcto ensamblaje y organización de los componentes moleculares de la MEC en combinación con la presencia de lámina basal, son factores importantes que cumplen roles claves en el inicio de la proliferación de las CS y la mielinización de los axones del SNP (Chernousov et al., 2008; Yu et al., 2009). La síntesis de lamina basal es importante para el mantenimiento de la estructura mielínica en el nervio maduro (Chernousov et al., 2008; Misko et al., 2002). El colágeno de tipo IV es el componente estructural más abundante de las membranas basales de las CS (Nakasato et al., 1996; Adachi et al., 1997). Las imágenes de fluorescencia correspondientes planos focales únicos de la figura 20 muestra la distribución de PMP-22 y del colágeno de tipo IV en las CS provenientes de ratones adultos +/+ y Tr-J/+. Los planos focales correspondientes a las CS Tr-J/+ mostraron una acumulación intracelular de PMP-22 y colágeno tipo IV (flechas, Figura 20 Tr-J/+). La distribución de colágeno IV también mostró una distribución alrededor del núcleo de las CS Tr-J/+, al igual que PMP-22. La distribución de colágeno tipo IV en las CS +/+ se limita únicamente a las regiones más externas de las fibras correspondiente a la lámina basal de las CS (Figura 20, +/+ flechas). Se observa además la presencia de PMP-22 en el núcleo de las CS Tr-J/+.

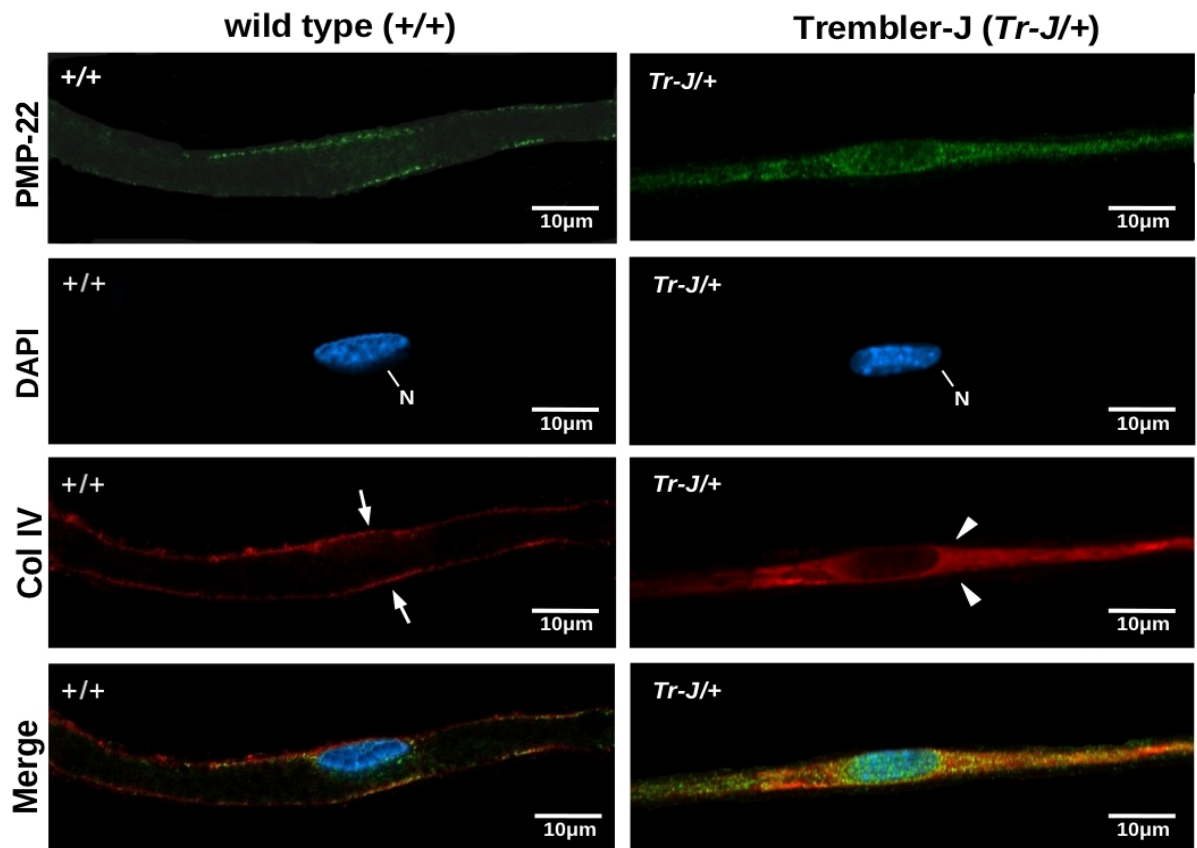


Figura 20. Acumulación perinuclear de Colágeno tipo IV en células de Schwann *Tr-J/+*. Las imágenes representan planos confocales de 0.5µm correspondientes a fibras periféricas de nervio ciático normal (+/+) y Trembler-J (*Tr-J/+*), respectivamente. Las muestras fueron incubadas con anticuerpo anti-PMP-22 (verde) y anti-Colágeno IV (Col IV, rojo). Los núcleos de las células de Schwann se marcaron con colorante DAPI (azul). Las células de Schwann pertenecientes a el genotipo *Tr-J/+* presentan una co-localización parcial (imagen Merge) entre la señal perinuclear anti-PMP-22 y la señal anti-Colágeno IV. Magnificación = 150X. Tamaño de escala = 10µm.

5.7 Las fibras *Tr-J/+* presentan cambios en las propiedades mecánicas y en la organización del citoesqueleto de actina-F.

Por último, se estudiaron las propiedades mecánicas de las fibras miélicas de nervio adulto +/+ y *Tr-J/+*. Los datos de las propiedades mecánicas de las fibras fueron medidos realizando curvas de fuerza vs distancia a lo largo de varios puntos sobre la superficie de las fibras. Luego de varios minutos de escaneo de las muestras (10' aproximadamente), las curvas de fuerza vs distancia fueron tomadas sobre la parte más alta de las células y se obtuvo información acerca de la rigidez de las fibras nerviosas. Se tomaron medidas a lo largo de la región internodal en varias CS (+/+ n=8; *Tr-J/+* n=8, Figura 21A). Las líneas en la figura 21A representan el promedio de las curvas de fuerza vs distancia (de aproximación) obtenidas sobre la superficie de las fibras +/+, *Tr-J/+* y el control (vidrio). El promedio de la constante de deflexión del cantiléver determinada durante la sesión de medidas elásticas fue de $k_c = 0,63 \text{ N/m}$.

Los resultados obtenidos indican que las fibras Tr-J/+ poseen una tendencia a ser menos rígidas (línea azul y roja Figura 21 A) que las fibras +/+. La pendiente de la curva es más pronunciada en el caso de el genotipo +/+ en comparación con la curva correspondiente a Tr-J/+. Se calcularon los valores de elasticidad según Mathbur et al., 2001 y Collinsworth et al., 2002. Los valores de elasticidad (E) obtenidos fueron de: 94 MPa para el control, 4,5 MPa para +/+ y 3,3 MPa el genotipo Tr-J/+.

Con el objetivo de evaluar la organización del citoesqueleto de actina, las fibras +/+ y Tr-J/+ fueron teñidas con colorante faloidina (marcador de actina-F). Las fibras +/+ se caracterizan por la presencia de una organización típica del citoesqueleto de actina más estructurado, evidente en los nodos de Ranvier y las estructuras cónicas correspondientes a incisuras de Schmidt-Lantermann (magnificación en Figura 21B +/+). La organización del citoesqueleto de actina-F en las fibras Tr-J/+ presenta un patrón de distribución diferente (Figura 21B Tr-J/+).

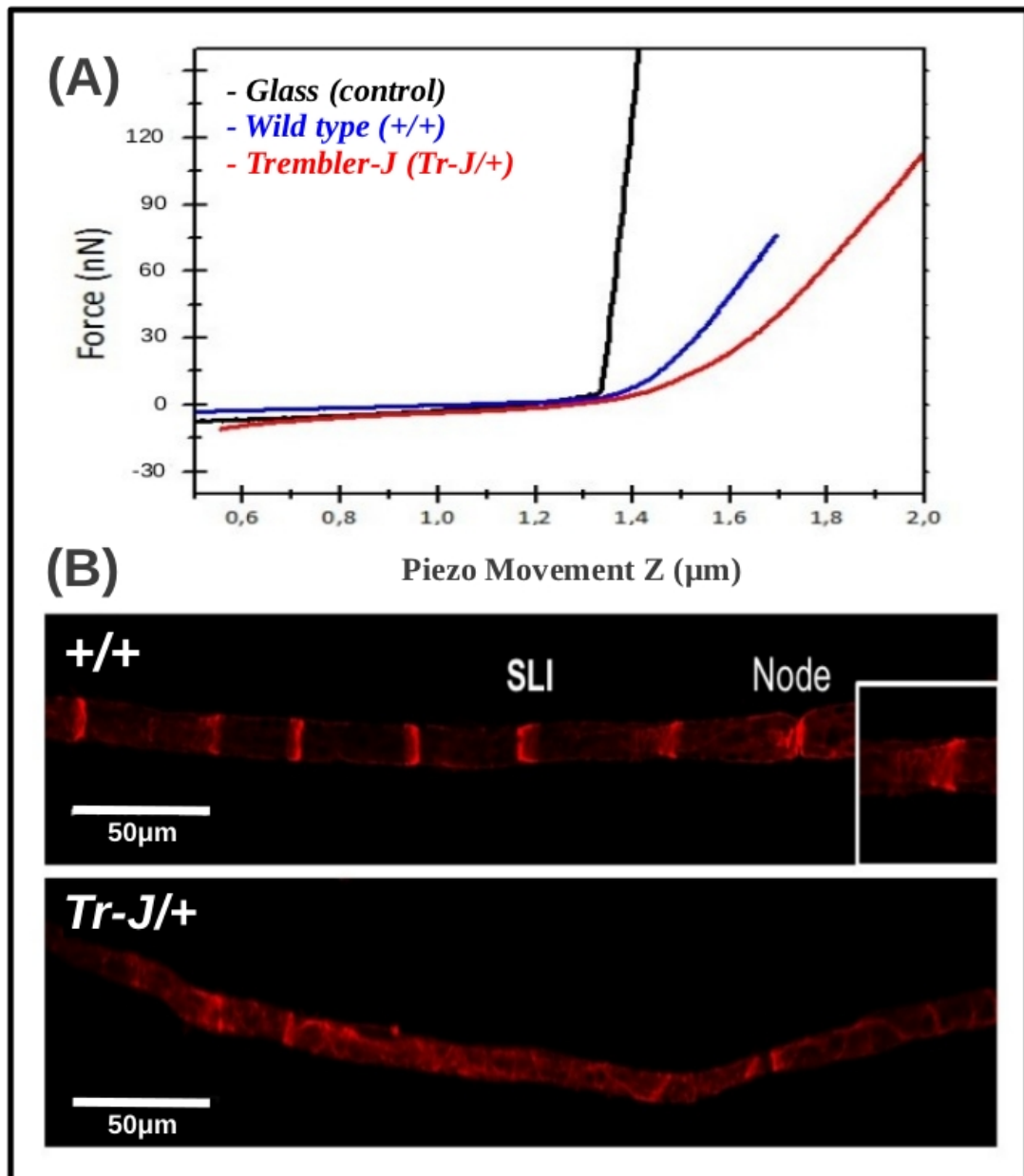


Figura 21. Propiedades mecánicas de las fibras nerviosas y organización del citoesqueleto de actina. Las curvas de fuerza fueron generadas sobre la superficie de las fibras fijadas. Luego que las fibras fueron escaneadas por varios minutos, se continuo con las medidas de elasticidad, las cuales se representan como curvas de fuerza vs distancia en el gráfico (A). Las líneas representan las medidas obtenidas correspondientes a la fibra normal (línea azul, $n=8$), Trembler-J (línea roja, $n=8$) y sobre vidrio (línea negra, $n=3$, control). Según los resultados obtenidos a partir de la pendiente de las curvas, las fibras Tr-J/+ tiene la tendencia de ser menos rígidas en comparación con las fibras normales. Punta: DNP-10 (V-shaped, Bruker); radio 20nm. Los valores de elasticidad (E) calculados son: 94MPa (control), 4,5MPa (+/+) y 3,3MPa (Tr-J/+). La imagen confocales en (B) representa las organización de las fibra de nervio periférico normal (+/+) y Trembler-J (Tr-J/+) teñidas con Faloidina para visualización del citoesqueleto de actina (actina-F). Las fibras +/+ fueron caracterizadas por la organización típica del citoesqueleto de actina evidente en los nodos de Ranvier (Node) y la distribución periódica de las Incisuras de Schmidt-Lanterman (SLI). El recuadro blanco en la figura +/+ muestra la estructura cónica de las ISL correspondiente a regiones de mielina no-compacta de los internodos de las células de

Schwann. La figura Tr-J/+ muestra una organización del citoesqueleto de actina alterada. Magnificación 60X.

6. DISCUSIÓN

La presente tesis de Maestría presenta un estudio sobre las diferencias topográficas, fisio-mecánicas y moleculares por MFA y confocal de fibras periféricas de nervio ciático de ratones normales y Trembler-J portadores de mutación en *pmp-22*. Se analizó el aspecto estructural y supramolecular de la matriz extracelular y la lámina basal de las células de Schwann en ratones normales y mutantes PMP-22. Se observaron diferencias en la organización estructural de la superficie de las fibras nerviosas patológicas al compararse con las fibras sanas. Por MFA pudo determinarse que estas diferencias se fundamentan en la organización de las moléculas de colágeno de tipo-IV y su distribución sobre la superficie de las fibras aisladas y separadas mecánicamente (Figura 16 y 17). Los datos presentados se complementan con el análisis por microscopía confocal de la distribución de la proteína PMP-22 y colágeno IV, en conjunto junto con otros marcadores estructurales de las fibras nerviosas.

Según la bibliografía consultada, este patrón de organización estructural sobre la superficie de las CS en el cual las fibras de colágeno adoptan una conformación estructural en forma de red se corresponde con la organización del colágeno de tipo IV (Chernousov et al., 2008). Este es un componente ubicuo de las membranas basales - láminas de matriz que se encuentran por debajo de las células epiteliales y que también rodean a la fibra nerviosa periférica (formadas por el axón y las células de Schwann que lo envainan) (Ushiki et al., 1990; Chernousov et al., 2008). Diferencias en el contenido de colágeno de tipo-IV han sido reportadas en fibras nerviosas de ratones Trembler-J por aproximaciones bioquímicas (Misko et al., 2002). No está aún completamente comprendido como la expresión de *pmp-22* estaría relacionada con la constitución de la lámina basal y de que forma la mutación puntual en este gen es capaz de modificar las propiedades de la MEC de las fibras periféricas en los ratones heterocigotos Trembler-J. Amici y colaboradores (2006) han reportado que la proteína PMP-22 es capaz de formar complejos con la molécula β -integrina y su ausencia altera la lámina basal de las células de Schwann de ratones adultos, sugiriendo que PMP-22 podría tener un rol en la interacción de las células de Schwann con el medio extracelular.

Un estudio más reciente, indica que los niveles de expresión de proteína PMP-22 en asociación con integrinas podrían ser un importante eslabón en el mantenimiento de la integridad celular en tejido endometrial, influenciando la adhesión de estas células a las proteínas de la MEC (Rao et al., 2011). Las integrinas cumplen una importante función en el anclaje de las células a la MEC y son capaces de mediar señales químicas que funcionan bidireccionalmente (intracelulares y extracelulares) regulando el comportamiento celular. Por ejemplo, estos complejos macromoleculares de membrana ofician de puente conector entre las proteínas de la MEC y las moléculas de actina cortical del citoesqueleto (Sherman et al., 2001). Otras evidencias

experimentales señalan la pérdida de lámina basal asociadas a reducidos niveles de integrina $\alpha 6\beta 4$ en nervios periféricos de ratones homocigota knock-out para PMP-22. Esto podría sugerir que PMP-22 posee un rol en la estabilización de las moléculas de integrina en la membrana de las CS (Amici et al., 2006).

Nuestros resultados de microscopía confocal indican que la proteína PMP-22 mutada se acumula formando agregados en la región perinuclear de las CS Trembler-J (Figura 13 y 14). Estos resultados están en concordancia con reportes previos que señalan en las CS mielinizantes de ratones Trembler-J la presencia de PMP-22 formando agregados citoplasmáticos, en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi (Notterpeck et al., 1999; Ryan et al., 2002; Fortun et al., 2003; Fortun et al., 2005). PMP-22 se encuentra presente además, junto con otras proteínas mielínicas y no-mielínicas en endosomas y lisosomas de CS Trembler-J, lo cual sugiere altos niveles de degradación proteica en lo que respecta al metabolismo celular (Suter y Snipes, 1955b). Es posible que la cantidad de PMP-22 “marcada para degradación” se encuentre incrementada en las CS Trembler-J, lo que podría recargar la actividad de degradación de proteína por el complejo ubiquitina-proteosoma, conduciendo a la acumulación de proteínas mal plegadas a lo largo de la vía de secreción. Este circuito metabólico redundante es una de las bases moleculares de esta neuropatía hereditaria CMT1A.

Las CS y los fibroblastos son capaces de secretar varias formas de colágeno así como también componentes de la MEC tales como laminina y fibronectina (Obremski et al., 1993a, 1993b). Nuestros datos indican que la proteína colágeno de tipo-IV se encuentra acumulada colocalizando parcialmente con la proteína PMP-22 en la región perinuclear de las CS Trembler-J (Figura 20). La naturaleza molecular de esta hallazgo original debiera ser explorada para profundizar en la comprensión de los mecanismos celulares implicados en la neurogénesis de CMT1A.

Desde el punto de vista fisio-mecánico, fue posible determinar diferencias en la rigidez celular al comparar ambos genotipos así como también obtener información acerca de la elasticidad en cada una de estas fibras. Por razones de orden práctico, se comparó la elasticidad de las fibras nerviosas fijadas. Esto tiene dos ventajas principales: 1) es más fácil la obtención de imágenes debido a que las muestras no son tan blandas, 2) es posible trabajar con el material biológico durante periodos más prolongados de tiempo ya que el fijador previene la degradación del tejido vivo. De acuerdo con datos previos (Heredia et al., 2007), las fibras de nervio periférico proveniente de ratones Trembler-J son más blandas comparadas con las normales (Figura 21A). Nuestros resultados indican que los valores de elasticidad calculados sobre las fibras nerviosas fijadas fueron mayores para el genotipo +/+ (4.5 MPa) en comparación con los obtenidos para el Tr-J/+ (3.3 MPa). Estos valores superan ampliamente los valores de elasticidad correspondientes a las células sin fijar (0.1MPa) que aparecen en la literatura (Mathbur et al., 2001; Collinsworth et al., 2002 y Heredia et al., 2007). Es probable que para nuestro caso, los valores elevados de elasticidad obtenidos puedan explicarse debido al efecto del fijador (concentración y tiempo de fijación). No obstante, para obtener medidas comparativas de elasticidad que

aporten al estudio relevancia fisiológica, se deberá implementar en futuros experimentos, el estudio de material biológico sin fijar. Este será un paso relevante que permitirá evaluar la elasticidad natural de las células nerviosas (corrigiendo la modificación incorporada por el fijador) determinando así el módulo de Young en fibras vivas del SNP de mamíferos.

Respecto a los cálculos de rugosidad media de la superficie de las fibras, es importante tener en cuenta al momento de interpretar los resultados las siguientes cuestiones: (a) el cálculo de R_a medido corresponde al promedio de 3 cuadrantes de $1.5\mu\text{m}^2$ dispuestos sobre la fibra como indica la figura 19A. Esta disposición elegida no necesariamente refleja la rugosidad media total de la fibra. (b) podrían existir variaciones en la rugosidad local al comparar los cuadrantes sobre la superficie de una misma fibra. Como perspectiva para un futuro y más completo análisis de la rugosidad en estas muestras, podríamos investigar las diferencias dentro de cada cuadrante y emplear diferentes áreas con el objetivo de determinar de forma aproximada la rugosidad total de las muestras.

Los filamentos de actina filamentosa son la principal proteína formadora de red de citoesqueleto involucrada en la mecánica cortical y por consiguiente en la elasticidad celular (Rotsh y Radmacher et al., 2000; Radmacher, 2002). Este trabajo reporta que la organización de citoesqueleto filamentoso de actina (actina-F) se encuentra disrumpido en las fibras nerviosas proveniente de ratones pmp-22 mutantes (Figura 21B). Estos resultados podrían ser concordantes con las diferencias de elasticidad de las fibras calculadas para cada uno de los genotipos. Una posible hipótesis que podría explicar este fenómeno es la no inserción de PMP-22 en la mielina compacta, pudiendo alterar así las propiedades mecánicas de la mielina y el citoesqueleto de las fibras nerviosas Trembler-J. Un aspecto importante de este estudio es el hecho de que en los ratones Trembler-J la severidad de la enfermedad se ve reflejada en las propiedades mecánicas de las fibras. El rol de PMP-22 en el SNP y su relación con el citoesqueleto de actina y la MEC está aún escasamente explorado. El presente trabajo contribuye con información a nivel estructural y mecánico (obtenido por MFA y microscopía confocal) para una mejor comprensión del rol de la proteína PMP-22 en el SNP.

El uso de la Microscopía Confocal en combinación con técnicas de inmunocitoquímica permitió en este estudio un reconocimiento estructural de las fibras mielínicas utilizando la técnica de “teasing”. Además, fue posible un análisis estructural y del estado fisiológico del conjunto axón-célula Schwann a nivel de las fibras aisladas.

Los resultados obtenidos a partir de las imágenes confocales sugieren que existen diferencias en la organización estructural de las fibras de nervio ciático de ratón adulto +/+ en comparación con las obtenidas de ratones portadores de la mutación en la proteína mielínica PMP-22. Las diferencias más notorias se observan en la acumulación de PMP-22 rodeando el núcleo de las CS Tr-J/+. Ciertos estudios (Notterpek et al., 1997) han reportado que la formación de agregosomas citoplasmáticos de PMP-22 formados a partir de su mal plegamiento alteran la estructura y la estabilidad de la mielina en las fibras de nervio ciático. Además, hemos

detectado la presencia de PMP-22 en el interior del núcleo de las CS lo cual sugiere que la proteína podría estar cumpliendo otras funciones mas allá de un rol estructural en la mielina (datos aún no publicados). Estos datos son coherentes con la descripción original de *pmp22* como un gen de expresión y mantenimiento de G0 (*grow arrest specific gene*) en fibroblastos de ratón (Schneider et al., 1988; Snipes et al., 1992). Esto también ha sido sugerido recientemente por otros autores (Jetten et al., 2000; Zoidl et al., 1995; Roux et al., 2005; Atanasoski et al., 2002; Giambonini-Brugnoli et al., 2005). Los resultados obtenidos podrían indicar un nuevo rol o función de PMP-22 en las células de Schwann (ej: posibles estados metabólicos diferentes), mas allá de su ya conocida participación en el control de la mielinización y la compactación de la mielina, entre otras funciones aun no descriptas.

7. CONCLUSIONES

- Las imágenes topográficas por MFA indican que las fibras nerviosas de los ratones Trembler-J carecen de filamentos de colágeno de tipo-IV formadores de red en comparación con las fibras normales.
- Las medidas mecánicas realizadas en las fibras Trembler-J mostraron una tendencia a ser más blandas en comparación a las fibras de animales de genotipo salvaje.
- Estas diferencias podrían estar en concordancia con los profundos cambios encontrados en la organización del citoesqueleto de actina.
- El análisis complementario realizado por microscopía confocal mostró que existe una acumulación de colágeno de tipo-IV alrededor del núcleo de las células de Schwann que colocaliza parcialmente con la proteína PMP-22.
- Estos datos sugieren que la mutación en PMP-22 podría interferir, al menos en parte con el mecanismo o vía normal de secreción de proteínas involucrado en el transporte y la exportación de componentes de la MEC.
- La MFA es una herramienta útil en la caracterización y el estudio de aspectos estructurales, biomecánicos y fisiológicos de las neuropatías periféricas.

8. PERSPECTIVAS

Como perspectivas de trabajo nos planteamos:

a) determinación del **Módulo de Young en fibras nerviosas periféricas vivas** en relación con el proceso de mielinización. Se determinará así sus propiedades nanomecánicas, en particular la elasticidad, en condiciones fisiológicas. Para esto se empleará el **modelo de cultivo organotípico de ganglio de la raíz dorsal** proveniente

de embriones en el día 13 de gestación, lo que permitirá regular el momento del inicio de la mielinización y su desarrollo (MFA y Confocal).

b) Igualmente, éste modelo permitirá el **estudio *in vitro* de la secreción de componentes de la Matriz Extracelular y de la lámina basal** y su ensamblaje en condiciones fisiológicas controladas (MFA y Confocal).

c) En particular, se **caracterizará el fenotipo Trembler-J en la expresión de los diferentes tipos de colágeno** de la MEC y la lámina basal, desde el inicio de la mielinización (MFA y Confocal).

9. REFERENCIAS

A

Aramati P. The Biology of Schwann cells. Cambridge 2006.

Aszódi A, Legate KR, Nakchbandi I, Fässler R. What mouse mutants teach us about extracellular matrix function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2006;22:591-621.

Arroyo EJ, Xu T, Grinspan J, Lambert S, Levinson SR, Brophy PJ, Peles E, Scherer SS. Genetic dysmyelination alters the molecular architecture of the nodal region. *J Neurosci.* 2002 Mar 1;22(5):1726-37.

Altevogt BM, Kleopa KA, Postma FR, Scherer SS, Paul DL. Connexin29 is uniquely distributed within myelinating glial cells of the central and peripheral nervous systems. *J Neurosci.* 2002 Aug 1;22(15):6458-70.

Arroyo EJ, Xu YT, Zhou L, Messing A, Peles E, Chiu SY, Scherer SS. Myelinating Schwann cells determine the internodal localization of Kv1.1, Kv1.2, Kvbeta2, and Caspr. *J Neurocytol.* 1999 Apr-May;28(4-5):333-47.

Adlkofer K, Martini R, Aguzzi A, Zielasek J, Toyka KV, Suter U. Hypermyelination and demyelinating peripheral neuropathy in Pmp22-deficient mice. *Nat Genet.* 1995 Nov;11(3):274-80.

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

Atanasoski S, Scherer SS, Nave KA, Suter U. Proliferation of Schwann cells and regulation of cyclin D1 expression in an animal model of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *J Neurosci Res.* 2002 Feb 15;67(4):443-9.

Amici SA, Dunn WA Jr, Murphy AJ, Adams NC, Gale NW, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Notterpek L. Peripheral myelin protein 22 is in complex with alpha6beta4 integrin, and its absence alters the Schwann cell basal lamina. *J Neurosci.* 2006 Jan 25;26(4):1179-89.

Akkas, N, 1994. ed., *Biomechanics of Active Movement and Division of Cells*, NATO ASI Series 84 New York: Springer-Verlag.

B

Boal, D, 2002. *Mechanics of the Cell*, New York: Cambridge University Press.

Bonifacino JS, Lippincott-Schwartz J. Degradation of proteins within the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol.* 1991 Aug;3(4):592-600.

Berthold CH, Nilsson RI. De- and remyelination in spinal roots during normal perinatal development in the cat: a brief summary of structural observations and a conceptual hypothesis. *J Anat.* 2002 Apr;200(4):391-403.

Bischoff A. Ultrastructural pathology of the peripheral nervous system. *Z Neurol.* 1973 Dec 11;205(4):257-74.

Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys Rev Lett.* 1986 Mar 3;56(9):930-933.

Bunge RP. Expanding roles for the Schwann cell: ensheathment, myelination, trophism and regeneration. *Curr Opin Neurobiol.* 1993 Oct;3(5):805-9.

Bronstein JM. Function of tetraspan proteins in the myelin sheath. *Curr Opin Neurobiol.* 2000 Oct;10(5):552-7.

- Bron R, Vermeren M, Kokot N, Andrews W, Little GE, Mitchell KJ, Cohen. Boundary cap cells constrain spinal motor neuron somal migration at motor exit points by a semaphorin-plexin mechanism. *J. Neural Dev.* 2007 Oct 30;2:21.
- Bunge RP. Expanding roles for the Schwann cell: ensheathment, myelination, trophism and regeneration. *Curr Opin Neurobiol.* 1993 Oct;3(5):805-9.
- Bradley WG, Jenkison M. Abnormalities of peripheral nerves in murine muscular dystrophy. *J Neurol Sci.* 1973 Feb;18(2):227-47.
- Birchmeier C, Nave KA. Neuregulin-1, a key axonal signal that drives Schwann cell growth and differentiation. *Glia.* 2008 Nov 1;56(14):1491-7.
- Bunge MB, Williams AK, Wood PM, Uitto J, Jeffrey JJ. Comparison of nerve cell and nerve cell plus Schwann cell cultures, with particular emphasis on basal lamina and collagen formation. *J Cell Biol.* 1980 Jan;84(1):184-202.
- Boiko T, Rasband MN, Levinson SR, Caldwell JH, Mandel G, Trimmer JS, Matthews G. Compact myelin dictates the differential targeting of two sodium channel isoforms in the same axon. *Neuron.* 2001 Apr;30(1):91-104.
- Bennett V, Lambert S. Physiological roles of axonal ankyrins in survival of premyelinated axons and localization of voltage-gated sodium channels. *J Neurocytol.* 1999 Apr-May;28(4-5):303-18.
- Berghs S, Aggujaro D, Dirx R Jr, Maksimova E, Stabach P, Hermel JM, Zhang JP, Philbrick W, Slepnev V, Ort T, Solimena M. betaIV spectrin, a new spectrin localized at axon initial segments and nodes of ranvier in the central and peripheral nervous system. *J Cell Biol.* 2000 Nov 27;151(5):985-1002.
- Bhat MA, Rios JC, Lu Y, Garcia-Fresco GP, Ching W, St Martin M, Li J, Einheber S, Chesler M, Rosenbluth J, Salzer JL, Bellen HJ Axon-glia interactions and the domain organization of myelinated axons requires neurexin IV/Caspr/Paranodin. *Neuron.* 2001 May;30(2):369-83.
- Boyle ME, Berglund EO, Murai KK, Weber L, Peles E, Ranscht B. Contactin orchestrates assembly of the septate-like junctions at the paranode in myelinated peripheral nerve. *Neuron.* 2001 May;30(2):385-97.
- Butt and M. Jaschke, "Calculation of thermal noise in atomic force microscopy." *Nanotechnol.* 6, 1–7 (1995).
- Berger BL, Gupta R. Demyelination secondary to chronic nerve compression injury alters Schmidt-Lanterman incisures. *J Anat.* 2006 Jul;209(1):111-8.
- Blakemore WF, Cavanagh JB. "Neuroaxonal dystrophy" occurring in an experimental "dying back" process in the rat. *Brain.* 1969;92(4):789-804.
- Brancolini C, Marzinotto S, Edomi P, Agostoni E, Fiorentini C, Müller HW, Schneider C. Rho-dependent regulation of cell spreading by the tetraspan membrane protein Gas3/PMP22. *Mol Biol Cell.* 1999 Jul;10(7):2441-59.

C

- Collinsworth AM, Zhang S, Kraus WE, Truskey GA. Apparent elastic modulus and hysteresis of skeletal muscle cells throughout differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2002 Oct;283(4):C1219-27.
- Corfas G, Velardez MO, Ko CP, Ratner N, Peles E. Mechanisms and roles of axon-Schwann cell interactions. *J Neurosci.* 2004 Oct 20;24(42):9250-60.
- Cook, T.E. Schäffer, K.M. Chynoweth, M. Wigton, R.W Simmonds and K.M. Lang, "Practical implementation of dynamic methods for measuring atomic force microscope cantilever spring constants. (2006) " *Nanotechnology* 17, 2135-2145.

Chen ZL, Strickland S. Laminin gamma1 is critical for Schwann cell differentiation, axon myelination, and regeneration in the peripheral nerve. *J Cell Biol.* 2003 Nov 24;163(4):889-99.

Colognato H, Yurchenco PD. Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn.* 2000 Jun;218(2):213-34.

Court FA, Sherman DL, Pratt T, Garry EM, Ribchester RR, Cottrell DF, Fleetwood-Walker SM, Brophy PJ. Restricted growth of Schwann cells lacking Cajal bands slows conduction in myelinated nerves. *Nature.* 2004 Sep 9;431(7005):191-5.

Chernousov MA, Stahl RC, Carey DJ. Schwann cells use a novel collagen-dependent mechanism for fibronectin fibril assembly. *J Cell Sci.* 1998 Sep;111 (Pt 18):2763-77.

Chernousov MA, Rothblum K, Stahl RC, Evans A, Prentiss L, Carey DJ. Glypican-1 and alpha4(V) collagen are required for Schwann cell myelination. *J Neurosci.* 2006 Jan 11;26(2):508-17.

Caldwell JH, Schaller KL, Lasher RS, Peles E, Levinson SR. Sodium channel Na(v)1.6 is localized at nodes of ranvier, dendrites, and synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 May 9;97(10):5616-20.

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

Carenini S, Neuberg D, Schachner M, Suter U, Martini R. Localization and functional roles of PMP22 in peripheral nerves of P0-deficient mice. *Glia.* 1999 Dec;28(3):256-64.

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

Chance PF, Pleasure D. Charcot-Marie-Tooth syndrome. *Arch Neurol.* 1993 Nov;50(11):1180-4.

Czajkowsky DM, Shao Z. Submolecular resolution of single macromolecules with atomic force microscopy. *FEBS Lett.* 1998 Jun 23;430(1-2):51-4.

Callies C, Schön P, Liashkovich I, Stock C, Kusche-Vihrog K, Fels J, Sträter AS, Oberleithner H. Simultaneous mechanical stiffness and electrical potential measurements of living vascular endothelial cells using combined atomic force and epifluorescence microscopy. *Nanotechnology.* 2009 Apr 29;20(17):175104. Epub 2009 Apr 3.

Costa KD. Single-cell elastography: probing for disease with the atomic force microscope. *Dis Markers.* 2003-2004;19(2-3):139-54.

Court FA, Sherman DL, Pratt T, Garry EM, Ribchester RR, Cottrell DF, Fleetwood-Walker SM, Brophy PJ. Restricted growth of Schwann cells lacking Cajal bands slows conduction in myelinated nerves. *Nature.* 2004 Sep 9;431(7005):191-5.

D

Dyck PJ, Roa BB, Marks HG, Chance PF, Lupski JR. Dejerine-Sottas syndrome associated with point mutation in the peripheral myelin protein 22 (PMP22) gene. *Nat Genet.* 1993 Nov;5(3):269-73.

Devaux, J.J. & Scherer S.S., 2005. Altered ion channels in an animal model of Charcot-Marie-Tooth disease type IA. *The Journal of Neuroscience.* 25, 1470-1480.

D'Urso, D., Ehrhardt, P., Müller, H.W, 1999. Peripheral Myelin Protein 22 and Protein Zero: a Novel Association in Peripheral Nervous System Myelin. *The Journal of Neuroscience;* 19: 3396-3403

E

Einheber S, Zanazzi G, Ching W, Scherer S, Milner TA, Peles E, Salzer JL. The axonal membrane protein Caspr, a homologue of neurexin IV, is a component of the septate-like paranodal junctions that assemble during myelination. *J Cell Biol.* 1997 Dec 15;139(6):1495-506.

Eldridge, C. F., Bunge, M. B., Bunge, R. P., and Wood, P. M, 1987. Differentiation of axon-related Schwann cells in vitro. I. Ascorbic acid regulates basal lamina assembly and myelin formation. *J. Cell Biol.* 105, 1023-1034.

Eldridge CF, Bunge MB, Bunge RP. Differentiation of axon-related Schwann cells in vitro: II. Control of myelin formation by basal lamina. *J Neurosci.* 1989 Feb;9(2):625-38.

F

Feltri ML, Wrabetz L. Laminins and their receptors in Schwann cells and hereditary neuropathies. *J Peripher Nerv Syst.* 2005 Jun;10(2):128-43.

Feltri ML, Graus Porta D, Previtali SC, Nodari A, Migliavacca B, Casseti A, Littlewood-Evans A, Reichardt LF, Messing A, Quattrini A, Mueller U, Wrabetz L. Conditional disruption of beta 1 integrin in Schwann cells impedes interactions with axons. *J Cell Biol.* 2002 Jan 7;156(1):199-209. Epub 2002 Jan 3.

Fortun, J., Verrier, J.D., Go, J., Madorsky, I., Dunn, W.A., Notterpek, L., 2007. The formation of peripheral myelin protein 22 aggregates is hindered by the enhancement of autophagy and expression of cytoplasmic chaperones. *Neurobiology of Disease.* 25, 252-265.

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

Falconer, D. S. 1951. Two new mutants, "Trembler" and "Reeler" with neurological actions in the house mouse. *Genetics*, 50, 192-201.

Fortun, J., Dunn Jr., W.A., Joy, S., Li, J., Notterpek, L., 2003. Emerging role for autophagy in the removal of aggregates in Schwann cells. *J. Neurosci.* 23, 10672 – 10680.

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

G

Guilak, F., 2000. The deformation behavior and viscoelastic properties of chondrocytes in articular cartilage, *Biorheology* 37, 27-44.

Grzywa, E.L., Lee, A.C., Lee, G.U., Suter, D.M., 2006. High-Resolution Analysis of Neuronal Growth Cone Morphology by Comparative Atomic Force and Optical Microscopy. *J. of Neurobiol.* 1529-1543.

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* 3:656-68.

Grinspan JB, Marchionni MA, Reeves M, Coulaloglou M, Scherer SS. Axonal interactions regulate Schwann cell apoptosis in developing peripheral nerve: neuregulin receptors and the role of neuregulins. *J Neurosci.* 1996 Oct 1;16(19):6107-18.

Garbay B, Boiron-Sargueil F, Cassagne C: Expression of the exon 1A containing PMP22 transcript is altered in the trembler mouse. *Neurosci Lett* 1995, 198:157-160.

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

Garrido JJ, Giraud P, Carlier E, Fernandes F, Moussif A, Fache MP, Debanne D, Dargent B. A targeting motif involved in sodium channel clustering at the axonal initial segment. *Science.* 2003 Jun 27;300(5628):2091-4.

Ghabriel MN, Allt G. The role of Schmidt-Lantermann incisures in remyelination. *Folia Morphol (Praha).* 1980;28(2):129-33.

H

Hall, S. M., and Williams, P. L, 1970. Studies on the "incisures" of Schmidt and Lanterman. *J. Cell Sci.* 6, 767-791.

Heredia, A., Bui, C.C., Suter, U., Young, P., Schäffera, T.E., 2007. AFM combines functional and morphological analysis of peripheral myelinated and demyelinated nerve fibers. *NeuroImage* 37, 1218-1226.

Hortsch M. Structural and functional evolution of the L1 family: are four adhesion molecules better than one?. *Mol Cell Neurosci.* 2000 Jan;15(1):1-10.

Henry MD, Campbell KP. Dystroglycan: an extracellular matrix receptor linked to the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 1996 Oct;8(5):625-31.

Hasse, B., Bosse, F., and Müller, H. W, 2002. Proteins of peripheral myelin are associated with glycosphingolipid/cholesterol-enriched membranes. *J. Neurosci. Res.* 69, 227-232.

Huxley, E. Passage, A. M. Robertson, B. Youl, S. Huston, A. Manson, D. Sabéran-Djoniedi, D. Figarella-Branger, J. F. Pellissier, P. K. Thomas, M. Fontés, 1998. Correlation between varying levels of PMP22 expression and the degree of demyelination and reduction in nerve conduction velocity in transgenic mice. *Human Molecular Genetics*; 7: 449-458.

Henry, E. W., and Sidman, R. L, 1983. The murine mutation trembler-J: Proof of semi-dominant expression by the use of the linked vestigial tail marker. *J Neurogen*, 1, 39-52.

Henry, E. W., Cowen, J. S., and Sidman, R. L, 1983. Comparison of trembler and trembler-J phenotypes: Varying severity of peripheral hypomyelination. *J Neuropathol Exp Neurol*, 42, 688-706.

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

Hassan E, Heinz WF, Antonik MD, D'Costa NP, Nageswaran S, Schoenenberger CA, Hoh JH, 1998. Relative microelastic mapping of living cells by atomic force microscopy. *Biophys J.* 3:1564-78.

Henderson, E., Haydon, P.G., Sakaguchi, D.S., 1992. Actin filament dynamics in living glial cells imaged by atomic force microscopy. *Science* 257, 1944-1946.

Henderson, E., Sakaguchi, D.S., 1993. Imaging F-actin in fixed glial cells with a combined optical fluorescence/atomic force microscope. *Neuroimage* 17, 145-150.

Horcas I, Fernández R, Gómez-Rodríguez JM, Colchero J, Gómez-Herrero J, Baro AM. WSXM: a software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. *Rev Sci Instrum.* 2007 Jan;78(1):013705.

Helbling-Leclerc A, Zhang X, Topaloglu H, Cruaud C, Tesson F, Weissenbach J, Tomé FM, Schwartz K, Fardeau M, Tryggvason K, et al. Mutations in the laminin alpha 2-chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Nat Genet.* 1995 Oct;11(2):216-8.

I

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

J

Jessen KR, Mirsky R. Signals that determine Schwann cell identity. *J Anat.* 2002 Apr;200(4):367-76.

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

Jessen KR, Mirsky R. Negative regulation of myelination: relevance for development, injury, and demyelinating disease. *Glia.* 2008 Nov 1;56(14):1552-65.

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

Jessen KR, Mirsky R. Embryonic Schwann cell development: the biology of Schwann cell precursors and early Schwann cells. *J Anat.* 1997 Nov;191 (Pt 4):501-5.

Jena, B.P., Hörber, J.K.H. (Eds.), 2002. Atomic Force Microscopy in Cell Biology. Academic Press, San Diego.

Jiao, Y., Cherny, D.I., Heim, G., Jovin, T.M., Schäffer, T.E., 2001. Dynamic interactions of p53 with DNA in solution by time-lapse atomic force microscopy. *J. Mol. Biol.* 314, 233-243.

Johnson, K. L. K. Kendall and A. D. Roberts. Surface Energy and the Contact of Elastic Solids. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences* Vol. 324, No. 1558 (Sep. 8, 1971), pp. 301-313

K

Komada M, Soriano P. Beta IV-spectrin regulates sodium channel clustering through ankyrin-G at axon initial segments and nodes of Ranvier. *J Cell Biol.* 2002 Jan 21;156(2):337-48. Epub 2002 Jan 21.

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

Kun, Alejandra, Canclini, Lucía, Rosso, Gonzalo, Bresque, Mariana, Romeo, Carlos, Hanusz, Alicia, Cal, Karina, C allari, Aldo, Sotelo Silveira, José Sotelo, Jose. F-actin distribution at Nodes of Ranvier and Schmidt-Lanterman Incisures in mammal sciatic nerves. Date Submitted: 08-Nov-2011.

Khajavi, M., Shiga, K., Wiszniewski, W., He, F., Shaw C.A., Yan, J., ensel, T.G., Snipes G.J. & Lupski, J.R., 2007. Oral curcumin mitigates the clinical and neuropathologic phenotype of the Trembler-J mouse: a potential therapy for the inherited neuropathy. *American Journal of Human Genetics*, 81, 438-453.

Kasas, S., Thomson, N.H., Smith, B.L., Hansma, H.G., Zhu, X., Guthold, M., Bustamante, C., Kool, E.T., Kashlev, M., Hansma, P.K., 1997. Escherichia coli RNA polymerase activity observed using atomic force microscopy. *Biochemistry* 36, 461-468.

Kursula P, Meriläinen G, Lehto VP, Heape AM, 1999. The small myelin-associated glycoprotein is a zinc-binding protein. *J Neurochem.* 5:2110-8.

Khoshnoodi J, Cartailier JP, Alvares K, Veis A, Hudson BG. Molecular recognition in the assembly of collagens: terminal noncollagenous domains are key recognition modules in the formation of triple helical protomers. *J Biol Chem.* 2006 Dec 15;281(50):38117-21. Epub 2006 Nov 2.

Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Hermans-Borgmeyer I, Wegner M. Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *J Neurosci.* 1998 Jan 1;18(1):237-50.

L

Lichtman. Confocal Microscopy. Science in Pictures (1994) SCIENTIFIC AMERICAN.

Lazzarini R. A, John Griffin, Hans Lassman, Klaus-Armin Nave, Robert Miller, Bruce Trapp. Myelin Biology and Disorders 2002. Lobsiger et al. 2002

Lemaitre G, Walker B, Lambert S. Identification of a conserved ankyrin-binding motif in the family of sodium channel alpha subunits. *J Biol Chem.* 2003 Jul 25;278(30):27333-9. Epub 2003 Apr 25.

Landon, D. N., and Hall, S. (1976). The myelinated nerve fiber. In "The Peripheral Nerve" (D. N. Landon, ed.), pp. 1–105. Chapman and Hall, London.

Lehenkari, P.P., Charras, G.T., Nykanen, A., Horton, M.A., 2000. Adapting atomic force microscopy for cell biology, *Ultramicroscopy* 82, 289-295.

Lorch M, Booth PJ, 2004. Insertion kinetics of a denatured alpha helical membrane protein into phospholipid bilayer vesicles. *J Mol Biol.* 4:1109-21.

Lupski, J. R., Montes de Oca-Luna, R., Slaugenhaupt, S., Pentao, L., Guzzetta, V., Trask, B. J., Saucedo-Cardenas, O., Barker, D. F., Killian, J. M., Garcia, C. A., Chakravarti, A., and Patel, P. I., 1991. DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Cell* 66, 219-232.

M

Mirsky R, Jessen KR. The neurobiology of Schwann cells. *Brain Pathol.* 1999 Apr;9(2):293-311.

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

Miner JH, Yurchenco PD. Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:255-84.

Milner R, Wilby M, Nishimura S, Boylen K, Edwards G, Fawcett J, Streuli C, Pytela R, French-Constant C. Division of labor of Schwann cell integrins during migration on peripheral nerve extracellular matrix ligands. *Dev Biol.* 1997 May 15;185(2):215-28.

Miner JH, Sanes JR. Collagen IV alpha 3, alpha 4, and alpha 5 chains in rodent basal laminae: sequence, distribution, association with laminins, and developmental switches. *J Cell Biol.* 1994 Nov;127(3):879-91.

Misko A, Ferguson T, Notterpek L. 2002. Matrix metalloproteinase mediated degradation of basement membrane proteins in Trembler-J neuropathy nerves. *J. Neurochem.* 83:885–894.

Mostov K, Su T, ter Beest M. Polarized epithelial membrane traffic: conservation and plasticity. *Nat Cell Biol.* 2003 Apr;5(4):287-93.

Mata M, Kupina N, Fink DJ. Phosphorylation-dependent neurofilament epitopes are reduced at the node of Ranvier. *J Neurocytol.* 1992 Mar;21(3):199-210.

Melendez-Vasquez CV, Rios JC, Zanazzi G, Lambert S, Bretscher A, Salzer JL. Nodes of Ranvier form in association with ezrin-radixin-moesin (ERM)-positive Schwann cell processes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jan 30;98(3):1235-40.

Mohler PJ, Gramolini AO, Bennett V. The ankyrin-B C-terminal domain determines activity of ankyrin-B/G chimeras in rescue of abnormal inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptor distribution in ankyrin-B (-/-) neonatal cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2002 Mar 22;277(12):10599-607. Epub 2002 Jan 7.

Menegoz M, Gaspar P, Le Bert M, Galvez T, Burgaya F, Palfrey C, Ezan P, Arnos F, Girault JA. Paranodin, a glycoprotein of neuronal paranodal membranes. *Neuron*. 1997 Aug;19(2):319-31.

Matsunami, N., Smith, B., Ballard, L., Lensch, M. W., Robertson, M., Albertsen, H., Hanemann, C. O., Muller, H. W., Bird, T. D., White, R., and Chance, P. F, 1992. Peripheral myelin protein-22 gene maps in the duplication in chromosome 17p11.2 associated with Charcot-Marie-Tooth 1A., *Nat Genet* 1, 176-179.

McDonald, W.I., 1967. Structural and functional changes in human and experimental neuropathy. *Mod. Trends Neurol.* 4, 145-164.

Morris, V.J., Kirby, A.R., Gunning, A.P., 2001. Atomic Force Microscopy for Biologists. Imperial College Press, London.

Melling, M., Karimian-Teherani, D., Behnam, M., Mostler, S., 2003. Morphological study of the healthy human oculomotor nerve by atomic force microscopy. *NeuroImage* 20, 795-801.

Mow, V.C., Guilak, F., Tran-Son-Tay, R., Hochmuth, R.M, 1994. eds, *Cell Mechanics and Cellular Engineering*, New York: Springer-Verlag.

McNally, H.A., Rajwa, B., Sturgis, J., Robinson, J.P., 2005. Comparative three-dimensional imaging of living neurons with confocal and atomic force microscopy. *J. Neurosci. Methods* 142, 177-184.

Mathur AB, Collinsworth AM, Reichert WM, Kraus WE, Truskey GA. Endothelial, cardiac muscle and skeletal muscle exhibit different viscous and elastic properties as determined by atomic force microscopy. *J Biomech.* 2001 Dec;34(12):1545-53.

N

Nave KA, Salzer JL. Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr Opin Neurobiol.* 2006 Oct;16(5):492-500. Epub 2006 Sep 7.

Nave KA. Neurological mouse mutants and the genes of myelin. *J Neurosci Res.* 1994 Aug 15;38(6):607-12.

Novikoff AB, Quintana N, Villaverde H, Forschirm R. Nucleoside phosphatase and cholinesterase activities in dorsal root ganglia and peripheral nerve. *J Cell Biol.* 1966 Jun;29(3):525-45.

Notterpek, L., Roux, K. J., Amici, S. A., Yazdanpour, A., Rahner, C., and Fletcher, B. S, 2001. Peripheral myelin protein 22 is a constituent of intercellular junctions in epithelia, *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 14404-14409.

Nagy JI, Dudek FE, Rash JE, 2004. Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system. 47:191-215.

Notterpek, L., Shooter, E.M. & Snipes G.J., 1997. Upregulation of the endosomal-lysosomal pathway in the Trembler-J neuropathy. *The Journal of Neuroscience.* 17, 4190-4200.

Nagayama, S., Tojima, T., Morimoto, S., Sasaki, S., Kawabata, K., Ushiki, T., Abe, K., Ito, E., 1996. Practical scan speed in atomic force microscopy for live neurons in a physiological solution. 4th International Colloquium on Scanning Tunneling Microscopy, Kanazawa, Japan, pp. 3877-3880.

O

Osawa T, Ide C. Changes in thickness of collagen fibrils in the endo- and epineurium of the mouse sciatic nerve during development. *Acta Anat (Basel).* 1986;125(4):245-51.

Obremski VJ, Wood PM, Bunge MB. 1993b. Fibroblasts promote Schwann cell basal lamina deposition and elongation in the absence of neurons in culture. *Dev Biol.*160(1):119-34. *Journal of Molecular Recognition*.

Obremski VJ, Johnson MI, Bunge MB. 1993a. Fibroblasts are required for Schwann cell basal lamina deposition and ensheathment of unmyelinated sympathetic neurites in culture. *J. Neurocytol.*22(2):102-17.

P

Previtali SC, Dina G, Nodari A, Fasolini M, Wrabetz L, Mayer U, Feltri ML, Quattrini A. Schwann cells synthesize $\alpha 7 \beta 1$ integrin which is dispensable for peripheral nerve development and myelination. *Mol Cell Neurosci.* 2003 Jun;23(2):210-8.

Prockop DJ, Kivirikko KI. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu Rev Biochem.* 1995;64:403-34.

Poliak S, Gollan L, Salomon D, Berglund EO, Ohara R, Ranscht B, Peles E. Localization of Caspr2 in myelinated nerves depends on axon-glia interactions and the generation of barriers along the axon. *J Neurosci.* 2001 Oct 1;21(19):7568-75.

Poliak S, Gollan L, Martinez R, Custer A, Einheber S, Salzer JL, Trimmer JS, Shrager P, Peles E. Caspr2, a new member of the neurexin superfamily, is localized at the juxtaparanodes of myelinated axons and associates with K⁺ channels. *Neuron.* 1999 Dec;24(4):1037-47.

Poliak S, Salomon D, Elhanany H, Sabanay H, Kiernan B, Pevny L, Stewart CL, Xu X, Chiu SY, Shrager P, Furley AJ, Peles E. Juxtaparanodal clustering of Shaker-like K⁺ channels in myelinated axons depends on Caspr2 and TAG-1. *J Cell Biol.* 2003 Sep 15;162(6):1149-60. Epub 2003 Sep 8.

Pasternak C, Wong S, Elson EL. Mechanical function of dystrophin in muscle cells. *J Cell Biol.* 1995 Feb;128(3):355-61

Päiväläinen S, Nissinen M, Honkanen H, Lahti O, Kangas SM, Peltonen J, Peltonen S, Heape AM, 2007. Myelination in mouse dorsal root ganglion/Schwann cell cocultures. *Mol Cell Neurosci.* 2008 3:568-78.

Parpura, V., Haydon, P.G., Henderson, E., 1993. Three-dimensional imaging of living neurons and glia with the atomic force microscope. *J. Cell Sci.* 104, 427-432. Pasternak, C., Wong, S., Elson, E.L., 1995. Mechanical function of dystrophin in muscle cells, *J Cell Biol* 128, 355-361.

Patel, P. I., Roa, B. B., Welcher, A. A., Schoener-Scott, R., Trask, B. J., Pentao, L., Snipes, G. J., Garcia, C. A., Francke, U., Shooter, E. M., et al, 1992. The gene for the peripheral myelin protein PMP-22 is a candidate for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A, *Nat Genet* 1, 159-165.

Pentao, L., Wise, C. A., Chinault, A. C., Patel, P. I., and Lupski, J. R, 1992. Charcot-Marie-Tooth type 1A duplication appears to arise from recombination at repeat sequences flanking the 1.5 Mb monomer unit, *Nat Genet* 2, 292-300.

Peters, A., Palay, S., and Webster, H. de F, 1991. "The Fine Structure of the Nervous System: The Neuron and the Supporting Cells," 3rd ed. Oxford University Press, New York.

Popot JL, Engelman DM, Zaccari G, de Vitry C, 1990. The "microassembly" of integral membrane proteins: applications & implications. *Prog Clin Biol Res.* 343:237-62.

Q

Quarles, R. H. 2002. Myelin sheaths: Glycoproteins involved in their formation, maintenance and degeneration. *Cell Mol Life Sci* 59, 1851-1871.

R

Radmacher, M., Tillman, RW., Gaub, HE., 1993. Imaging viscoelasticity by force modulation with the atomic force microscope. *Biophys. J.* 64:735- 742.

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

Radmacher, M., Tillmann, RW., Fritz, M., Gaub, HE., 1992. From molecules to cells - imaging soft samples with the AFM. *Science* 257:1900-1905.

Raeymaekers, P., Timmerman, V., Nelis, E., De Jonghe, P., Hoogendijk, J., Baas, F., Barker, D. F., Martin, J. J., De Visser, M., Bolhuis, P. A., and Van Broeckhoven, C, 1991. Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT1a). *Neuromusc. Disord.* 1, 93-97.

Roux KJ, Amici SA, Notterpek L. 2004. The temporospatial expression of peripheral myelin protein 22 at the developing blood-nerve and blood-brain barriers. *J Comp Neurol*, 4:578-88.

Roux KJ, Johnson JS, Fletcher BS, Fortun J, Notterpek L, 2005. Molecular alterations resulting from frameshift mutations in peripheral myelin protein 22: implications for neuropathy severity. *J Neurosci Res.*, 6:743-52.

Rosenbluth, J, 1976. Intramembranous particle distribution at the node of Ranvier and adjacent axolemma in myelinated axons of the frog brain. *J. Neurocytol.* 5, 731-745.

Robertson, J. D. (1958). The ultrastructure of Schmidt-Lantermann clefts and related shearing defects of the myelin sheath. *Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 4, 39-44.

Rosso. G, Cal. K, Canclini. L, Damián. J.P, Ruiz. P, Rodríguez. H, Sotelo. J.R, Vazquez. C, Kun. A. Early phenotypical diagnoses in Trembler-J mice model. *Journal of Neuroscience Methods* 2010 Jun 30;190(1):14-9.

Rawlins FA. A time-sequence autoradiographic study of the in vivo incorporation of (1,2-3H) cholesterol into peripheral nerve myelin. *J Cell Biol.* 1973 Jul;58(1):42-53.

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

Rasband MN, Trimmer JS, Schwarz TL, Levinson SR, Ellisman MH, Schachner M, Shrager P. Potassium channel distribution, clustering, and function in remyelinating rat axons. *J Neurosci.* 1998 Jan 1;18(1):36-47.

S

Scherer, S., 1997a. Molecular genetics of demyelination: new wrinkles on an old membrane. *Neuron* 18, 13.

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

Scherer, S.S., 1997b. The biology and pathobiology of Schwann cells. *Curr. Opin. Neurol.* 10, 386-397.

Scherer, S.S., Arroyo, E.J., 2002. Recent progress on the molecular organization of myelinated axons. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 7, 1-12. Vallat, JM., 2003. Dominantly Inherited Peripheral Neuropathies. *Journ Neuropath and Exp Neurol.* 62, 699-714.

Shahin. V, Ludwig. Y, Schafer. C, Nikova. D and Hans Oberleithner. Glucocorticoids remodel nuclear envelope structure and permeability. *Journal of Cell Science* 2005, 118:2881-2889.

- Snipes, G. J., Suter, U., Welcher, A. A., and Shooter, E. M, (1992). Characterization of a novel peripheral nervous system myelin protein (PMP-22/SR13). *J. Cell Biol.* 117, 225-238.
- Salzer JL, 2003. Polarized domains of myelinated axons. *Neuron*, 2:297-318.
- Sangeeta, P., Suter, U., Snipes, G.J., Welcher, A.A., Shooter, E.M., Murphy, R.A , 1993. Detection and Processing of Peripheral Myelin Protein PMP22 in Cultured Schwann Cells. *The Journal of biological chemistry* 268, 10372-10379.
- Scheuring, S., Fotiadis, D., Moller, C., Müller, S.A., Engel, A., Müller, D.J., 2001. Single proteins observed by atomic force microscopy. *Single Mol.* 2, 59-67.
- Seddon AM, Curnow P, Booth PJ, 2004. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochim Biophys Acta.* 1666:105-17.
- Suter, U., Moskow, J. J., Welcher, A. A., Snipes, G. J., Kosaras, B., Sidman, R. L., Buchberg, A. M., and Shooter, E. M. 1992a. A leucine-to-proline mutation in the putative first transmembrane domain of the 22-kDa peripheral myelin protein in the trembler-J mouse, *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 4382-4386.
- Snipes, G. J., Suter, U., Welcher, A. A., and Shooter, E. M, (1992). Characterization of a novel peripheral nervous system myelin protein (PMP-22/SR13). *J. Cell Biol.* 117, 225-238.
- Skre, H, 1974. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth disease. *Clin. Genet.* 6, 98-118.
- Sneddon, I.N., 1965. The relation between load and penetration in the axisymmetric Boussinesq problem for a punch of arbitrary profile. *Int. J. Eng. Sci.* 3, 47-57.
- Sader, J.E., Larson, I., Mulvaney, P., White, L.R, 1995. Method for the calibration of atomic force microscope cantilevers, *Rev Sci Instrum* 66, 3789-3798.
- Sherman DL, Brophy PJ. Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci.* 2005 Sep;6(9):683-90.
- Schwartz MA. Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol.* 2001 Dec;11(12):466-70.
- Shorer Z, Philpot J, Muntoni F, Sewry C, Dubowitz V. Demyelinating peripheral neuropathy in merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *J Child Neurol.* 1995 Nov;10(6):472-5.
- Sunada Y, Bernier SM, Utani A, Yamada Y, Campbell KP. Identification of a novel mutant transcript of laminin alpha 2 chain gene responsible for muscular dystrophy and dysmyelination in dy2J mice. *Hum Mol Genet.* 1995 Jun;4(6):1055-61.
- Sherman MY, Goldberg AL. Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. 2001, *Neuron.* Jan;29(1):15-32.
- Stewart HJ, Turner D, Jessen KR, Mirsky R. Expression and regulation of alpha1beta1 integrin in Schwann cells. *J Neurobiol.* 1997 Dec;33(7):914-28.
- Smart SL, Lopantsev V, Zhang CL, Robbins CA, Wang H, Chiu SY, Schwartzkroin PA, Messing A, Tempel BL. Deletion of the K(V)1.1 potassium channel causes epilepsy in mice. *Neuron.* 1998 Apr;20(4):809-19.
- Stolinski C, Breathnach AS. Freeze-fracture replication and surface sublimation of frozen collagen fibrils. *J Cell Sci.* 1977 Feb;23:325-34.
- Stolinski C, Breathnach AS, Martin B, Thomas PK, King RH, Gabriel G. Associated particle aggregates in juxtaparanodal axolemma and adaxonal Schwann cell membrane of rat peripheral nerve. *J Neurocytol.* 1981 Aug;10(4):679-91.

Stolinski C, Breathnach AS, Thomas PK, Gabriel G, King RH. Distribution of particle aggregates in the internodal axolemma and adaxonal Schwann cell membrane of rodent peripheral nerve. *J Neurol Sci*. 1985 Feb;67(2):213-22.

Sotnikov Os. data on the statics and dynamics of structure of the schmidt-lantermann incisures. *arkh Anat Gistol Embriol*. 1965 mar;48:31-42.

Singer M, Green MR. Autoradiographic studies of uridine incorporation in peripheral nerve of the newt, *Triturus*. *J Morphol*. 1968 Mar;124(3):321-44.

Singer M, Salpeter MM. The transport of 3H-l-histidine through the Schwann and myelin sheath into the axon, including a reevaluation of myelin function. *J Morphol*. 1966 Nov;120(3):281-315.

Singer M, Krishnan N, Fyfe DA. Penetration of ruthenium red into peripheral nerve fibers. *Anat Rec*. 1972 Aug;173(4):375-89.

Suter U, Snipes GJ. Peripheral myelin protein 22: facts and hypotheses. *J Neurosci Res*. 1995 Feb 1;40(2):145-51.

Schober R, Itoyama Y, Sternberger NH, Trapp BD, Richardson EP, Asbury AK, Quarles RH, Webster HD. Immunocytochemical study of P0 glycoprotein, P1 and P2 basic proteins, and myelin-associated glycoprotein (MAG) in lesions of idiopathic polyneuritis. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1981 Nov-Dec;7(6):421-34.

T

Trachtenberg JT, Thompson WJ. Schwann cell apoptosis at developing neuromuscular junctions is regulated by glial growth factor. *Nature*. 1996 Jan 11;379(6561):174-7.

Trapp, B. D., and Quarles, R. H, 1982. Presence of the myelin-associated glycoprotein correlates with alterations in the periodicity of peripheral myelin. *J Cell Biol* 92, 877-882.

Trapp, B. D., Itoyama, Y., Sternberger, N. H., Quarles, R. H., and Webster, H. 1981. Immunocytochemical localization of Po protein in Golgi complex membranes and myelin of developing rat Schwann cells. *J. Cell Biol.* 90, 1-6.

Trapp BD, Kidd GJ, Hauer P, Mulrenin E, Haney CA, Andrews SB, 1995. Polarization of myelinating Schwann cell surface membranes: role of microtubules and the trans- Golgi network. *J Neurosci.*, 3:1797-807.

Taberner A, Stewart HJS, Jessen KR, Mirsky R. The Neuron-Glia Signal beta Neuregulin Induces Sustained CREB Phosphorylation on Ser-133 in Cultured Rat Schwann Cells. *Mol Cell Neurosci*. 1998 Apr;10(5/6):309-22

Tait S, Gunn-Moore F, Collinson JM, Huang J, Lubetzki C, Pedraza L, Sherman DL, Colman DR, Brophy PJ. An oligodendrocyte cell adhesion molecule at the site of assembly of the paranodal axo-glial junction. *J Cell Biol*. 2000 Aug 7;150(3):657-66.

Traka M, Goutebroze L, Denisenko N, Bessa M, Nifli A, Havaki S, Iwakura Y, Fukamauchi F, Watanabe K, Soliven B, Girault JA, Karagogeos D. Association of TAG-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. *J Cell Biol*. 2003 Sep 15;162(6):1161-72.

Trapp BD, McIntyre LJ, Quarles RH, Sternberger NH, Webster HD. Immunocytochemical localization of rat peripheral nervous system myelin proteins: P2 protein is not a component of all peripheral nervous system myelin sheaths. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Jul;76(7):3552-6.

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

Timmerman, V., Nelis, E., Van Hul, W., Nieuwenhuijsen, B. W., Chen, K. L., Wang, S., Ben Othman, K., Cullen, B., Leach, R. J., Hanemann, C. O., et al. 1992. The peripheral myelin protein gene PMP-22 is contained within the Charcot-Marie-Tooth disease type 1A duplication, *Nat Genet* 1, 171-175.

V

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

Van Itallie CM, Anderson JM, 2006. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol.*;68:403-29.

Vallat, J,M, 2003. Dominantly inherited peripheral neuropathies. *J Nueropathol and Exp Neurol.* 62: 699-714.

Vabnick I, Shrager P. Ion channel redistribution and function during development of the myelinated axon. *J Neurobiol.* 1998 Oct;37(1):80-96.

W

Wu, Z.-Z., Zhang, G., Long, M., Wang, H.-B., Song, G.-B, Cai, S.-X, 2000. Comparison of the viscoelastic properties of normal hepatocytes and hepatocellular carcinoma cells under cytoskeletal perturbation, *Biorheology* 37, 279-290.

X

Xu H, Wu XR, Wewer UM, Engvall E. Murine muscular dystrophy caused by a mutation in the laminin alpha 2 (Lama2) gene. *Nat Genet.* 1994 Nov;8(3):297-302.

Xu W, Manichella D, Jiang H, Vallat JM, Lilien J, Baron P, Scarlato G, Kamholz J, Shy ME. Absence of P0 leads to the dysregulation of myelin gene expression and myelin morphogenesis. *J Neurosci Res.* 2000 Jun 15;60(6):714-24.

Xiong, Y., Lee, A.C., Suter, D.M., Lee, G.U., 2009. Topography and Nanomechanics of Live Neuronal Growth Cones Analyzed by Atomic Force Microscopy. *Biophys J* 96, 5060-5072.

Y

Yin X, Kidd GJ, Wrabetz L, Feltri ML, Messing A, Trapp BD. Schwann cell myelination requires timely and precise targeting of P(0) protein. *J Cell Biol.* 2000 Mar 6;148(5):1009-20.

Yang D, Bierman J, Tarumi YS, Zhong YP, Rangwala R, Proctor TM, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Miner JH, Sherman LS, Gold BG, Patton BL. Coordinate control of axon defasciculation and myelination by laminin-2 and -8. *J Cell Biol.* 2005 Feb 14;168(4):655-66. Epub 2005 Feb 7.

Yin, A., Kidd, G., Wrabetz, L., Feltri, M., Messing, A., and Trapp, B, 2000. Schwann cell myelination requires timely and precise targeting of P0 protein. *J. Cell Biol.* 148, 1009-1020.

Yin Y, Kikkawa Y, Mudd JL, Skarnes WC, Sanes JR, Miner JH. Expression of laminin chains by central neurons: analysis with gene and protein trapping techniques. *Genesis.* 2003 Jun;36(2):114-27.

Yurchenco PD, Amenta PS, Patton BL. Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. *Matrix Biol.* 2004 Jan;22(7):521-38.

Yu WM, Yu H, Chen ZL. Laminins in peripheral nerve development and muscular dystrophy. *Mol Neurobiol.* 2007 Jun;35(3):288-97.

Yu FH, Catterall WA. Overview of the voltage-gated sodium channel family. *Genome Biol.* 2003;4(3):207. Epub 2003 Feb 24.

Z

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

Zhou L, Zhang CL, Messing A, Chiu SY. Temperature-sensitive neuromuscular transmission in Kv1.1 null mice: role of potassium channels under the myelin sheath in young nerves. *J Neurosci*. 1998 Sep 15;18(18):7200-15.

10. ANEXO

10.1 Análisis bioquímico

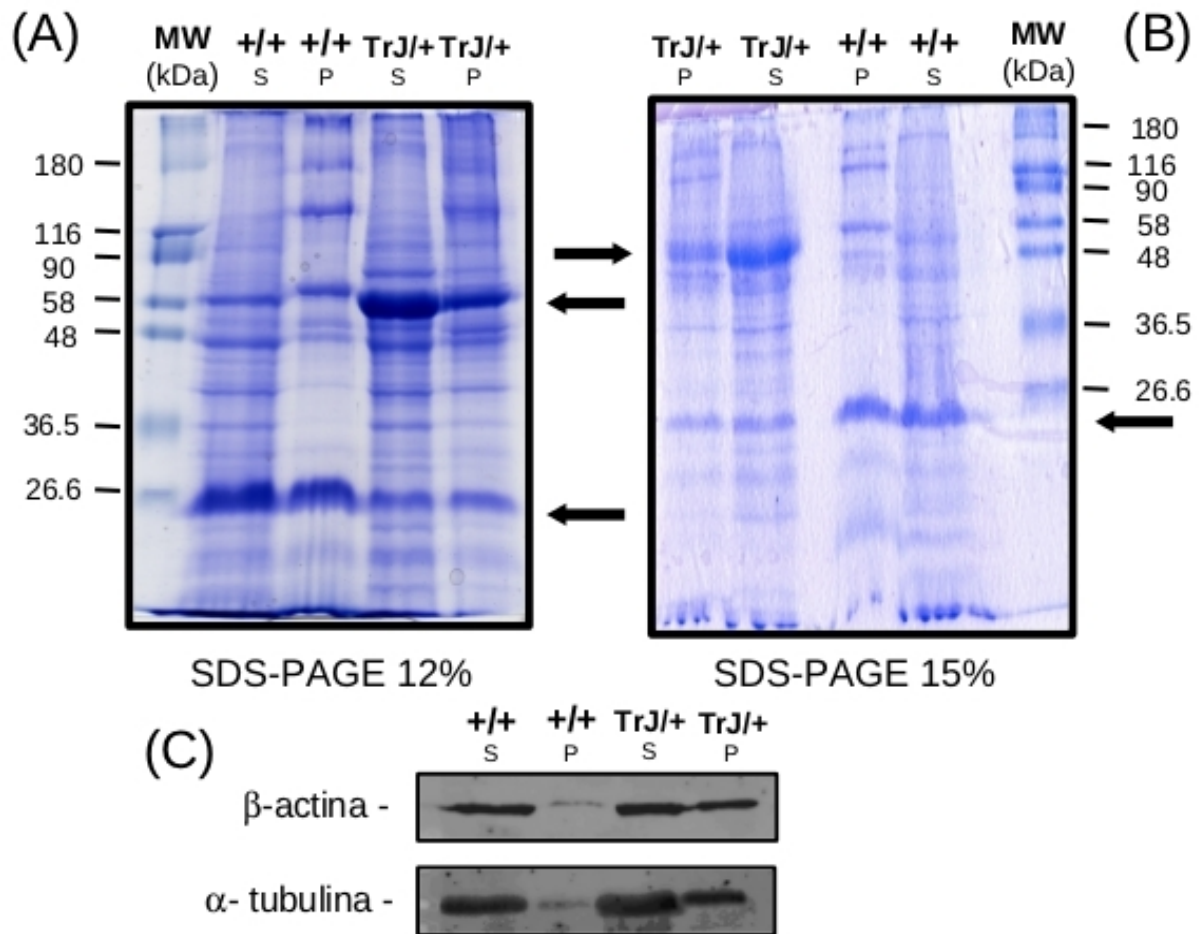


Figura 22. Análisis del perfil de expresión de proteínas de nervio ciático de ratón adulto normal y Trembler-J. La figura (A) y (B) muestran las separación por peso molecular de fracciones subcelulares de homogeneizados de nervio ciático de ratones +/+ y TrJ/+ solubles (S) e insolubles (P) en presencia de detergente. Las flechas indican diferencias en la concentración de proteínas expresadas por cada genotipo. (C) La imagen muestra la caracterización por inmunobloting de actina y tubulina en las mismas fracciones, sembradas en un gel gemelo al de la figura A. Estos datos, preliminares, estarían indicando que existe una diferencia en la expresión de la actina y de la tubulina polimerizada (fracción insoluble, P) entre ambos genotipos.

10.2 Esquema de indentación de una punta de MFA en una célula

Modulo elástico de Young (E)

$$F = E\Omega\delta^2$$

$$\Omega = \frac{2}{\pi} \frac{\tan \alpha}{(1 - \nu^2)}$$

$$\delta = z - d$$

d = cantilever deflection

K_c (DNP-10 probe) = 0.06 N/m

F = Force

E = Young elastic Modulus

ν = Poisson ratio (0.5 is commonly used for cells)

α = opening angle of the cone tip = 15°

δ = indentation depth

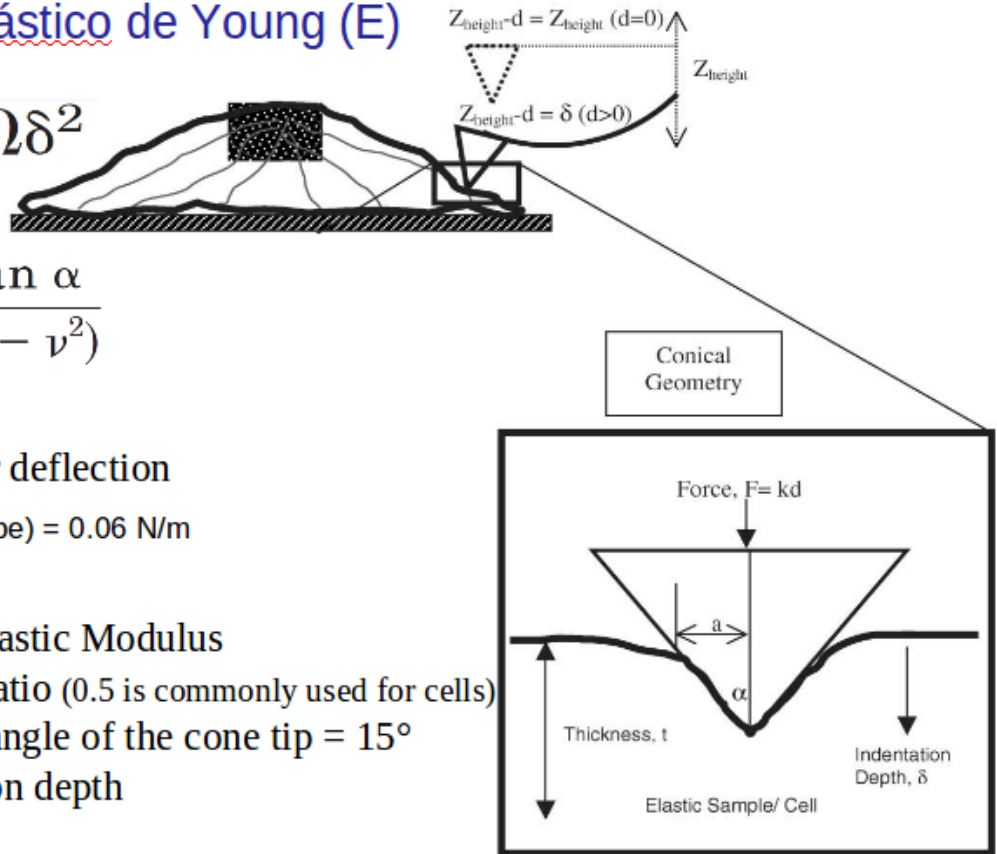


Figura 23. La imagen muestra de forma esquemática de que forma la indentación (δ) de una célula utilizando una punta cónica. A medida que aumenta la profundidad de la penetración, el radio de contacto (a) se incrementa de forma simultánea. Se muestran las formulas matemáticas que fueron aplicadas para el cálculo de elasticidad (Imagen tomada y modificada de Mathur et al., 2001).

10.3 Cálculo de Módulo de Young Aparente

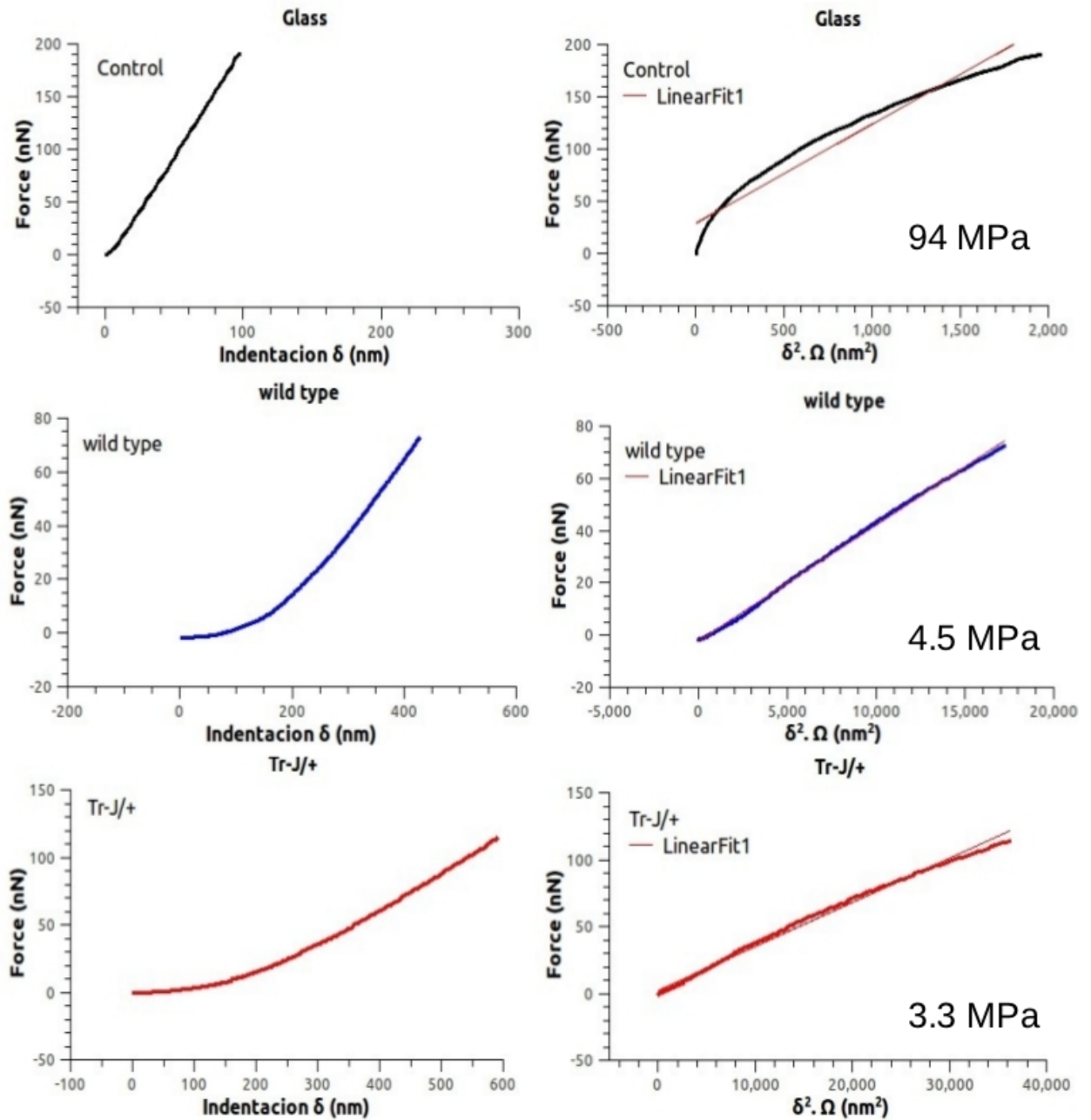


Figura 24. Los gráficos muestran las curvas de fuerza versus distancia obtenidas en las diferentes condiciones estudiadas mostrando algunos pasos previos del análisis de los datos y para las cuales se calculo la elasticidad. Para este caso, la indentación se calculo a partir de las ecuacion ($\delta = z - d$) que se muestra en la figura 23. Para obtener los valores de z y d , el punto de contacto entre la punta y la muestra fue definido como el punto en el cual la pendiente de la curva comienza a desviarse positivamente desde la linea de base. La linea de base esta representada por la trayectoria de la punta desde la posición inicial ($z=0$) hasta hacer contacto con la muestra. Los gráficos de la columna izquierda corresponden a las curvas de Fuerza (nN) en función de la indentación (nm) comenzando desde el punto en el cual la punta del MFA hace contacto con la muestra. Habiendo determinado la indentación en cada punto, la ecuación $F=E \cdot \Omega \cdot \delta^2$ fue utilizada para graficar la fuerza versus el cuadrado de la indentación y producir los gráficos que se muestran en la columna derecha. De estas curvas, se determino el módulo de Young calculando la pendiente de las rectas.