

IIBCE

Análisis microscópico de las diferencias entre las fibras nerviosas periféricas de ratones wt y Trembler J portadores de Charcot-Marie-Tooth tipo 1E en condiciones ad libitum y bajo un tratamiento de restricción calórica.

Tutora: Dra. Alejandra Kun Co- Tutor: Dr. Miguel Calero

Estudiante: Mariana Bresque Toledo

Índice

Abreviaciones.....	3-4
Resumen.....	5
1. Introducción, antecedentes Generales y específicos.....	6-31
1.1. Unidad estructural y funcional del Sistema Nervioso Periférico (SNP): La fibra nerviosa.....	6-7
1.2. Origen y desarrollo de las células gliales y fibras del Sistema Nervioso Periférico.....	7-8
1.3. Mielinización, regulación génica y función miélnica.....	8-12
1.4. Organización polarizada de la fibra nerviosa.	12-16
1.5. Cito-arquitectura de la fibra nerviosa.....	17-18
1.6. Importancia de la interacción entre CS y axón.....	19
1.7. Neuropatías y síndrome Charcot Marie Tooth.	20-23
1.8. Modelos animales de CMT1A y E.	23-24
1.9. La proteína miélnica periférica PMP22.	25-27
2. Antecedentes Específicos.....	28-31
3. Hipótesis, Objetivo General y Objetivos específicos.....	32-33
3.1. Hipótesis.....	32
3.2. Objetivo general.....	32
3.3. Objetivos específicos.....	32-33
4. Materiales y Métodos.....	34-44
4.1 Estrategia experimental.....	34
4.2 Cuidado y mantenimiento de los animales.....	35
4.3 Grupos Experimentales.....	35-36
4.4 Extracción y obtención de nervios ciáticos.	36
4.5 Fijación y preparación de nervios ciáticos.	36-37
4.6 Inmunohistoquímica.	37-38
4.7 Microscopia.....	38-39
4.7.1 Microscopía Óptica Confocal y cuantificación.....	38
4.7.2 Microscopía Óptica convencional y cuantificación.	39
4.7.3 Microscopía Electrónica.	39
4.8 Análisis Estadísticos.....	40
4.9. Detalle metodológico para objetivos específicos.....	40-44

5. Resultados.....	45-63
5.1. Evaluar la expresión de la proteína PMP22 en agregosomas perinucleares asociados al citoesqueleto de Vimentina y PMP22 total, en CS de fibras nerviosas periféricas wt y TrJ alimentados AL.....	45-49
5.2. Evaluar cambios metabólicos en CS de fibras nerviosas de ratones wt y TrJ alimentados AL, consecuencia de la presencia de agregados, focalizándonos en la activación de las vías autofagica-lisosomal.....	50-52
5.3. Evaluar el tratamiento de RC analizando las fibras nerviosas periféricas de ratones wt y TrJ, sometidos a este tratamiento, con los parámetros analizados en los objetivos 2 y 3.	52-53
5.4 Estudiar la cantidad, morfología y tamaños de núcleos de las CS en las fibras nerviosas periféricas de ratones wt y TrJ alimentados AL y bajo RC.....	53-54
5.5. Estudiar la citoarquitectura en las fibras nerviosas periféricas de ratones wt y TrJ, alimentados AL y sometidos a RC.....	54-58
5.6. Analizar la morfología y estructura de la mielina en las fibras mielínicas wt y TrJ AL. En comparación con estos, se estudiarán los cambios en la mielina en respuesta al tratamiento de RC.....	59-60
5.6. Analizar cualitativamente la ultraestructura de la fibra nerviosa TrJ y wt AL y bajo RC.....	58-59
Discusión.....	64-81
6.1 Los perfiles de expresión de PMP22 en los nervios TrJ difieren de los wt y ambos cambian drásticamente en respuesta a la RC.....	64-67
6.2 Las rutas autofágica-lisosomal se encuentran alteradas en los nervios TrJ y responden al tratamiento incrementando su flujo en ambos genotipos.....	67-70
6.3 La cantidad de núcleos de CS en el genotipo TrJ es mayor que en wt y existe una tendencia a la disminución con el tratamiento.....	70
6.4 La citoarquitectura de la fibra nerviosa es genotipo específico y modulable por el tratamiento de RC.....	71-76
6.5 La morfología y estructura de las fibras mielínicas de ambos genotipos AL responden a la RC, incrementando su grosor y confirmando la activación de la ruta autofagica-lisosomal.....	76-77
6.6 La RC como herramienta terapéutica.....	78-79
6.7 Conclusiones finales y perspectivas.....	80-81
ANEXO I: Rutas de re plegamiento y degradación celular.....	82-86
7. Referencias.....	87-97
8. Agradecimientos.....	98-99

Abreviaciones

SN: Sistema Nervioso

SNP: Sistema Nervioso Periférico

SNC: Sistema Nervioso Central

CS: Células de Schwann

PsCS: Precursores de las CS

SCI: CS inmaduras

NRG1-III: Neuregulina 1 tipo III

MET: Microscopía Electrónica de Transmisión

MEC: Matriz extracelular

NR: Nodo de Ranvier

MAG: Glicoproteína asociada a mielina

ISL: Incisuras de Schmidt-Lanterman

PO: Proteína 0

MBPs: Proteínas de unión a la mielina

PMP22: Proteína periférica de la mielina

CMT: Charcot-Marie-Tooth

VCN: Velocidad de conducción nerviosa

HNPP: Neuropatía hereditaria con sensibilidad a la presión

TrJ: Trembrer J

RM: Rapamicina

AF: Ácido fórmico

DRGs: Ganglios de raíz dorsal.

RC: Restricción Calórica

AL: Alimentación *ad libitum*

wt: genotipo salvaje

CMT1E: Charcot-Marie-Tooth tipo 1 E

PA: Potencial de acción

HSP: del inglés Heat Shock Proteins.

mTOR: del inglés mammalian target of rapamycin

CEUA: Comisión de Ética en el Uso de Animales

IIBCE: Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

TA: Temperatura Ambiente

BI: Buffer de incubación

PMT: fotomultiplicador-

LC3: del inglés Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3

LAMP1: del inglés Lysosomal-associated membrane protein-1

Nf-68: Neurofilamento 68

F-actina: Microfilamentos polimerizados

TrkC: Receptor tirosin-kinasa tipo C

Ub: Ubiquitina.

MT: Microtúbulos

Resumen:

Dentro del heterogéneo grupo de las neuropatías hereditarias periféricas humanas, las alteraciones en el gen codificante de la Proteína de Mielina Periférica 22 (PMP22) constituyen más del 50%. Charcot-Marie-Tooth 1E (CMT1E), ubicada dentro de este grupo por su sustitución L16P, es una neuropatía desmielinizante, que afecta inicialmente la célula de Schwann (CS) y finalmente el axón y la fisiología toda de la fibra nerviosa. En el modelo murino Trembler-J (TrJ), utilizado para estudiar CMT1E, la patología manifestada se asocia a dificultades en el plegamiento de PMP22 así como agregación y acumulación en agregosomas perinucleares. En este contexto la vía autofágica-lisosomal se observa espontáneamente incrementada, favoreciendo la eliminación de agregados. De estos antecedentes se desprende la siguiente pregunta ¿Puede ser la estimulación de la autofagia un recurso terapéutico en estas afecciones neurodegenerativas incurables?

Con la realización de esta tesis, utilizando la estrategia de la Restricción Calórica (RC) como inductor autofágico, se evaluaron las consecuencias del tratamiento en la fibra nerviosa. Para ello se estudió inicialmente la biología básica de la fibra en condiciones normales (wt) y neurodegenerativas crónicas (TrJ). Se logró caracterizar los agregados proteicos de PMP22 y junto a éstos se analizó la expresión de la proteína PMP22 citoplasmática. Adicionalmente se evaluó el metabolismo de degradación de los agregados en la CS analizando la ruta autofágica-lisosomal. Por último, se evaluó la cito-arquitectura de la fibra nerviosa mediante el análisis de sus 3 principales componentes: microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos. Estos resultados fueron complementados con el análisis de la estructura mielínica mediante la evaluación de parámetros morfométricos así como, de la ultraestructura de la fibra nerviosa. Una vez establecidos los datos y condiciones basales para ambos genotipos con un régimen de alimentación ad libitum, se estudiaron las consecuencias del tratamiento de RC atendiendo cada uno de los aspectos antes mencionados.

Los análisis se realizaron utilizando abordajes de inmunodetección cualitativa y cuantitativa (microscopía confocal), morfométricos (microscopía óptica, luz transmitida) y ultraestructurales (microscopía electrónica).

Introducción y Antecedentes Generales:

El Sistema Nervioso (SN) constituye uno de los sistemas más complejos y relevantes para el funcionamiento de nuestro organismo. Clásicamente se ha destacado el rol del su unidad básica, la neurona, para el correcto funcionamiento. Sin embargo en la actualidad se le ha dado a la glía, considerada tradicionalmente como el “pegamento” que unía a las células operativas del SN, un lugar de similar importancia en el mantenimiento y funcionamiento de este sistema.

La clasificación principal divide al SN en: encéfalo y médula espinal que constituyen en SN Central (SNC), y los nervios periféricos que comunican estos centros con el resto del cuerpo constituyendo el SN Periférico (SNP). Este último presenta neuronas sensitivas que conectan los receptores sensitivos con circuitos de procesamiento en el SNC y neuronas motoras con dos componentes: axones motores que conectan encéfalo y médula con los músculos esqueléticos (división motora somática) y axones que inervan músculo liso, cardíaco y glándulas (división motora visceral o autónoma). El origen del SN vertebrado deriva principalmente de las células de tubo neural que darán lugar al SNC y las células de la cresta neural que dan origen a las células neuronales y gliales del SNP (Jessen & Mirsky, 2005). En la presente tesis profundizaremos en conceptos estructurales, funcionales y moleculares concernientes al SNP.

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

Los nervios periféricos se componen de numerosas fibras nerviosas que comunican los centros nerviosos con el resto de los órganos del cuerpo. El axón y todas las CS que lo acompañan en su trayectoria desde el cono de arranque hasta las proximidades de las terminales nerviosas constituyen la **fibra nerviosa**. Las neuronas y las células gliales interactúan en el SNP, con una proporción significativamente mayor de glías (Quintes *et al.*, 2010). La presencia de las CS rodeando, aislando y manteniendo los territorios axonales forma parte de una respuesta evolutiva que ha vuelto más eficiente y veloz la transmisión del impulso nervioso. Así, **la fibra nerviosa constituye una unidad estructural y funcional**; compuesta por CS y axón, cuya organización es esencial para la propagación del potencial de acción, la conducción saltatoria y la integridad funcional del axón (Salzer, 2003; Salzer *et al.*, 2008 y Simons & Trotter, 2007). El desarrollo de la misma requiere una de las más complejas interacciones entre diferentes tipos celulares

(Simons & Trotter, 2007), hecho que se manifiesta cuando cualquiera de sus dos componentes se ven afectados como en las neuropatías hereditarias periféricas, tal como describiremos más adelante.

II.- Origen y desarrollo de las células gliales y fibras nerviosas del Sistema Nervioso Periférico.

En el desarrollo temprano del SNP, las células de la cresta neural migran en dirección ventral para generar principalmente los ganglios sensoriales de la raíz dorsal y sus glías así como las neuronas y glías del SN autónomo. De estas células migratorias surgen los precursores de las CS (PsCS) y posteriormente las CS inmaduras (CSI). Estas células surgen durante el período embrionario murino entre el día 12-13. Ambas células transitorias presentan una dependencia paracrina con el axón, del cual dependen para la migración, sobrevivencia y proliferación. Esta dependencia asegura que sus proporciones sean adecuadas para la formación de las futuras fibras nerviosas (Jessen & Mirsky, 2005; Pereira *et al.*, 2012). Mientras esto ocurre a nivel de gliogénesis, los axones que formarán los nervios periféricos se encuentran emitiendo prolongaciones axonales que buscan contactar sus tejidos blanco, para posteriormente inervarlos. Durante este proceso, el axón y los PsCS se encuentran en íntimo contacto.

Continuando con la gliogénesis, entre el día 14-15 de gestación, los PsCS pasan a ser CSI encerrando grupos de axones, entre los que seleccionarán aquellos que eventualmente mielinizarán, así como con los que establecerán vínculos amielínicos. En este momento, las CS han adquirido la capacidad de auto-regular su supervivencia mediante la segregación autocrina de un grupo de factores de sobrevivencia tales como el Factor de Crecimiento IGF2 (del inglés Insulin Growth Factor 2), Neurotrofina 3 NT3 (del inglés Neurotrophin3), entre otros (Meier *et al.*, 1999). Finalmente, cerca del nacimiento, las CSI pasarán a ser CS maduras, cuyo destino dependerá del diámetro del axón al cual están asociadas. Aquellas CS que contactan grandes axones ($>1\mu\text{m}$) se diferencian en CS mielinizantes y las que contactan axones de pequeño calibre permanecen en surcos de las CS en un estado no mielinizante o amielínico formando los llamados “sacos de Remak” (Sherman & Brophy, 2005). El determinante de esta diferenciación parece ser la cantidad de **Neuroregulina 1 tipo III (NRG1-III)** expresada por el axón y no el diámetro axonal per se (Simons & Trotter, 2007). En el esquema de la Figura 1 se detallan las transiciones

celulares que ocurren en desarrollo del linaje de las CS (Jessen & Mirsky, 2005; Pereira *et al.*, 2012).

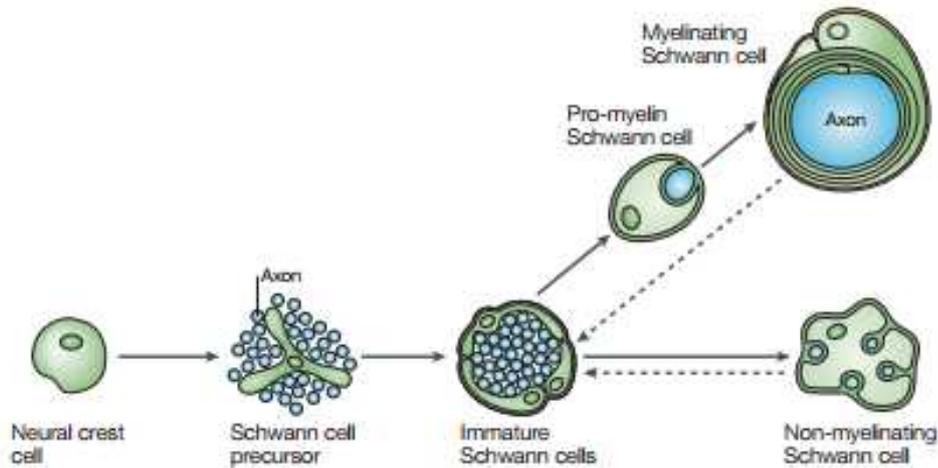


Figura 1. El linaje de las CS. Desde su desarrollo hasta su diferenciación, ocurren una sucesión de eventos celulares que determinan que las CS pasen por estados transicionales que incluyen: la transición de células madre migratorias de la cresta neural hacia la formación de PsCS, la transición desde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

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

III.- Mielinización, regulación génica y función mielínica:

La **mielinización** se produce durante un período prolongado en las tres primeras semanas de vida en roedores y durante un período que se inicia en la vida embrionaria y termina con la pubertad en humanos (Berthold *et al.*, 2005). Su comienzo ocurre luego del establecimiento de la polaridad celular por señales extrínsecas axonales, donde el complejo **Par-3** (miembro de la familia de proteínas adaptadoras Par) se localiza en la membrana glial interna adyacente al axón (membrana adaxonal). Allí, actúa en la adhesión al axón reclutando el receptor de Neurotrofina 75 (p75NTR). Se forma así un

complejo bicelular que participa del establecimiento de la polaridad celular, necesaria para el comienzo de la mielinización (Chan *et al.*, 2006). Luego de esto, ocurre la mielinización, proceso de múltiples pasos en el que una CS adhiere a un axón, su membrana interna crece ajustándose a su circunferencia, extendiéndose longitudinal y radialmente a medida que avanza el desarrollo, para posteriormente rodearlo totalmente y plegarse en torno a él. La membrana de la CS forma repliegues concéntricos y espiralados rodeando el axón de 10-100 veces (Quarles *et al.*, 2006). El diámetro del axón está en relación con el espesor de esta vaina, es decir, con el número de vueltas de la membrana de la CS. Mantienen así una relación aproximadamente constante: el diámetro del axón es 0,6 veces el diámetro de la fibra. Una vez enrollada, ocurre la extrusión de citoplasma (con excepción de los bordes) y compactación mielínica, resultando en la organización multilaminar propia de la mielina (Webster, 1993; Salzer., 1997). La figura 2 muestra como es la organización de las láminas de mielina observadas a nivel ultraestructural mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), la mielina aparece como una estructura laminar que se observa como líneas oscuras (electrondensas) y claras (translucidas) alternadas que se disponen en espiral alrededor del axón.

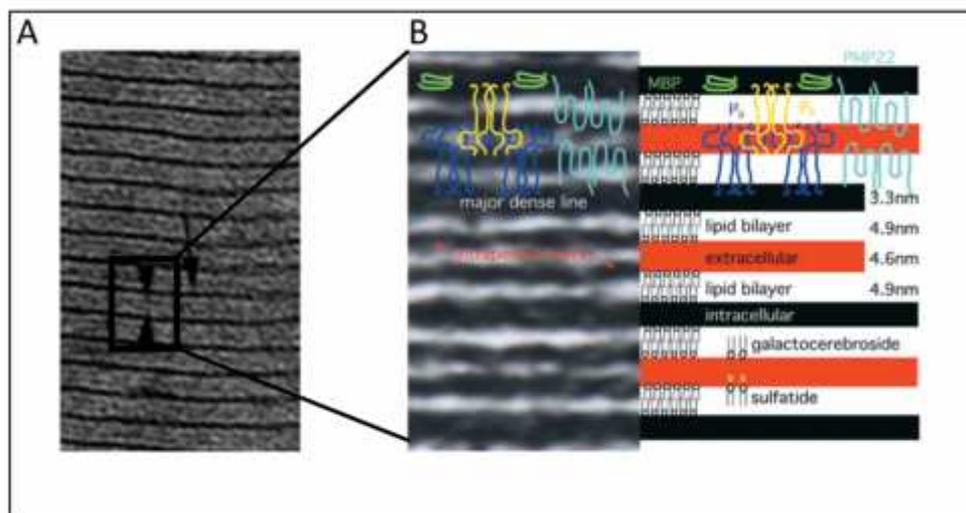


Figura 2. Micrografía electrónica de la mielina. En la fotografía **A** se observa la típica alternancia entre las zonas electrondensas (señaladas con flechas) y traslúcidas (cabezas de flechas) de la mielina compacta. Imagen tomada de King R, 2013. En el panel izquierdo **B** se observa una microscopía electrónica de la mielina compacta a mayor aumento, donde se observan las laminas alternadas conocidas como intraperíodo (que es en realidad una doble lamina) y la línea densa principal. En el panel derecho **B** se observa como es la ubicación de las principales proteínas mielinicas: P0 formando tetrameros, PMP22 formando dímeros y MBP monómeros. También se indican los glicolípidos galactocerebroside y sulfátido. Se indica además el grosor de las bicapas lipídicas, así como los espacios intra y extracelulares. Imagen tomada de Scherer & Arroyo, 2002.

A nivel de regulación génica, la mielinización de las CS en el SNP está bajo un estricto control transcripcional, post- transcripcional y epigenético. El control transcripcional incluye varios factores de transcripción, cuyo eje de activación principal pasa por **Sox10** (del inglés SRY-related HMGbox-10) que activa **Oct6** (del inglés octamer-bindingtranscriptionfactor-6). Sinérgicamente ambos factores inducen la expresión de **Krox20 (Egr2)** (del inglés early growth response-2), el cual activa la expresión de algunos genes mielínicos, suprime inhibidores de la mielinización y mantiene el estado mielinizante (Jagalur *et al.*, 2011; Mirsky *et al.*, 2008). Consistente con su rol central, Sox10 también participa en la progresión de la mielinización y su mantenimiento. Además de los factores de transcripción mencionados previamente, en la Figura 3 A podrán encontrar otros factores que también participan del proceso (coloreados en azul). Junto a estos activadores coexisten una serie reguladores negativos con menor participación, como **Notch y c-Jun** que participan en la desmielinización mediada por injurias provocando la desdiferenciación de las CS. **Sox2, Id4 y Id2** participarían también como reguladores negativos de la mielinización (Figura 3 A blanco y amarillo).

A nivel epigenético la activación de **NF-kB** (del inglés nuclear factor of k light polypeptide gene enhancer in B cells) mediada por NRG1-III parece ser crucial para la mielinización (Limpert & Carter, 2010). Apoyando estos resultados, la desacetilación de NF-kB por las histonas desacetilasas **HDAC1 y HDAC2** promovería la activación del gen Sox10 (promoviendo la mielinización). Otros estudios reportaron que también Sox10 podría reclutar HDAC1 y HDAC2 a regiones regulatorias no solo del gen *Sox10* sino también de *Krox20*, actuando nuevamente en la promoción mielínica. La figura 3 B esquematiza lo descrito respecto a este nivel de regulación.

Finalmente, algunos micro ARNs funcionarían como reguladores transcripcionales participando en la mielinización periférica. Se ha visto que la delección de Dicer en CS causa el detenimiento de la diferenciación y la promoción del estado pro-mielinizante (Pereira *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2012). Otras mutaciones en la misma molécula llevan a defectos en la selección radial, incrementos en la proliferación y apoptosis en el desarrollo postnatal (Yun *et al.*, 2010; Bremer *et al.*, 2010). Además de esto, se ha visto que a consecuencia de estas alteraciones, la integridad axonal se ve comprometida indicando efectos a nivel de las interacciones CS-axón que mantienen la integridad de la fibra (Pereira *et al.*, 2010). Se propone que podrían participar en la supresión de inhibidores de la mielinización desplazando el equilibrio entre inhibidores y activadores

a favor de los reguladores positivos (Pereira *et al.*, 2010). En la figura 2B se esquematiza lo descrito respecto a este nivel de regulación.

Además de estos mecanismos de regulación propios de las CS, el resto de los componentes de la fibra nerviosa periférica participan activamente en la regulación mielínica. Brevemente recordaremos la NRG1-III, cuya expresión es axonal y su rol es clave activando la mielinización de las CS mediante la unión con ErbB2–ErbB3 (del inglés erythroblastic leukemia viral oncogene homolog-2/3) (Birchmeier & Nave, 2008). Además, participa controlando el grosor mielínico en función del calibre axonal. Sobre la NRG1-III existen complementariamente mecanismos de proteólisis que mediante el clivaje de NRG1-III regulan la mielinización y modulan así la cantidad de proteína funcional. Esto puede repercutir sobre la mielinización tanto activándola como inhibiéndola (La Marca *et al.*, 2011).

Adicionalmente, las interacciones entre CS-axón impactan en la mielinización, encontrándose en este contexto tanto a **Necl4** (del inglés nectin-like protein-4) que mediante su interacción con Necl-1 promueve la mielinización (Maurel *et al.*, 2007; Spiegel *et al.*, 2007) como a **MAG** (del inglés myelin-associated glycoprotein) que presenta un rol importante en el mantenimiento de la estructura axonal, impidiendo el brotamiento. Finalmente, la presencia de una lámina basal rodeando las CS es un prerequisite crucial para la mielinización (Schachner, M & Bartsch, 2000). El contacto con la matriz extracelular (MEC) mediado por receptores específicos, permite que las CS integren las señales de crecimiento y diferenciación con la dinámica del citoesqueleto promoviendo de esta forma la mielinización y el mantenimiento mielínico (Pereira *et al.*, 2012). Las lamininas mediante su unión a $\alpha 1$ integrinas y receptores de distroglicanos influyen la selección radial, y en estadios posteriores, la organización nodal e internodal (Feltri & Wrabetz, 2005; Yang *et al.*, 2005). Se ha postulado igualmente, en nervios de rata el rol del colágeno XV vinculado a la lámina basal, en la modulación de la mielinización (Rasi *et al.*, 2010).

La principal **función** de la mielina es servir como aislante y facilitar la propagación de la señal a través del axón, conservando la energía y el espacio. Los potenciales de acción generados en el segmento inicial del axón se regeneran en los nodos de Ranvier (NR), haciendo más rápida y eficiente la propagación del impulso nervioso (Salzer, 1997; Poliak & Peles, 2003). Su rol en el mantenimiento de la integridad axonal es fundamental,

regulando el diámetro axonal, el espaciamiento y fosforilación de neurofilamentos y agrupando canales de Na⁺ en NR (Simons & Trotter, 2007).

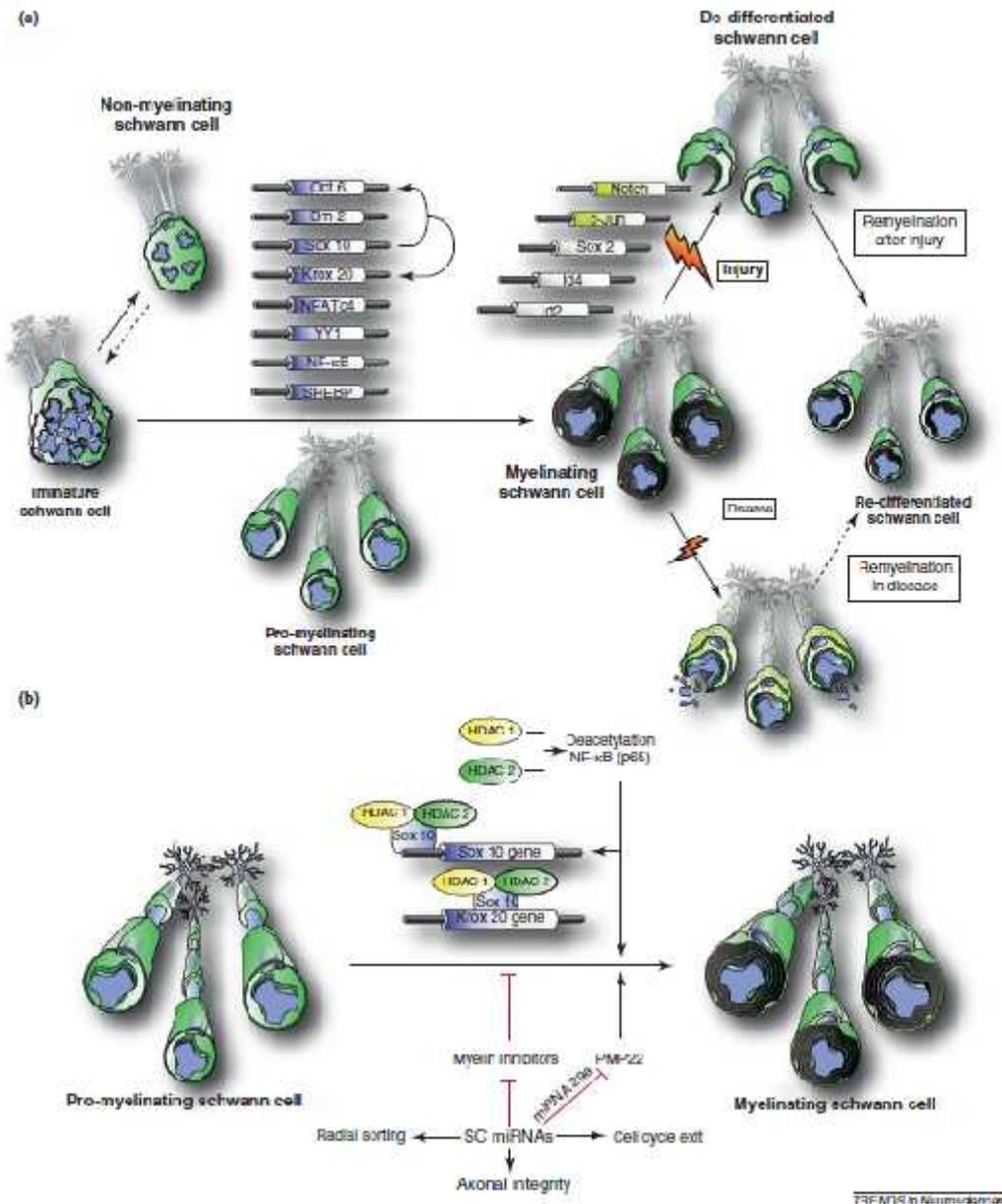


Figura 3. Regulación de la mielinización a nivel transcripcional, epigenético y post-transcripcional. En **a** se observan los posibles mecanismos implicados en la regulación transcripcional. En **b** se observa la regulación epigenética y mediante miARNs. Los mecanismos están explicados en el texto. Imagen tomada de Pereira *et al.*, 2012.

IV.- Organización polarizada de la fibra nerviosa:

Las CS mielinizantes y las fibras nerviosas son extremadamente polarizadas, morfológica y molecularmente. Un evento clave durante el proceso de mielinización es que todas las

moléculas de adhesión, canales iónicos y proteínas asociadas al citoesqueleto que se encuentran expresadas uniformemente en la fibra nerviosa, se redistribuyen hacia distintas regiones o dominios a medida que avanza la mielinogénesis. Al formarse la mielina, se determinan dominios específicos: las regiones de la fibra nerviosa rodeadas de mielina se denominan **internodos**, entre los que se ubican los **NR**. Esta sucesión de dominios constituye la **polaridad longitudinal de la fibra nerviosa**, en la cual las CS contiguas se estructuran en torno al NR, flanqueándolo con las uniones paranodales, los juxtapanodos e internodos. Coincidente con esta polarización, una vez finalizada la mielinización, la membrana interna de la CS (adaxonal) y el axolema (membrana del axón) quedan en estrecho contacto y se organizan transversalmente estableciendo una **polaridad radial** donde la membrana glial externa está en contacto con la lámina basal y MEC y la interna con el axolema y el citoesqueleto submembranoso (Salzer, 2003; Poliak & Peles, 2003).

Profundizando en la **polaridad longitudinal**, los **NR** son puentes entre las CS mielinizantes de aproximadamente $1\mu\text{m}$ de longitud donde el axolema está enriquecido en canales de Na^+ dependientes voltaje (principalmente Nav1.6), cuya función es regenerar el potencial de acción (PA) y comunicarlo al próximo nodo (Hille, 2001). Los NR están cubiertos por interdigitaciones (microvillis) del citoplasma abaxonal de las CS (externo a la mielina), las cuales establecen un íntimo contacto con el axolema nodal. Los microvillis están enriquecidos en el complejo de señalización ERM (Ezrin, Radixin y Moesin). Flanqueando los NR, en los **paranodos**, se hallan una serie de uniones axo-gliales especializadas que promueven la adhesión entre el axón y las glías, y constituyen una barrera a la difusión lateral de los canales iónicos nodales. Más allá de los paranodos, se encuentran los **juxtapanodos** que quedan debajo de la primera porción de mielina compacta y están enriquecidos en canales de K^+ 1.1 y 1.2, los cuales participarían durante la repolarización del potencial de acción. Por último llegamos al dominio más grande el **internodo**, cuya ubicación es bajo la mielina compacta donde puede tener 1mm de largo o más en fibras adultas del SNP (Abe *et al.*, 2004). Esta región mantiene un espacio periaxonal uniforme, el cual está alterado por ejemplo en las zonas donde los axones contactan con las incisuras. Allí se recapitularían los complejos proteicos presentes en paranodos y juxtapanodos (Peles & Salzer, 2000).

Cada dominio contiene un único set de moléculas de adhesión entre las membranas de la CS y el axón. Estas moléculas de adhesión establecen contacto con el citoesqueleto

submembranoso, mediante complejos proteicos, con lo que se da estabilidad a cada dominio (Susuki & Rasband, 2008).

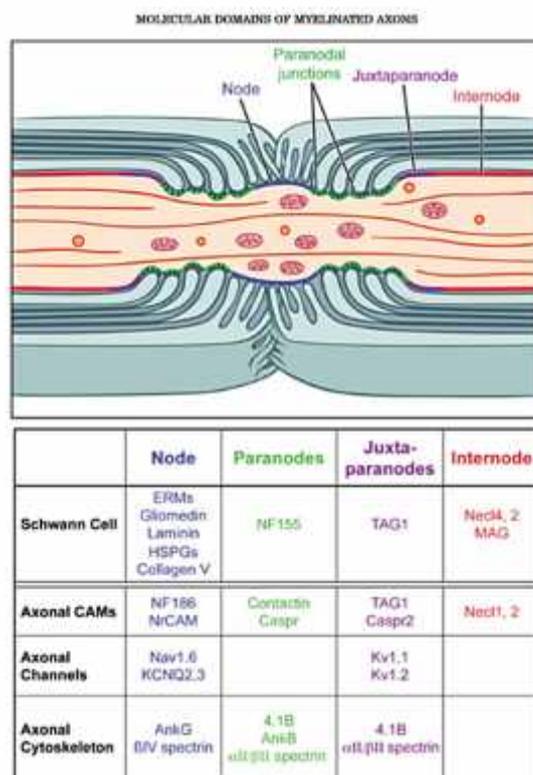


Figura 4. Organización y composición de los distintos dominios de las fibras mielínicas periféricas. Una sección longitudinal de la fibra nerviosa es esquemáticamente ilustrada en el panel superior, en ella se indica en azul la región nodal que es contactada por los microvillis que provienen de las membranas externas de las CS, en verde las uniones entre los bucles paranodales y la membrana axonal a nivel del paranodo, en violeta el juxtaparanodo y finalmente en naranja el internodo. El cuadro inferior, indica las principales proteínas de cada dominio que participan en el establecimiento de las uniones que mantienen estructurados los dominios, incluyendo los expresados por las CS, axón, citoesqueleto axonal y canales iónicos axonales. Imagen tomada de Salzer *et al.*, 2008.

Respecto de la **polaridad radial**, profundizaremos en ella en la región del internodo, donde las membranas plasmáticas de ambas células están separadas por una distancia constante (12–13 nm) (Oguievetskaia *et al.*, 2006). Si bien la identificación de las moléculas que participan en el ensamblaje de ambas membranas no es extensa, **MAG** (glicoproteína asociada a mielina) ha sido una de las primeras proteínas descritas allí. Su función es actuar en la promoción de interacciones iniciales uniendo la primer capa de mielina alrededor de los axones (mesaxón interno), actuando con diferentes componentes en el desarrollo ulterior de la mielina, encontrándose también en las Incisuras de Schmidt-Lanterman (ISL) (Trapp, 1990). Además de MAG, se han descrito a la familia **Necl** de moléculas de adhesión (Necl, por su nombre en inglés Nectin like), las cuales presentarían roles claves en la relación axo-glial internodal, promoviendo la diferenciación y

mielinización de la CS, así como participando en la organización del internodo y las ISL (Sakisaka & Takai, 2004).

Siguiendo la fibra en sentido radial, luego del espacio entre axón-mielina, sigue la región mielínica. Según el grado de compactación, la mielina puede ser dividida en dos regiones estructural y funcionalmente distintas que determinan dos subdominios: **mielina compacta** y **mielina laxa**. La primera región, cuya función es el aislamiento, inhibe completamente el intercambio de iones durante la conducción nerviosa. La mielina compacta tiene una composición que incluye principalmente **colesterol** y **esfingolípidos** así como **galactocerebrosidos** y **sulfatidos** (Suter & Scherer, 2003). Una proporción menor se compone de proteínas, cuyas cantidades rondan: proteína 0 (**P0**) (50%), proteínas de unión a la mielina (**MBPs**) (25%) y la proteína periférica de la mielina (**PMP22**) (5-7%), entre otras de menor proporción. La glicoproteína P0 es una proteína integral de membrana cuyo rol es unir las láminas mielínicas adyacentes a intervalos espaciales regulares. Las MBPs, se ubican en la cara citosólica de la membrana glial participando en la formación de la mielina y en la reducción de la capacitancia del internodo. Por último, PMP22 es una proteína integral de membrana, cuya importancia funcional es relevante en el desarrollo de desórdenes hereditarios en el SNP, tal como se describirá más adelante. En la figura 2 se muestra como es su disposición en la mielina compacta.

Las regiones de mielina laxa están presentes en los **bucles paranodales**, en ambos extremos de una misma CS, contiguos a las regiones nodales y en las **ISL**. Estas últimas son regiones de mielina laxa internodal que discontinúan longitudinal y transversalmente la mielina compacta. En la mielina laxa se expresan **Caderinas** y **Cateninas** (uniones adherentes), **Conexina32** (uniones comunicantes) y **Claudinas** (uniones cerradas) además de MAG (Trapp, 1990). Las ISL pueden considerarse canales citoplasmáticos espiralados que se extienden desde las superficies abaxonales hacia las regiones más internas, cuya presencia es necesaria para expandir y mantener la estructura mielínica del internodo y comunicar las regiones peri-mielínicas gliales entre sí (Cajal, 1928; Robertson, 1958; Hall & Williams, 1970 y Ghabriel & Allt, 1987). La función y el rol biológico de las ISL no han sido completamente elucidados, clásicamente se ha postulado que están involucradas en el crecimiento, mantenimiento y metabolismo mielínico especialmente en aquellos internodos remielinizados donde su frecuencia se encuentra incrementada (Cajal, 1928). Otras hipótesis, sugieren que actuarían como un

atajo citoplasmático para sustancias que atraviesan la mielina desde regiones más externas hacia las más internas (Singer & Salpeter, 1966; Singer & Green, 1968; Singer *et al.*, 1972; Rawlins, 1973). Se propone que estos “atajos” parecen estar destinados al tránsito de “maquinaria” de síntesis (ribosomas, ácidos nucleicos), para sustentar el mantenimiento de la propia CS y la mielina y quizás también el del axón (Kun *et al.*, 2007, Kun *et al.*, 2012a).

Fuera de la mielina, sigue una región de citoplasma externa a la CS que se encuentra en contacto con la membrana externa y en comunicación con el núcleo de la CS. Envoltiendo la CS y la fibra nerviosa toda, se encuentra la **MEC**. Esta última consiste en una malla tridimensional compuesta principalmente por proteínas y carbohidratos. Generalmente se ubica en los espacios intersticiales de los tejidos, presentando roles en la migración, proliferación y diferenciación celular, así como brindando soporte y regulando la comunicación intercelular (Gonzalez-Perez *et al.*, 2013). En la fibra periférica, la lámina basal (capa de la MEC) es secretada principalmente por las CS maduras, y está compuesta principalmente por Colágeno del tipo IV, laminina, fibronectina y nidógenos (Bryan *et al.*, 2012). Como ya hemos mencionado, la MEC mediante las lamininas y el colágeno, participa activamente en el desarrollo de la fibra nerviosa periférica. Las primeras regulan proliferación, sobrevivencia y dinámica del citoesqueleto de actina de las CS; todos procesos esenciales para la selección radial y la mielinización. El colágeno y sus receptores por su parte promueven la adhesión, su extensión y mielinización de las CS junto al crecimiento de las neuritas (Chernousov *et al.*, 2008). Además de participar en el desarrollo de la fibra, presenta funciones importantes en los procesos de reparación y regeneración (Bryan *et al.*, 2012), influenciando distintas facetas de la regeneración. La fibronectina por ejemplo, se veía incrementada atrayendo a las CS la zona de regeneración (Mathews *et al.*, 1995;; Baron-Van Evercooren *et al.*, 1982; Ahmed & Brown, 1999). Las lamininas tendrían un rol en promover la regeneración regulando el crecimiento axonal (Zhang *et al.*, 2003; Chen & Strickland, 2003). Conjuntamente, el nidógeno se veía incrementado luego de injurias (Lee *et al.*, 2007) y parecería ser necesario para la extensión de las neuritas. Otros componentes adicionales se han visto modulando la regeneración (Bryan *et al.*, 2012) y formando parte de la batería de respuestas de la fibra nerviosa a injurias.

Por fuera de la lámina basal se encuentra una capa de tejido conectivo denominado endoneuro, que recubre cada fibra.

V.- Cito-arquitectura de la fibra nerviosa:

El citoesqueleto constituye una compleja red tridimensional de filamentos proteicos encargados de proveer estructura, determinar la morfología celular, ubicar los distintos organelos celulares, organizar y realizar el movimiento celular, así como formar los rieles sobre los cuales ocurre el transporte intracelular. Lejos de constituir una estructura rígida, es un sistema muy dinámico que se encuentra fuertemente regulado. En la fibra nerviosa periférica el citoesqueleto de ambas células se desarrolla por separado. Sin embargo, una vez establecida la unidad funcional y estructural entre ambos tipos celulares, parecerían modularse recíprocamente.

En etapas tempranas del desarrollo, el citoesqueleto posee una activa participación en ambos componentes de la fibra nerviosa. En neuronas, células altamente polarizadas, ocurren procesos de establecimiento de polaridad y especificación del axón. En sus proyecciones se da una puja entre desarrollarse en el futuro axón o en dendritas y son los elementos del citoesqueleto, particularmente los filamentos de actina y microtúbulos, así como sus proteínas motoras asociadas y sus mutuas interacciones, los cuales determinarán la identidad final de cada proyección (Stiess & Bradke, 2011). Tal como se detalla en la figura 5, en el transcurso de la formación del axón, el citoesqueleto neuronal sufre una intensa actividad de reordenamiento.

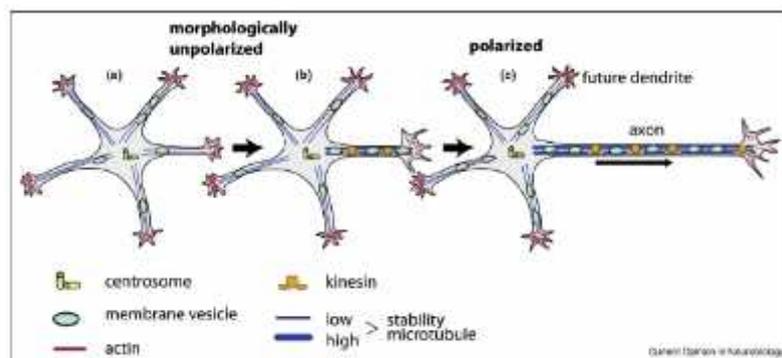


Figura 5. Mecanismos de polarización neuronal. En el curso de la polarización neuronal, el citoesqueleto sufre una serie de reordenamientos que incluyen: (a) El citoesqueleto de actina se vuelve más dinámico en el cono de crecimiento de una neurita y continúa en este estado (b) hasta que se establece el futuro axón (c). Cambios similares ocurren a nivel de la tubulina, sobre la cual se localiza la Kinesina 1. Imagen tomada de Witte & Bradke, 2008.

Al parecer, una distorsión local de la estabilidad del citoesqueleto de actina impediría la obstrucción y protrusión de los microtúbulos, con un consecuente impedimento del crecimiento dendrítico y favorecimiento del desarrollo de un axón (Bradke *et al.*, 1999). Una vez establecida la neurita que se transformará en axón, los microtúbulos protruyen y

se estabilizan. Posiblemente el centrosoma se posiciona en la base del futuro axón temprano en el desarrollo, promoviendo la polarización del citoesqueleto de microtúbulos. Otros autores, proponen un cambio en el orden de los acontecimientos, postulando que una breve estabilización local de los microtúbulos sería el determinante para que una neurita tome el rol de axón (Witte *et al.*, 2008). De esta forma, la dinámica de la polimerización de la actina junto a la estabilización de los microtúbulos orquestan la polarización neuronal (Witte & Bradke, 2008).

Por su parte, las CS deben polarizar su citoplasma externo y formar distintos dominios: las bandas de Cajal y trabéculas y las aposiciones, placas o parches (Ramón & Cajal, 1933). Estos últimos deben su nombre a su apariencia en micrografías electrónicas e inmunotinciones respectivamente (Sherman *et al.*, 2001; Albrecht *et al.*, 2008). En la figura 6 se pueden observar los mismos mediante distintas técnicas. El primer dominio está constituido fundamentalmente por actina filamentosa y microtúbulos, los cuales una vez compacta la mielina formarán canales citoplasmáticos que funcionaran como vallas restringiendo la localización de los segundos dominios. En estos últimos se localiza específicamente la Distrofina 2 (DRP2 del inglés dystrophin related protein 2), la cual a través de uniones con otras proteínas enlaza a la fibra con su MEC (Saito *et al.*, 1999; Yamada *et al.*, 1996). En la fibra nerviosa en formación, estas rutas citoesqueléticas presentes tanto en el citoplasma axonal como en el glial, son imprescindibles para el transporte hacia la terminal sináptica y el mantenimiento del axón, así como el direccionamiento de moléculas hacia dominios gliales distantes para la formación de la mielina. Por intermedio de ellas se asegura una correcta transmisión nerviosa en la terminal, elongación de la CS y síntesis mielínica (Kidd *et al.*, 1994; Trapp *et al.*, 2004).

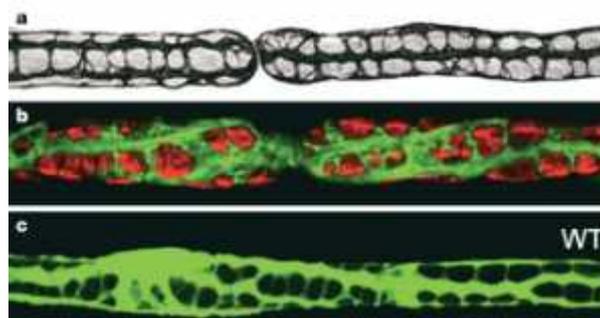


Figura 6. Fibras longitudinales donde se observan las bandas de Cajal a nivel de las CS. Las bandas protoplasmáticas transversales del panel a fueron tenidas con plata por Ramón y Cajal. En b se pueden observar fibras marcadas con Falloidina (verde) y DRP2 Distrofina 2 (rojo). El citoplasma de las CS se excluye de las regiones marcadas para DRP2. En c se observa la marcación citoplasmática de S100. Imagen tomada de Court *et al.*, 2004.

VI.- Importancia de la interacción entre CS y axón:

Como ya hemos visto, el desarrollo de las fibras mielínicas periféricas requiere una compleja interacción entre CS y neuronas. Señales axonales regulan la proliferación, supervivencia y diferenciación de CS y al mismo tiempo participan en la determinación del grosor mielínico. Mientras tanto, las señales gliales regulan el citoesqueleto, transporte axonal y son requeridas para la supervivencia neuronal (axonal). Como fruto de esta unión celular interdependiente, existe una óptima relación entre el diámetro axonal, el grosor mielínico y el tamaño internodal, lo cual lleva a una velocidad de conducción nerviosa máxima (Poliak & Peles, 2003).

Cuando, por diferentes causas (envejecimiento, cambios metabólicos agudos o crónicos, injurias puntuales o permanentes, mutaciones, etc), el equilibrio funcional y estructural axón-glia se altera, las consecuencias inmediatas reflejan la responsabilidad integrada de ambos tipos celulares (CS y axón) en el mantenimiento de la fibra nerviosa. Como consecuencia del desplazamiento de este equilibrio, la expresión génica, la distribución de marcadores dominio específicos, la estructura de la mielina y de la fibra nerviosa toda pueden verse alterados. Así, ambas células parecen compartir mecanismos de regulación que involucran y vinculan sus respuestas celulares tanto en condiciones normales como neurodegenerativas (Maier *et al.*, 2002; Niemann *et al.*, 2006).

La importancia de esta relación se manifiesta claramente en las neuropatías periféricas hereditarias con mayor predominio, Charcot-Marie-Tooth (CMT) (Sahenk, 1999). Las alteraciones moleculares que determinan los múltiples subtipos de esta última, tienen su origen genético en mutaciones que afectan tanto a proteínas intrínsecas de CS, como de las neuronas cuyos axones constituyen la fibra nerviosa. Sin embargo, las diferencias entre sus formas desmielinizantes y axonales no son del todo claras (Maier *et al.*, 2002). Mientras las causas genéticas que determinan las CMT son heterogéneas, la mayoría de las formas presentan manifestaciones clínicas que resultan de la degeneración y pérdida de axones distales y generalmente el tiempo hace que confluyan en axonopatías funcionales. Este hecho evidencia una compleja e interconectada participación de CS y axones en el fenotipo resultante de la patología. Por este motivo, numerosos investigadores han intentado comprender los caminos de señalización y los mecanismos por los cuales las alteraciones en la CS influyen la relación glía-axón, tanto en el desarrollo de la fibra nerviosa como en su establecimiento en individuos adultos.

VII.- Neuropatías y síndrome Charcot Marie Tooth

Las neuropatías constituyen enfermedades neurológicas con un amplio espectro de signos clínicos. Sus causas pueden ser extremadamente variadas incluyendo factores genéticos así como no genéticos. Dentro de las neuropatías hereditarias periféricas, el síndrome CMT, ha sido uno de los subgrupos donde más se ha profundizado en los mecanismos que la subyacen (Shy *et al.*, 2005; Nave *et al.*, 2007). CMT, fue descrita por primera vez en 1886 (Charcot & Marie, 1886; Tooth, 1886) y constituye la neuropatía periférica humana que reúne los desórdenes hereditarios más frecuentes del SNP afectando a sus principales células: CS, neuronas sensitivas y motoras, así como la relación entre ambas.

Se hereda habitualmente en forma autosómica dominante aunque también existen formas recesivas y ligadas al cromosoma X (Giambonini-Brugnoli *et al.*, 2005; Russo *et al.*, 2011). Clásicamente se ha dividido a estos desordenes en 2 grandes grupos con un similar fenotipo clínico, distinguiéndose las CMTs primariamente desmielinizantes o Schwannopatias (CMT1), definidas por una reducción en la velocidad de conducción nerviosa (VCN) y las primariamente axonales o axonopatías (CMT2), con VCN normales y potenciales evocados sensoriales y motores de reducida amplitud (Nave *et al.*, 2007). A pesar de esta clasificación inicial, en consonancia con el avance en el conocimiento genético en los últimos años, se han identificado 53 loci y 36 genes específicos relacionados con diferentes tipos de CMTs, surgiendo así una clasificación más amplia de estas afecciones (en la Figura 7 se muestra una de las posibles clasificaciones de las CMTs). A pesar de que los datos epidemiológicos de CMT son difíciles de obtener, se estima la prevalencia de este trastorno en 1/3300 (Bird, 2013), siendo la más común de las neuropatías periféricas de origen genético.

CLASIFICACIÓN DE CMT:

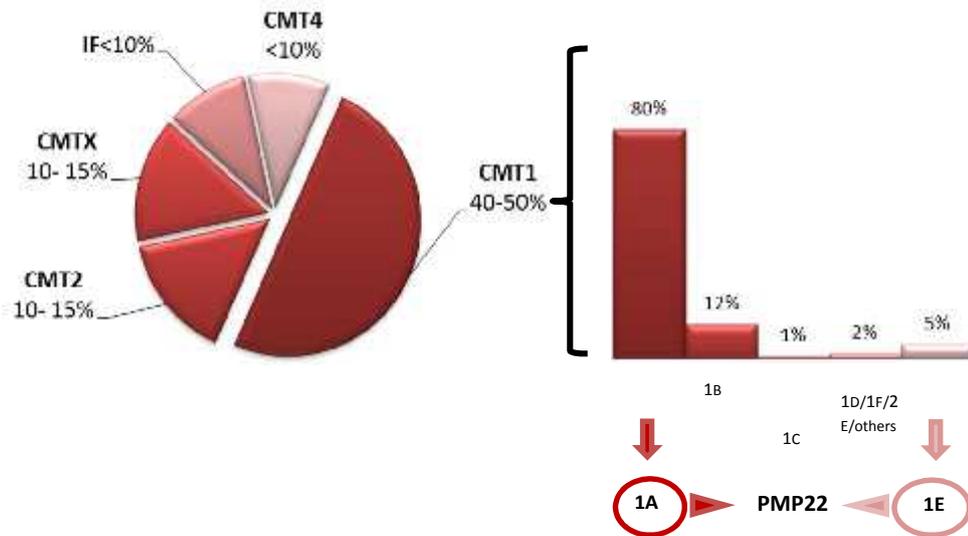


Figura 7. Los gráficos muestran la clasificación de tipos de CMTs extraída de NCBI Bookshelf Gene Reviews, Charcot-Marie-Tooth Hereditary Neuropathy, basada en patrones de herencia y genética molecular. Así, CMT1 se corresponde con anomalías mielínicas, CMT2 con axonopatías, IF o forma intermedia, incluye individuos con una combinación de axonopatía y mielinoopatía, CMT4, puede ser axonopatía o mielinoopatía, y CMTX es una axonopatía con cambios mielínicos secundarios. Dentro del grupo de las CMT1A, los 6 subtipos son clínicamente indistinguibles, diferenciándose únicamente en base a la alteración genética que lo provoca. Así, CMT1A y 1E son generadas por alteraciones genéticas en el gen de PMP22, CMT1B por mutaciones en P0, CMT1C por mutaciones en el liposacárido inducido por el TNF, CMT1D por la proteína 2(P2) de respuesta temprana al crecimiento y por último, CMT1F/2E por alteraciones en los neurofilamentos livianos. Datos tomados de Bird, 2013.

Las neuropatías producen degeneración progresiva de los nervios periféricos, llevando a inestabilidad mielínica. Esto resulta en afecciones motoras y sensoriales, cuyas manifestaciones clínicas principales son amiotrofia, debilidad muscular, déficit motor progresivo en miembros inferiores y posteriormente superiores. Además puede generar deformidades en pies y manos, lo cual se conoce clínicamente como pie cavo y mano en garra. Los déficits sensoriales y el dolor son menos prominentes en CMT en relación con otras neuropatías (Shy *et al.*, 2005; Nave *et al.*, 2007). La edad en la cual aparecen las manifestaciones clínicas es variable dependiendo de las distintas formas, pero suele ser entre la primera y la tercera década de vida. La evolución clínica es crónica y lentamente progresiva. El esquema de la figura 8, ilustra como a pesar de los distintos orígenes genéticos y los diferentes signos clínicos, todas las CMT parecen confluir en un mismo camino patológico.

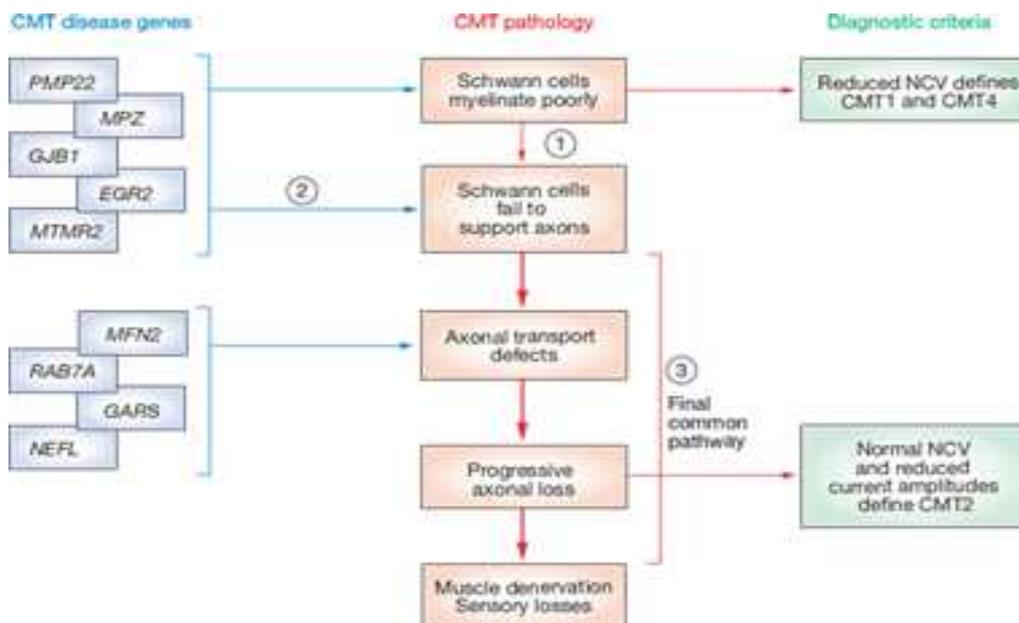


Figura 8. Ruta común para patogénesis de CMT. Las neuropatías desmielinizantes son clínicamente diferentes de las axonopatías según criterios genéticos y electrofisiológicos. Ya sea por la presencia de alteraciones genéticas en las CS que resultan en déficits en la formación y mantenimiento mielínico (1) o en dificultades para mantener la integridad axonal (2); la disfunción glial suele perturbar la integridad axonal tanto las neuropatías desmielinizantes como las axonopatías, haciendo que confluyan en un camino patológico común (3). Figura tomada de Nave *et al.*, 2007.

CMTs de tipo 1.

Las neuropatías desmielinizantes (CMT1), mielinopatías, presentan mutaciones que alteran la integridad estructural de la mielina, representando del 40 al 50% de las CMTs. Dentro de este grupo, alteraciones en el gen de PMP22 constituyen el 85% (Bird, 2013). Fenotípicamente, se identifican las CMT1 por la pérdida de masa y debilidad muscular, electromiograma con muestras de signos espontáneos de denervación muscular así como pérdida axonal. La desmielinización altera la distribución de los canales iónicos axonales, lo cual repercute en la regeneración y la propagación de potenciales de acción, resultando en la reducción en la VCN (Salzer *et al.*, 2008). Esta disminución aparece aún antes que los signos clínicos, sirviendo en el diagnóstico precoz de la enfermedad. Histológicamente, los detalles relevantes son: desmielinización segmental, remielinización paranodal e hiperplasia concéntrica de la vaina de mielina (imágenes en “bulbo de cebolla”).

CMT1A es un desorden autosómico dominante causado por una duplicación en el cromosoma 17p11.2-12, de un segmento de ADN que contiene al gen de PMP22 entre otros genes. Este grupo incluía además, los casos de CMT1 generados por mutaciones puntuales en el gen de PMP22, sin embargo actualmente se los ha clasificado dentro de

un nuevo subtipo, CMT1E (Bird, 2013; Li *et al.*, 2013a). Los pacientes CMT1E presentan fenotipos clínicos que no se distinguen de los pacientes con otros subtipos de CMT1. Las mutaciones puntuales conocidas en PMP22 incluyen: 44 sustituciones aminoacídicas provocadas por cambios de base, 14 deleciones, 2 inserciones, 1 translocación recíproca, varias mutaciones en sitios de empalme así como sustituciones de una base en el exón1A no codificante y en la región 3' UTR (Fig. 9). Con solo unas pocas excepciones, las mutaciones en PMP22 se heredan de forma autosómica dominante (Russo *et al.*, 2011).

Dada la variabilidad fenotípica de los pacientes, el diagnóstico definitivo de CMT1E debe acompañarse del análisis genético de PMP22. Clínicamente presentan los mismos síntomas ya mencionados anteriormente. Se cree que CMT1E posee un mecanismo de ganancia de función tóxica diferente al mecanismo presente en portadores de duplicaciones (Giambonini-Brugnoli *et al.*, 2005).

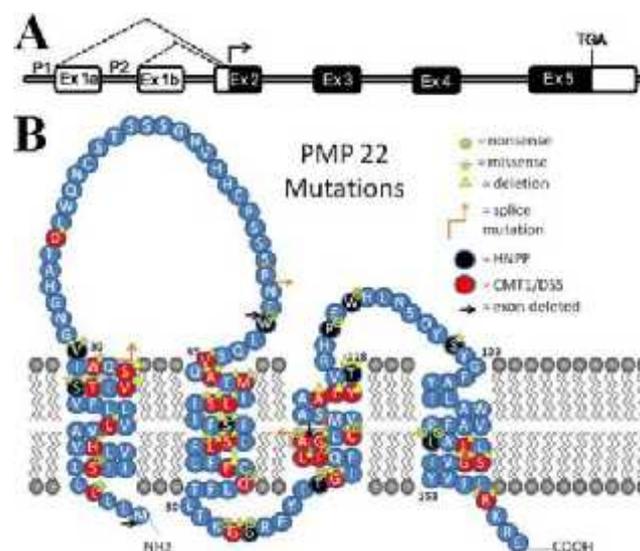


Figura 9. Estructura del gen de PMP22 y su proteína. En A se representa esquemáticamente el gen de *pmp22* humano con sus 6 exones. El exón 1a contiene el transcrito expresado en las CS y el 1b el que se expresa en las células no neurales. En B se muestra una representación esquemática de la topología de la proteína donde se observan los dominios intra y extracelulares, así como los 4 dominios transmembrana. En ella se muestran además varias de las mutaciones que generan tanto CMT1A y E entre otras neuropatías causadas por alteraciones en PMP22. Figura tomada de Nave *et al.*, 2007.

VIII.- Modelos animales de CMT1A y E:

Los modelos animales son muy útiles para estudiar los procesos fisiopatológicos de las neuropatías periféricas. Al mismo tiempo pueden ser de gran utilidad para el ensayo de nuevos fármacos y aproximaciones terapéuticas. En relación a las mutaciones en el gen

de PMP22 que generan diversas neuropatías, existen modelos específicos para cada una de las causantes genéticas incluyendo duplicaciones, deleciones y mutaciones puntuales (Russo *et al.*, 2011).

Mucho de lo que se conoce de la patogénesis de CMT1E ha sido derivado del estudio en dos modelos murinos: Trembler y Trembler J (Suter *et al.*, 1992; Valentijn *et al.*, 1992). En particular, nuestro grupo de trabajo cuenta con el modelo Trembler J (TrJ), el cual surgió en 1979 en el Laboratorio Jackson (USA) y ha sido instalado y mantenido desde el año 2008 en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Clemente Estable (IIBCE). Los TrJ presentan como características fenotípicas parálisis espásticas y un temblor generalizado, los cuales estarían causados genéticamente por una mutación puntual autosómica semi-dominante, identificada en el gen de *pmp22*. Esta mutación se ubica en el cromosoma 11 de ratón, el cual presenta regiones de síntena conservada con el cromosoma 17 humano (Buchberg *et al.*, 1989). Como consecuencia de ella, ocurre una modificación del primer dominio transmembrana de la proteína final, provocando el reemplazo de una Leucina por una Prolina en el residuo 16 (L16P). Esto impide el normal plegamiento de la proteína y modifica su inserción en la membrana, afectando sus interacciones extra o intracelulares consigo misma, así como con otras moléculas (Suter *et al.*, 1992; Quarles *et al.*, 2006). Esta proteína no solo pierde la capacidad de plegarse correctamente, sino que adquiere un efecto tóxico para la CS (Tobler *et al.*, 2002; Myers *et al.*, 2008). Los hallazgos patológicos encontrados en sus nervios incluyen disminución marcada de la mielinización del axón con perfiles de degeneración axonal, excesiva proliferación de CS y una lámina basal redundante (Henry *et al.*, 1983), entre varias otras alteraciones que surgen a consecuencia directa e indirecta del déficit genético.

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

IX.- La proteína mielínica periférica PMP22:

Mutaciones generadas en el gen de PMP22 son responsables de más del 50% de los casos de CMT, incluyendo la duplicación heterocigota del gen, lo cual resulta en CMT1A, su delección que origina la neuropatía hereditaria con sensibilidad a la presión (HNPP) y mutaciones puntuales que provocan CMT1E (en la Figura 9 se muestran algunas de ellas). Estas patologías asociadas a alteraciones genéticas en PMP22, irrumpen la organización de la mielina y a consecuencia, la integridad del axón.

Arquitectura del gen: Inicialmente PMP22 fue aislado de fibroblastos murinos NIH3T3 como uno de los genes específicos cuya expresión se incrementaba en el arresto o G0 del ciclo celular. Al privar a estas células de suero, la expresión de PMP22 se veía incrementada (Manfioletti *et al.*, 1990; Schneider *et al.*, 1988). Homólogo al gen *gas3*, fue descrito el transcripto SR13, aislado del nervio de ratas cuya expresión disminuye en la fase aguda luego de una injuria. Así, *gas3/SR13*, fue más tarde caracterizado como un solo gen, cuya expresión originaba a PMP22 (Welcher *et al.*, 1992; Snipes *et al.*, 1992).

En el genoma humano, el gen de *pmp22* se localiza en el cromosoma 17p11.2 y consiste en 40 kb que incluyen 6 exones conservados en humanos y roedores (Fig. 9 a). Dos exones (Ex1a y Ex1b) se transcriben alternativamente, generando 2 transcriptos del gen que difieren en su región 5' no traducida. Posiblemente habrían dos promotores diferentes que regularían la expresión de cada transcripto. De hecho, se han aislado 2 transcriptos diferentes (CD25 y SR13) en ratas y se han hallado transcriptos homólogos a ellos en humanos y ratones (Welcher *et al.*, 1992). La región codificante del gen va desde el exon2 al exon5 (Fig. 9a). Los transcriptos de PMP22 se expresan difusamente durante los estadios embrionarios, incluso en el SN. Su expresión es relativamente baja en el SNC, incrementando en núcleos motores de los nervios craneales y en las neuronas espinales, sin embargo los transcriptos y la expresión de los mismos son abundantes en las CS de los nervios periféricos (Parmantier *et al.*, 1995; VandeWetering *et al.*, 1999; Jetten & Suter, 2000; Roux *et al.*, 2004; Ohsawa *et al.*, 2006).

Estructura proteica: PMP22 es una pequeña proteína integral de membrana de 22 kDa que incluye 4 dominios transmembrana, dos bucles extracelulares y uno citoplasmático (Fig. 9 b). Ambos extremos terminales están expuestos al citoplasma y se cree que el primer bucle extracelular mediaría interacciones homofílicas con PMP22 y el segundo mediaría interacciones heterofílicas con P0 (Hasse *et al.*, 2004.). Este modelo estructural

ha sido cuestionado postulándose modelos estructurales alternativos con 3 y 2 dominios transmembrana (Sakakura *et al.*, 2011). La proteína presenta además una N-glicosilación en el aminoácido Asn 41 (Taylor *et al.*, 2000; D'Urso & Müller, 1997).

Diversidad funcional: Si bien su más alta expresión ocurre en la CS, donde participa en la iniciación de la mielinización y se localiza luego en la mielina compacta cumpliendo un rol estructural, se han descrito variados roles para esta proteína no relacionados con los mencionados, hecho que indica su versatilidad funcional. Dentro de estos últimos, se plantea un rol de PMP22 en la proliferación celular y la supervivencia (Schneider *et al.*, 1988). En este sentido, se ha observado que tanto la sobreexpresión como una menor expresión de PMP22, influyen la proliferación con consecuencias que fluctúan en función del modelo utilizado, etapa de la vida del mismo, tipo de estudio (CS *in vivo* o *in vitro*), entre otros (Li *et al.*, 2013a). En cuanto al relacionamiento de PMP22 con la apoptosis, se ha señalado que alteraciones genéticas en el gen de PMP22, resultan en una apoptosis incrementada de CS en cultivo, mielinizantes en ratones y en humanos, lo cual implicaría su participación en las vías de señalización apoptóticas. La apoptosis sólo se ha evidenciado en CS envejecidas *in vivo*, al parecer, células deficientes en PMP22 presentan consecuencias más leves que aquellas que sobre-expresan o presentan mutaciones puntuales en la proteína. El mecanismo por el cual PMP22 estaría involucrado en la muerte celular es aún incierto y no sólo podría estar presente en las CS, sino que se plantean nuevas interrogantes en relación a qué rol juega PMP22 en el balance detención celular versus muerte (Attardi *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2013a).

En otro plano, ha sido descrita la participación de esta proteína en las uniones celulares y en las interacciones con la MEC. En este sentido, por su homología aminoacídica con la Claudina-1, PMP22 ha sido considerada como un miembro de la familia de Claudinas. De hecho, co-localiza con proteínas de la *zonula ocludens-1* y con claudinas en células epiteliales. Al mismo tiempo, parece formar un complejo con $\alpha 6 \beta 4$ integrina, presente en la lámina basal de la CS, la cual mediaría la interacción de PMP22 con la MEC (Li *et al.*, 2013a).

Metabolismo de PMP22 y formación de agregados: PMP22 presenta mayormente una estructura en α -hélice con baja estabilidad termodinámica que en estado nativo es propensa a agregarse (Tobler *et al.*, 2002; Snipes *et al.*, 1992). Así, el 80% de la proteína neo-sintetizada es degradada rápidamente por el proteasoma, presumiblemente debido a

su mal plegamiento (Notterpek *et al.*, 1999; Yamada *et al.*, 2003). Este comportamiento proteico afecta en especial a células metabólicamente activas, como las CS, las cuales son particularmente sensibles a la acumulación de proteínas dañadas (Rangaraju *et al.*, 2008). Las CS wt, parecieran lograr un equilibrio funcional en el cual participaría activamente la ruta de degradación proteasomal, permitiendo degradar el exceso de PMP22.

Sin embargo, en presencia de alteraciones genéticas en *pmp22*, este hecho pasa a cobrar importancia con consecuencias sobre la homeostasis celular. En los casos donde existen más copias del gen, la síntesis de la proteína es mayor, lo cual provocaría naturalmente una proporción mayor de proteína destinada a la degradación, debido al exceso “genético” (Fig. 10 A). Cuando la proteína esta mutada, alterando su conformación y dinámica de plegamiento, falla en su intento de incorporarse a la membrana, generando acumulación citosólica y disminuyendo la cantidad de proteína destinada a formar mielina (Fig. 10 B). En ambos casos la fracción destinada a la degradación esta incrementada, hecho que hace que ambas mutaciones confluyan en un mismo problema metabólico. Este consiste en la saturación del proteasoma, acumulación de la proteína a lo largo de la vía de secreción y a la formación agregados perinucleares/centrosómico-proximales (Notterpek *et al.*, 1999; Ryan *et al.*, 2002; Rangaraju *et al.*, 2008). Así, estos procesos celulares contribuyen al proceso desmielinizante patológico (Fortun *et al.*, 2006).

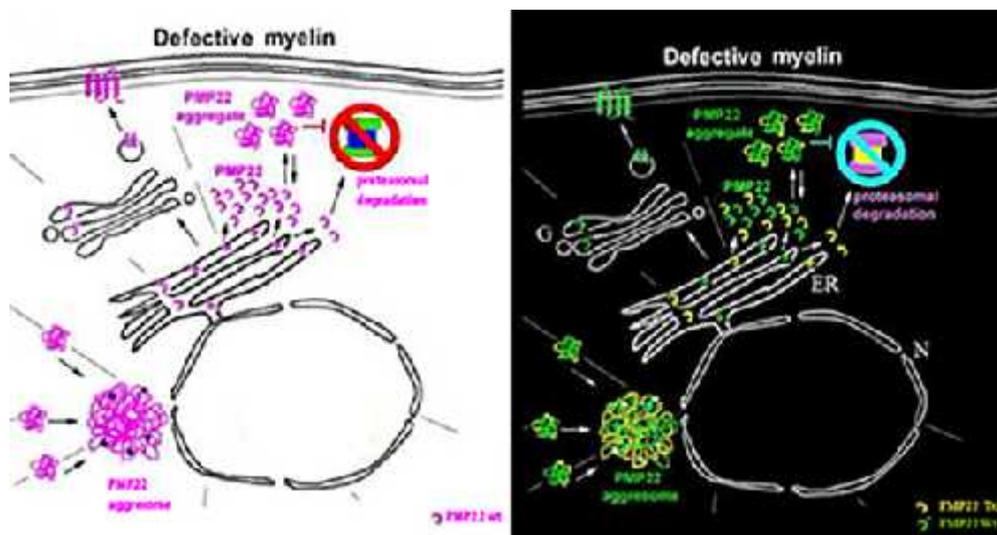


Figura 10. Síntesis de PMP22, saturación del proteasoma y formación de agregados en modelos de duplicaciones y mutaciones puntuales. En A se representa en proceso de síntesis de PMP22 en CS con sobreexpresión, cuando la proteína sale del RER, una porción sigue el camino hacia el Golgi y luego a la membrana, donde realiza su función estructural. Sin embargo el 80% de la proteína no logra plegarse correctamente por lo que es sustrato del proteasoma. Debido al exceso genético, este porcentaje se encuentra multiplicado, hecho que sobresatura el proteasoma y desemboca en la aparición de pequeños agregados, que formaran el agresoma perinuclear. En B se observa la situación generada por mutaciones puntuales en el gen de PMP22. Al igual que en el modelo anterior, la proteína sana va hacia la membrana vía RER- Golgi, en tanto que la PMP22 portadora de la mutación puntual es incapaz de plegarse correctamente y también sobresatura el proteasoma, llevando a la formación de agresomas. Figura tomada y modificada de Rangaraju *et al.*, 2008.

X. Antecedentes específicos:

Los agregados proteicos constituyen un tipo particular de cuerpo de inclusión citoplasmático, llamado **agresoma** o **agregosoma**, que se forman cuando el proteasoma es inhibido o saturado. Su acumulación y ensamblaje es un proceso que ocurre en varios pasos y mediante el cual pequeños agregados son transportados vía microtúbulos hacia regiones cercanas al centrosoma, donde finalmente se formará la inclusión final (Johnson *et al.*, 1998, Fortun *et al.*, 2005, 2007). Cuando se habla de agresomas, generalmente nos referimos a complejos oligoméricos de proteínas mal plegadas o desplegadas que se estructuran como un complejo amorfo, insoluble y metabólicamente estable bajo condiciones fisiológicas. Los agresomas son encapsulados por filamentos intermedios que pueden ser neurofilamentos en neuronas así como vimentina y keratina en células no neurales (Kopito, 2000). El encapsulamiento promueve estabilidad a la estructura y previene interacciones no específicas (Hyttinen *et al.*, 2014). El esquema de la figura 11 muestra cómo se da el proceso de agregación.

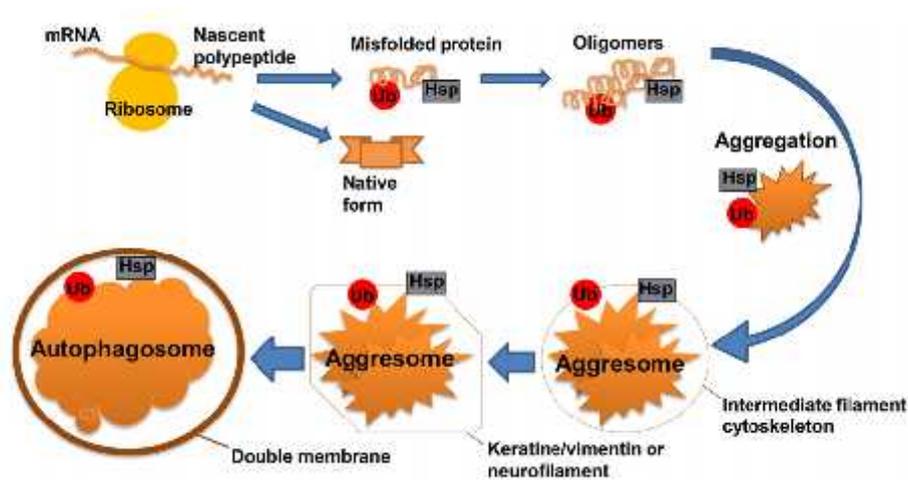


Figura 11. Agregación, formación de agresomas y autofagosomas. El proceso comienza con el nacimiento de proteínas que no logran plegarse correctamente. Estas son asistidas por HSPs que intentan colaborar con el plegamiento, si no lo logran entonces los péptidos serán marcados para su degradación mediante Ub. Luego, formarán oligómeros con proteínas en la misma situación y más adelante multímeros. Estos pequeños agregados, se trasladarán hacia sitios pericentriolares, donde se unirán a otros, incrementando su tamaño. Finalmente estos serán rodeados de filamentos intermedios, formando el agresoma. Cuando son secuestrados por un autofagosoma seguirán la ruta de degradación mediante autofagia. Figura tomada de Hyttinen *et al.*, 2014.

Existen varias patologías que se asocian a la formación de agregados, dentro de las cuales se encuentra CMT1E. En esta, el desplazamiento del equilibrio entre las síntesis/plegamiento de PMP22 y su degradación hacia la formación de agregados, influye en la patogénesis de la neuropatía, aunque no está del todo claro como lo hace.

Como consecuencia de este desequilibrio, CMT1E presenta como sello celular característico la presencia de agregados proteicos de PMP22. Al igual que en las biopsias de nervios de pacientes, los agregados de PMP22 en ratones TrJ, sugieren como ya se ha mencionado: deficiencia de plegamiento y menor capacidad degradativa del proteasoma, una reducida tasa de recambio de PMP22, la acumulación de otros sustratos ubiquitinizados y la activación de la respuesta autofágica (Fortun *et al.*, 2003, 2005, 2006).

Al igual que en otras patologías con formación de agregados proteicos, una forma de recuperar la homeostasis celular es estimulando la actividad de las HSP (del inglés Heat Shock Proteins). CS en cultivo pre-tratadas para incrementar los niveles de HSPs reducen la formación de agregados de PMP22 previa inhibición del proteasoma (Fortun *et al.*, 2007). Alternativamente, la re-dirección de los sustratos del proteosoma hacia la autofagia mediada por la degradación lisosomal, puede constituir otra vía de recuperación homeostática. (En el **Anexo I**, se profundiza sobre la autofagia). Así, se ha visto que en modelos de neurodegeneración la estimulación de la autofagia reduce el porcentaje de células con inclusiones y protege contra la toxicidad neuronal (Ravikumar *et al.*, 2004). Particularmente, la inducción autofágica en nervios neuropáticos ha representado una vía para la eliminación de agregados proteicos. Espontáneamente la formación de agregosomas en CS en cultivo se asocia con la biogénesis de autofagosomas. Esto sugiere la existencia de un mecanismo compensatorio a una actividad proteasomal comprometida (Fortun *et al.*, 2006). Estudios en CS *in vitro* demuestran que en condiciones de inhibición química del proteasoma y potenciación autofágica (mediante la deprivación de nutrientes), pocas CS forman agregados proteicos y adicionalmente reducen sus sustratos poli-ubiquitinizados (Fortun *et al.*, 2007).

A pesar de que la activación espontánea de la autofagia en las neuropatías con presencia de agregados ha sido observada, esta activación basal no parece cumplir con el requisito de prevenir la formación de los agregados (Fortun *et al.*, 2007) e incluso esta respuesta parece decaer con el envejecimiento (Cuervo *et al.*, 2005). Así, la potenciación de esta vía celular de degradación alternativa, es un punto crítico en el desarrollo de distintas estrategias terapéuticas que apuntan a revertir la situación celular generada por la mutación en PMP22. El desarrollo de agentes farmacológicos que estimulen esta ruta podría proveer aproximaciones terapéuticas para los desórdenes de acumulación de proteínas. En este sentido se ha utilizado la Rapamicina (RM), conocido inhibidor de

mTOR (del inglés mammalian target of rapamycin), para la inducción autofágica en varios tipos celulares incluso CS y ganglios de la raíz dorsal (DRGs). Estos estudios demostraron *in vitro* la capacidad de RM de potenciar la autofagia y reducir la cantidad de sustratos poli-ubiquitinizados, mejorando la capacidad mielínica de las CS C22 y TrJ (Rangaraju *et al.*, 2008).

Finalmente, la realización de estudios *in vivo* que fomenten la activación de la autofagia así como la activación de chaperonas se ha llevado adelante utilizando el paradigma nutricional del Ayuno Intermitente. Estos estudios demostraron que la intervención nutricional permite incrementar la autofagia, suprimir la formación de agregados y estimular la formación de mielina en el modelo TrJ (Madorsky *et al.*, 2009). A pesar de estos beneficios reportados, nuestro grupo no pudo repetir esos resultados (Bresque, 2012). Los ratones sometidos a estos tratamientos no mostraron mejoras a nivel locomotor, ni cambiaron sus perfiles de expresión de PMP22 en nervios ciáticos. Además, el tratamiento nutricional utilizado alterna un día de alimentación con un día de ayuno, lo cual desde nuestra perspectiva dificultaría la aplicación a la terapéutica humana.

Quizás, otros tratamientos menos estresantes para el organismo, tales como una leve Restricción Calórica (RC), podrían generar similares resultados y acercarse a la terapéutica aliviando el déficit patológico. La reducción en el contenido calórico constituye uno de los métodos más ampliamente aceptados para el enlentecimiento de las alteraciones asociadas con la edad, preservando la arquitectura molecular de los axones mielina así como la función de las CS (Rangaraju *et al.*, 2008). Considerando esto, trabajos anteriores realizados por nuestro grupo (Bresque, 2012), se han focalizado en la implementación de RC como tratamiento de estimulación autofágica en el modelo de CMT1E, TrJ.

Anteriormente, hemos realizado un tratamiento de RC durante 26 semanas. Para ello debimos analizar la ganancia de peso de los animales en condiciones *ad libitum* (AL) estableciendo diferencias en la ganancia de peso entre los animales de genotipos salvaje (wt) y TrJ al final del mismo (wt=31,02 ± 0,81g; TrJ=25,22 ± 0,29; p<0,0001). Estas diferencias no se correspondieron con distintas medias de consumo de alimento durante el transcurso del tratamiento. En respuesta al tratamiento de RC, la disminución de la ingesta calórica fue claramente reflejada en la disminución del peso corporal de los ratones de ambos genotipos. Ambos responden a la RC con una etapa de drástica

disminución del peso corporal, período de adaptación, seguida de una de período de estabilidad en el peso, período de mantenimiento. A pesar de ello, antes de alcanzar este umbral, los ratones TrJ mostraron una disminución de peso corporal semana a semana, más marcada que los ratones wt, sugiriendo que el genotipo TrJ muestra mayor susceptibilidad al tratamiento RC que el wt.

A otro nivel, la respuesta obtenida al tratamiento de 5 meses de RC permite afirmar una tendencia a un mejor desempeño locomotor de ratones TrJ. El análisis de la respuesta locomotora se realizó mediante la utilización del Rotarod. Estudios previos indican que modelos transgénicos de CMT1A presentan dificultades severas para la realización de este complejo test de coordinación motora y balance (Sereda *et al.*, 1996; Passage *et al.*, 2004). A pesar de ello, luego del tratamiento, se observaron mejoras locomotoras en los ratones TrJ medidas como un incremento del 30% en el tiempo de permanencia sobre la barra giratoria. Adicionalmente, hemos observado una aparente disminución cualitativa de la cantidad de PMP22 en fibras nerviosas de ratones TrJ y una redistribución de su señal. Junto a estos resultados se detectó también una modulación en las alteraciones en los microfilamentos de actina presentes en la fibra, las cuales deben analizarse con mayor profundidad. Al momento, estos estudios nos han permitido observar una respuesta diferencial al tratamiento de RC que debe continuar evaluándose a diversos niveles para poder inferir beneficios y adversidades del tratamiento a nivel de la fibra nerviosa periférica.

El manejo del modelo durante estos años nos ha brindado la posibilidad de profundizar en el conocimiento de la mielinopatías e identificar características de las mismas no descritas en la literatura (Rosso *et al.*, 2010; Kun *et al.*, 2012 a y 2012b; Rosso *et al.*, 2012). A pesar de modelar a un grupo reducido de pacientes, los estudios en este modelo, han revelado hallazgos críticos concernientes a la naturaleza de la disfunción generada por alteraciones en el gen de PMP22. Conocer los alcances y limitaciones del modelo nos permite identificar sus bondades para el estudio de procesos fisiológicos específicos. En este sentido, creemos que el modelo es muy adecuado para abordar la temática de la formación de agregados proteicos y las consecuencias celulares que estas inclusiones provocan tanto para pacientes CMT1E, así como para otras patologías en cuyo desarrollo la formación de agregados proteicos juegue un rol preponderante. Esta temática será abordada en la siguiente tesis.

3. Hipótesis, Objetivo General y Objetivos específicos:

3.1 Hipótesis:

CMT1E presenta un fenotipo patológico generado parcialmente por la presencia de agregados de PMP22 cuyas manifestaciones afectan la fibra nerviosa en su conjunto. La potenciación de las rutas autofágica-lisosomal (mediante RC), podría contribuir a la degradación de los agregados de PMP22 y a una subsecuente remodelación de la citoarquitectura de la fibra nerviosa.

Para demostrar esta hipótesis nos planteamos el siguiente objetivo general:

3.2 Objetivo general:

Contribuir a la caracterización de las fibras nerviosas mielínicas periféricas en condiciones normales y de neurodegeneración crónica, analizando la presencia de PMP22 en agregosomas en la célula de Schwann y su implicancia metabólica y estructural sobre la citoarquitectura de la fibra y la estructura de la mielina. Asimismo, pretendemos caracterizar la respuesta de degradación de los agregosomas frente a la potenciación de la autofagia por RC.

3.3 Objetivos específicos

Para cumplir con el objetivo general se proponen las siguientes metas:

- 1) Evaluar la expresión de la proteína PMP22 en agregosomas perinucleares asociados al citoesqueleto de Vimentina y PMP22 total, en CS de fibras nerviosas periféricas wt y TrJ alimentados *ad libitum* (AL).
- 2) Evaluar cambios metabólicos en CS de fibras nerviosas de ratones wt y TrJ alimentados AL, consecuencia de la presencia de agregados, focalizándonos en la activación de las vías autofágica-lisosomal.
- 3) Evaluar el tratamiento de RC analizando las fibras nerviosas periféricas de ratones wt y TrJ, sometidos a este tratamiento, con los parámetros analizados en los objetivos 2 y 3

- 4) Estudiar la cantidad, morfología y tamaños de núcleos de las CS en las fibras nerviosas periféricas de ratones wt y TrJ alimentados AL y bajo RC.
- 5) Estudiar la citoarquitectura en las fibras nerviosas periféricas de ratones wt y TrJ, alimentados AL y sometidos a RC.
- 6) Analizar la morfología y estructura de la mielina en las fibras mielínicas wt y TrJ de animales alimentados AL. En comparación con estos, se estudiaron los cambios en la mielina en respuesta al tratamiento de RC.
- 7) Analizar cualitativamente la ultraestructura de la fibra nerviosa TrJ y wt AL y bajo RC.

4. Materiales y Métodos

4.1 Estrategia experimental.

Nuestra estrategia experimental consistió en el diseño y ejecución de un tratamiento de restricción energética durante 26 semanas en una población de ratones wt y portadores de la neuropatía periférica CMT1E (TrJ). Posterior a este tratamiento se evaluaron los efectos del mismo en nervios ciáticos, a nivel molecular y celular, atendiendo sus consecuencias en las CS, axón y en la fibra nerviosa periférica. Se estudiaron en estos el metabolismo de los agregados (formación y degradación), la citoarquitectura glial y axonal de la fibra nerviosa y la estructura de la mielina. Los análisis se realizaron utilizando abordajes moleculares (microscopía confocal cualitativa y cuantitativa), morfométricos (microscopía óptica, luz transmitida) y ultraestructurales (microscopía electrónica). El esquema de la figura 4.1 explica cómo se realizó la evaluación del tratamiento.

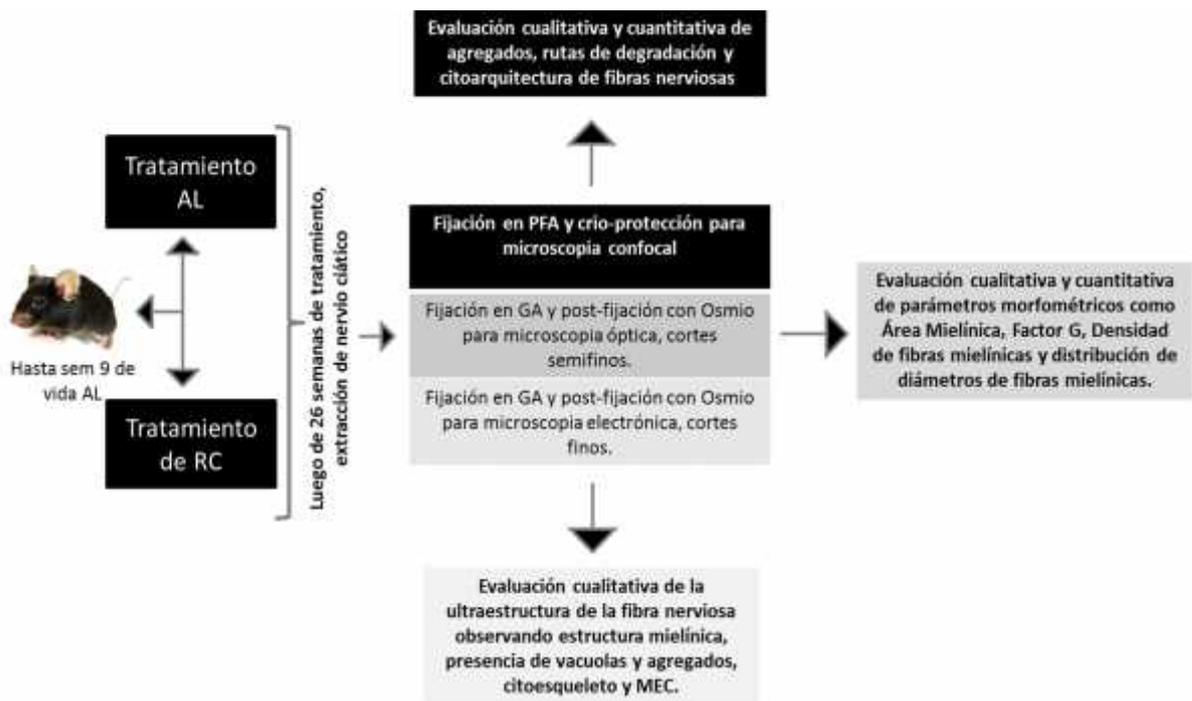


Figura 4.1. Diseño experimental. Luego de 26 semanas de tratamiento fueron extraídos los nervios ciáticos de ratones wt y TrJ en condiciones AL y RC para su procesamiento y posterior evaluación. Se utilizaron 3 abordajes especificados en el esquema.

4.2 Cuidado y mantenimiento de los animales.

Para la realización de esta tesis se utilizaron ratones de la colonia Trembler J (B6.D2-Pmp22<Tr-J>/J) (Jackson Lab., USA) de genotipo salvaje wt y heterocigota TrJ para la mutación puntual del gen que codifica para PMP22. Todos los ratones de la colonia fueron identificados mediante numeración y genotipado siguiendo los criterios establecidos en Rosso et al., 2010. El mantenimiento de la colonia así como la eutanasia de los ratones fue realizado en estricto acuerdo con las normas del Comité de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) bajo las regulaciones establecidas en la ley nacional de experimentación animal N°18611.

4.3 Grupos Experimentales.

Los ratones se mantuvieron hasta su novena semana de vida en condiciones de alimentación AL (Madorsky *et al.*, 2009). A partir de esta fecha, fueron asignados a uno de dos grupos experimentales con diferentes tratamientos nutricionales: un grupo con acceso AL al alimento y otro bajo condiciones de RC. Ambos tratamientos fueron aplicados durante 26 semanas en ratones machos wt y TrJ (n=4 para cada genotipo y tratamiento). En el transcurso del tratamiento AL se determinó la media de consumo diario de alimento para cada genotipo y luego, considerando esta media de consumo, se aplicó un porcentaje de reducción sobre ella para administrar el alimento en RC. El tratamiento RC consistió en alimentar a los ratones diariamente, con una cantidad porcentualmente menor de la media de consumo diario de ración en condiciones AL. Así mismo, el porcentaje de reducción fue incrementado paulatinamente con el tiempo de tratamiento. Se aplicó un 5% de restricción en las 4 primeras semanas, seguido por disminuciones del 5% cada 2 semanas hasta alcanzar el 20% de restricción. Luego de alcanzado este porcentaje de reducción algunos ratones volvieron a estados de restricción menores de forma de evitar caídas drásticas del peso corporal y desnutriciones. El esquema de la figura 4.3 muestra como ocurrió el avance del tratamiento para ratones de ambos genotipos.

Los ratones se pesaron una vez por semana obteniéndose registros de peso corporal para cada genotipo en cada tratamiento. Estos resultados constituyeron parte de los resultados

obtenidos en mi tesis de grado, donde podrán encontrar más información y análisis de los mismos.

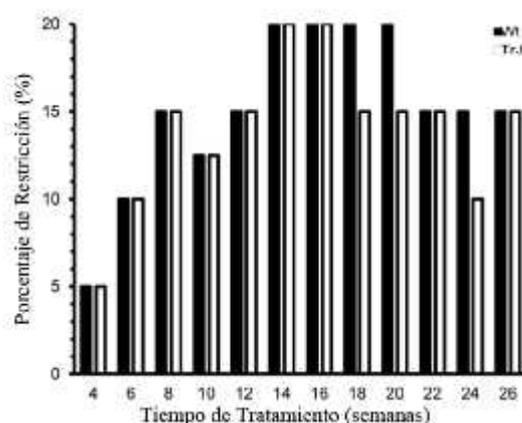


Figura 4.3. Desarrollo temporal de la RC. El grafico esquematiza cómo se desarrolló el avance del tratamiento de RC en ambos genotipos y durante 26 semanas.

4.4 Extracción y obtención de nervios ciáticos.

Una vez finalizados los tratamientos los ratones fueron sacrificados por medio de dislocación cervical y se procedió a la extracción de ambos nervios ciáticos. Para ello se ubicó al ratón en posición decúbito ventral y se le practicó una sección a nivel de la parte inferior de la región glútea y femoral posterior, realizando posteriormente una incisión longitudinal paralela al eje del fémur, en la aponeurosis que separa los músculos abductor mayor y el biceps crural. Se abre una cavidad entre ambas masas musculares, en el fondo de la que se encuentran el nervio ciático que se observa como una cinta de aproximadamente 1mm de grosor de color blanco brillante. Una vez identificado se secciona primero el extremo más distal y luego el más proximal a la columna vertebral procurando incluir la mayor cantidad del nervio.

4.5 Fijación y preparación de nervios ciáticos. Los nervios ciáticos extraídos destinados a criosecciones fueron fijados por inmersión en paraformaldehído al 3% en PHEM (2mM Hepes, 60mM Pipes, 10mM EGTA, 2mM MgCl₂, pH 7,4) durante 16 hs a 4°C. Luego de 6 sucesivos lavados, las muestras se incubaron en sacarosa 30% en PHEM a 4°C hasta que el tejido igualó la densidad del medio. Posteriormente, el tejido se incluyó

en medio de inclusión y se realizaron criosecciones de 12µm de espesor en criostato (SLEE medical®). Las criosecciones se mantuvieron a -20°C. Los nervios ciáticos destinados al procesamiento para análisis morfológicos y ultraestructurales fueron fijados por inmersión en glutaraldehído 2,5% en PHEM durante 1 h. Luego se realizó una post-fijación y tinción en Osmio 1% en PHEM durante 16 hs a 4°C. Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas sucesivamente en concentraciones crecientes de etanol hasta llegar al 100%. Finalmente, las muestras fueron incluidas en concentraciones crecientes de resina epóxica (Fluka Chemika) hasta alcanzar el 100%. Los bloques se dejaron polimerizando durante 24 hs a 45°C seguido de otras 24 hs a 60°C. Las secciones de los bloques se realizaron en ultramicrotomo (Power Tome XL), obteniéndose secciones transversales semi-finas (1 µm) para microscopía óptica y finas (70 nm) para microscopía electrónica.

4.6 Inmunohistoquímica.

Para el análisis de las criosecciones se utilizaron técnicas de inmunotinción indirecta y/o marcado con sondas fluorescentes. En todos los casos se utilizaron anticuerpos monoclonales y policlonales comerciales que se detallan en la Tabla I. Además se utilizó un anticuerpo anti-ribosomas producido y caracterizado en nuestro laboratorio (Kun *et al.*, 2007). Para visualizar la marcación del anticuerpo primario se utilizaron anti-anticuerpos comerciales conjugados a fluoró cromos en distintas longitudes de onda (detallados en la Tabla I). Procediendo con la realización de la inmunohistoquímica, las criosecciones fueron permeabilizadas con Triton X-100 al 0,1% en PHEM durante 10 minutos a Temperatura Ambiente (TA), previo al bloqueo de los grupos aldehídos y cetonas libres con borohidruro de sodio al 0,1% en agua durante 20 minutos a TA. Luego se bloquearon las uniones inespecíficas con suero normal de cabra al 5% en buffer de incubación (BI)(Glicina 150mM, BSA 1%, en PHEM) durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, los cortes fueron incubados 16 hs a 4°C con anticuerpos específicos. El exceso del anticuerpo primario se lavó con BI seguido de una incubación durante 45 minutos a 37°C con anticuerpos secundarios y/o sondas fluorescentes. El exceso de anticuerpos secundarios fue removido para finalmente, luego de sucesivos lavados, realizar el montaje con medio de montaje ProLong Antifade (Invitrogen). Se realizaron incubaciones con anticuerpo secundario en ausencia de anticuerpo primario como control de señal inespecífica.

Tabla I. Anticuerpos específicos, anti-anticuerpos y sondas utilizadas. Se indica además procedencia y concentración de trabajo.

Anticuerpos específicos, anti-anticuerpos y sondas fluorescentes	Procedencia y Marca	Concentración de trabajo
PMP22	Rabbit ab61220, Abcam	1:500
PMP22	Rabbit ab15506, Abcam	1:500
LAMP1	Rabbit ab24170, Abcam	1:200
LC3	Rabbit ab64781, Abcam	1:100
-Tubulina	Rabbit ab6046, Abcam	1:200
MAG	Mouse ab89780, Abcam	1:100
Vimentina	Mouse ab8978, Abcam	1.100
Tubulina Acetilada	T7451, Sigma	1:1000
Neurofilamento 68	Chicken ab72997, Abcam	1:500
Faloidina 543	A22283, Invitrogen	1:150
Faloidina 633	A22284, Invitrogen	1:150
Dapi	D1306, Invitrogen	1:1000
Goat anti-Mouse Alexa 488	A11029, Invitrogen	1:1000
Goat anti Rabbit Alexa 546	A11035, Invitrogen	1:1000
Goat anti Rabbit Alexa 633	A10523, Invitrogen	1:1000
Goat anti Chicken 633	ab72997, Abcam	1:500

4.7 Microscopía

4.7.1 Microscopía Óptica Confocal y cuantificación.

Las criosecciones de nervio ciático inmunomarcadas fueron visualizadas y registradas en el microscopio confocal FV300 y Microscopio Leica TCS SP5 II. Las condiciones de confocalidad y ajuste de parámetros (fotomultiplicador-PMT-, intensidad de laser, profundidad de imagen, etc) utilizadas fueron las mismas para los registros de cada anticuerpo para todas las condiciones (genotipo y tratamiento). La adquisición de las imágenes se realizó en una misma sesión confocal para evitar el decaimiento de la señal.

Las cuantificaciones de las intensidades de las señales para cada anticuerpo se realizaron utilizando el software Image J. El esquema presentado en la figura 4.7.1 A explica cómo se procedió para la toma de fotografías y análisis de las mismas.

4.7.2 Microscopía Óptica convencional y cuantificación.

Los cortes semi-finos de nervio ciático, previamente incluidos en resinas epóxicas, fueron teñidos con Azul de Toluidina y visualizados por luz transmitida en el microscopio confocal FV300. Las imágenes obtenidas se procesaron utilizando el software Image J. El esquema de la figura 4.7.1 A explica cómo se procedió para la toma de fotografías y análisis de las mismas.

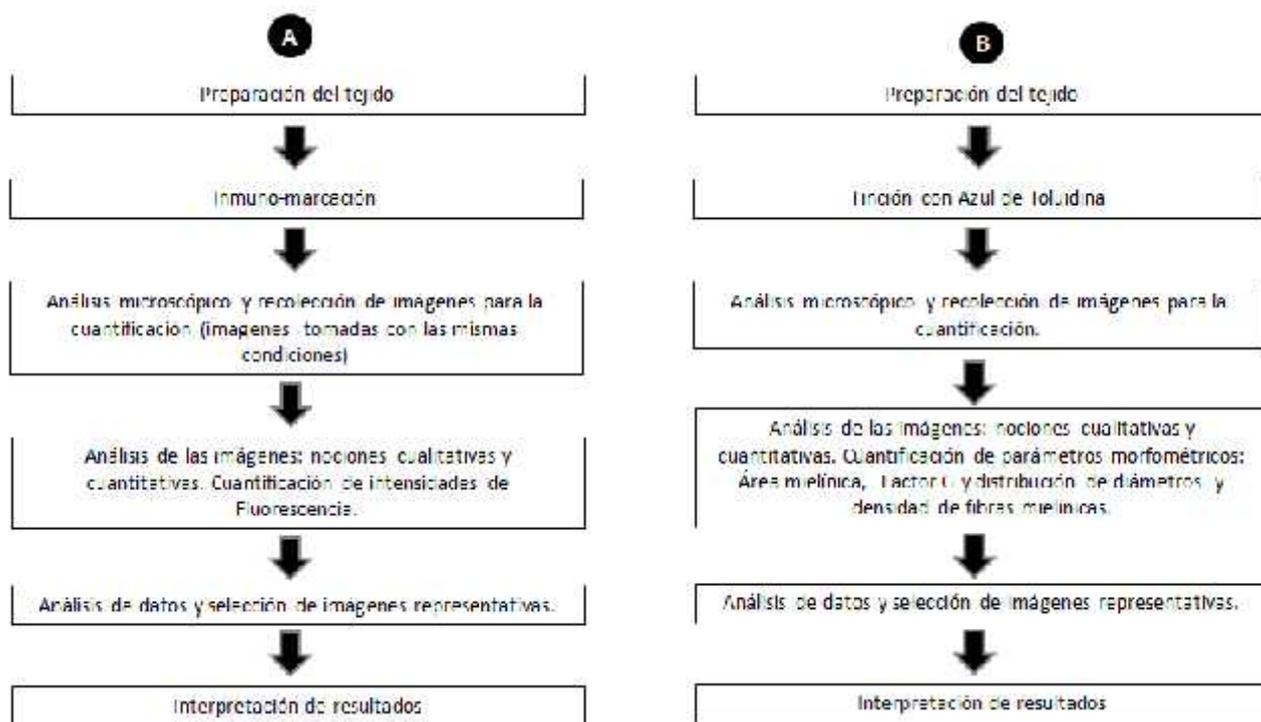


Figura 4.7.1. Diagrama explicativo que indica cómo se procedió para la toma de datos y análisis de imágenes.

4.7.3 Microscopía Electrónica.

Los cortes finos de nervio ciático (70nm) fueron contrastados con Acetato de Uranilo al 8,5% en alcohol al 50%. Se incubaron a 37°C durante 30 minutos para posteriormente realizar lavados sucesivos en alcohol 50% y agua. Las imágenes fueron tomadas en el Microscopio Electrónico Jeol 100CX II del IIBCE.

4.8 Análisis Estadísticos.

Los datos fueron analizados mayormente utilizando el test ANOVA de dos vías y para la realización de comparaciones específicas se utilizó el Test post hoc Scheffe. Se consideraron diferencias significativas a partir de p-valores menores a 0.05. Se utilizó el programa STATISTICA para realizar las comparaciones.

4.9. Detalle metodológico para objetivos específicos:

4.9.1 Para cumplir con la identificación de las formas de PMP22 agregada correspondientes al **objetivo específico 1**, fue necesaria la utilización de un agente desenmascarante (en nuestro caso, ácido fórmico, AF). La utilización de este último permitió la visualización de estructuras resistentes a su acción, tal como sucede con los agregados proteicos. Este protocolo fue adaptado del protocolo de desenmascaramiento utilizado por Kitamoto y cols, 1987. El protocolo de desenmascaramiento (incubación con AF al 70%) fue optimizado mediante la realización de una cinética de acción que incluyó incubaciones de 5, 10 y 15 segundos con AF 70% sobre las criosecciones. Posteriormente, se procedió con la inmunomarcación indirecta con PMP22. Se utilizó un control sin ácido fórmico, así como un marcador de citoesqueleto que permitió contrastar los efectos del tratamiento desenmascarante. Finalmente se seleccionó el tiempo de exposición que mejor se ajustó al balance entre desenmascaramiento/destrucción del tejido.

El análisis de la intensidad de señal del anticuerpo PMP22 luego de la acción del AF se realizó seleccionando regiones de interés (ROIs) en dominios perinucleares de las CS. Se seleccionaron al menos 80 ROIs por condición, en las cuales se cuantificó la densidad de fluorescencia del marcador PMP22 en las regiones donde la señal persistía luego del tratamiento con AF (Fig. 4.9.1 A).

Esta metodología fue posteriormente comparada con la cuantificación de la señal de otro anticuerpo contra PMP22 sin previo desenmascaramiento, la cual fue cuantificada seleccionando ROIs en regiones internodales de la fibra nerviosa (excluyendo nodos, ISL y núcleos). El largo de estos se mantuvo constante mientras el ancho coincidía con el ancho de la fibra nerviosa analizada. Una vez tomados los datos, estos se normalizaban en función del ancho de cada fibra, considerando como 100% el ancho total y asignando a cada valor un porcentaje con respecto al inicio. Esta normalización y la marcación con algunos anticuerpos específicos de dominios axonales y gliales nos permitió determinar

qué porcentajes se correspondían con qué regiones de la fibra nerviosa y así evaluar y comparar la intensidad de fluorescencia de diferentes marcadores en regiones gliales y axonales (Fig. 4.9.1 B).

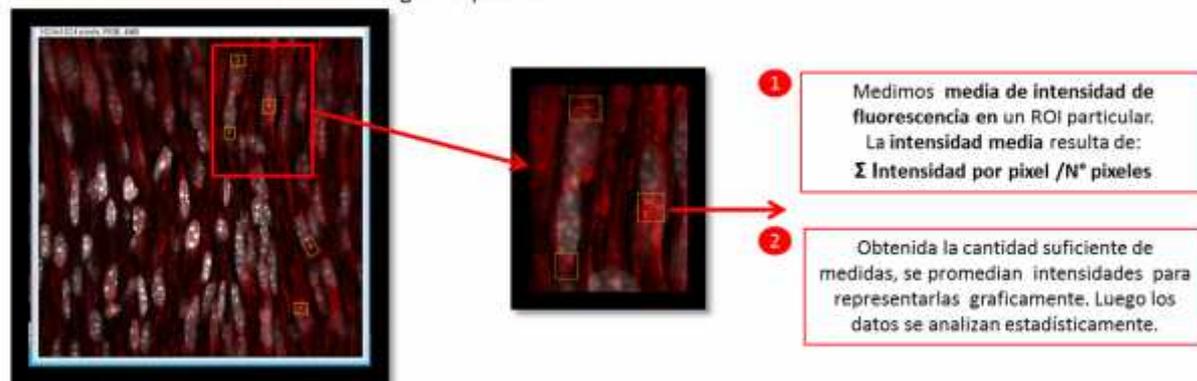
La implementación de ambas técnicas de marcaje de PMP22 permitió la evaluación de los agregados resistentes a la acción del AF, así como la distribución de la señal y su intensidad a lo largo de los distintos dominios presentes en la fibra nerviosa periférica.

Complementando los resultados obtenidos luego del tratamiento con AF también se procedió a la cuantificación de la señal del marcador de Vimentina (método Fig. 4.9.1 B) el cual se encuentra rodeando los agregados de PMP22 (Johnston *et al.*, 1998; Notterpek *et al.*, 1999).

4.9.2 Para cumplir con la evaluación de los cambios metabólicos en CS de fibras nerviosas wt y TrJ planteados en el **objetivo específico 2**, se analizó la activación de las vías de autofagia y degradación lisosomal mediante la realización de inmunomarcaciones indirectas contra los marcadores específicos LC3 y Ribosomas (autofagia) y LAMP1 (lisosoma). El análisis de la señal de los marcadores se realizó en regiones perinucleares siguiendo la metodología explicada en Fig. 4.9.1 A.

4.9.3 Para cumplir con la evaluación de los objetivos 1 y 2 en fibras nerviosas wt y TrJ bajo RC, es decir **objetivo específico 3**, se realizó la inmunomarcación para PMP22 con el tiempo determinado en el objetivo 1 y PMP22 sin desenmascaramiento previo. También se analizó la marcación de Vimentina en las mismas regiones. A su vez se utilizaron los marcadores específicos LC3, Ribosomas y LAMP1. Las imágenes se analizaron y cuantificaron en regiones perinucleares siguiendo la metodología explicada en Fig. 4.9.1 A.

A. Método de cuantificación en una región específica:



B. Método de cuantificación de diferentes regiones de la fibra nerviosa periférica:

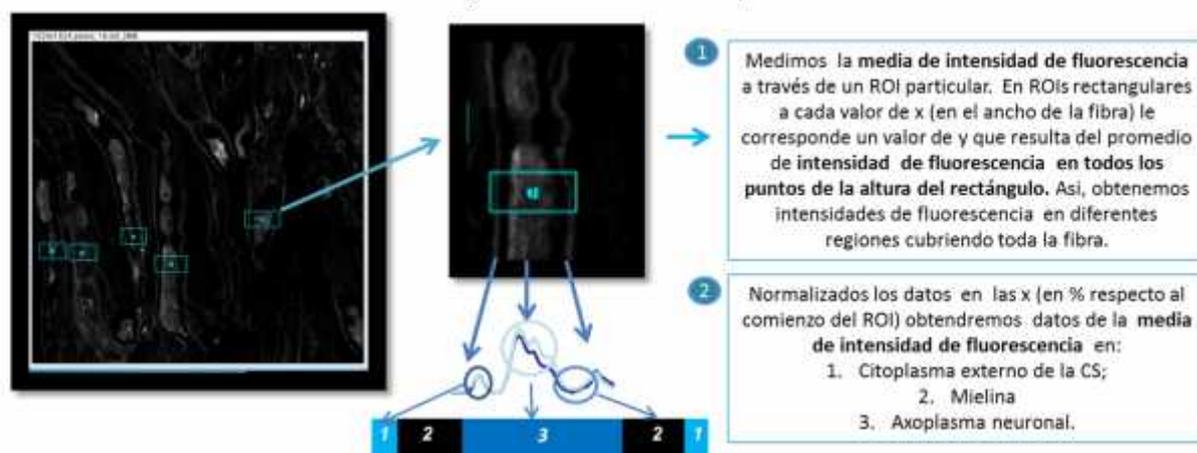


Figura 4.9.1. Métodos de cuantificación de la intensidad de fluorescencia utilizados para comparar las señales de fluorescencia de los distintos marcadores. En **A** se muestra el método de cuantificación elegido para una región específica y en **B** se muestra otro método que permite cuantificar diferentes regiones en la fibra nerviosa.

4.9.4 Para el estudio de la cantidad de núcleos, tamaño y estructura, **objetivo específico 4**, se evaluaron los núcleos de varias fibras nerviosas para cada condición experimental mediante la marcación de los mismos con Dapi. Posteriormente se realizó la cuantificación analizando los núcleos que se ubicaban alrededor de fibras nerviosas. El procesamiento de las imágenes para la obtención de los datos consistió en generar una imagen binaria, la cual permitió la selección automática de los núcleos para posteriormente determinar su cantidad, cuantificar su área y perímetro. Se utilizó un filtro que permitió la exclusión de núcleos menores a $15 \mu\text{m}^2$ y mayores que $120 \mu\text{m}^2$. Aquellos núcleos que aparecían superpuestos no fueron cuantificados. Respecto de la cuantificación de núcleos se realizó relacionando éstos con la cantidad de fibras nerviosas presente en cada imagen.

4.9.5 Para cumplir con la determinación de la citoarquitectura glial y axonal, **objetivo específico 5**, se evaluó la estructura de los componentes del citoesqueleto mediante inmunomarcación indirecta con anticuerpos específicos para los marcadores de citoesqueleto: Tubulina (α -tubulina y Tubulina Acetilada), Actina (Falloidina) y filamentos intermedios (Neurofilamentos livianos) en ambos genotipos y tratamientos. Posteriormente se realizó la cuantificación analizando los distintos dominios de la fibra nerviosa periférica tal como se explica en la Fig. 4.9.1 B. Respecto de los microtúbulos se utilizó la relación Tub. Acetilada/BetaTubulina de forma de medir la cantidad de tubulina estabilizada. La marcación con falloidina nos permitió también observar y cuantificar los microfilamentos polimerizados excluyendo la actina monomérica.

4.9.6 Para cumplir con el **objetivo específico 6** que incluyó la evaluación de las diferencias en la mielina de nervios ciáticos de ratones wt y TrJ en condiciones AL y en respuesta a RC, se analizaron parámetros morfométricos. Estos incluyeron: grosor mielínico o área mielínica, distribución de diámetros de fibras mielínicas en nervio ciático, factor g y densidad de fibras mielínicas.

En la figura 4.9.5 A se muestra como se cuantificaron el área mielínica y factor g . Para tomar estas medidas fue necesario procesar las imágenes en Image J previo a la cuantificación. El procesamiento incluyó la transformación de la imagen a 16 bit y el ajuste del umbral para obtener una imagen binaria. Esto permitió la selección de ROIs de manera semi-automática (Romero *et al.*, 2000). Una vez seleccionados éstos y tomadas las medidas, las mismas fueron contrastadas con la imagen original de forma de descartar posibles artefactos. Los histogramas de frecuencia de los diámetros fueron realizados tomando los valores de diámetros de los registros del área y asumiendo circularidad en las fibras. El grosor mielínico o área mielínica se determinó restando el área del axón al área total de la fibra. El factor g se determinó usando la siguiente fórmula: $\text{diámetro del axón} / (\text{diámetro axón} + \text{mielína})$ y tomando el diámetro mayor en ambos casos como criterio. Para la obtención de la distribución de diámetros, área mielínica y factor g se tomaron alrededor de 600 medidas por condición.

La cuantificación de la densidad de fibras mielínicas se realizó utilizando el método de las 3 ventanas en las imágenes sin procesar siguiendo lo establecido en la tesis de Rosso, 2008 (Fig. 4.9.5b). Tres ventanas de $100\mu\text{m}^2$ fueron utilizadas por imagen y dentro de ellas se cuantificaron las fibras.

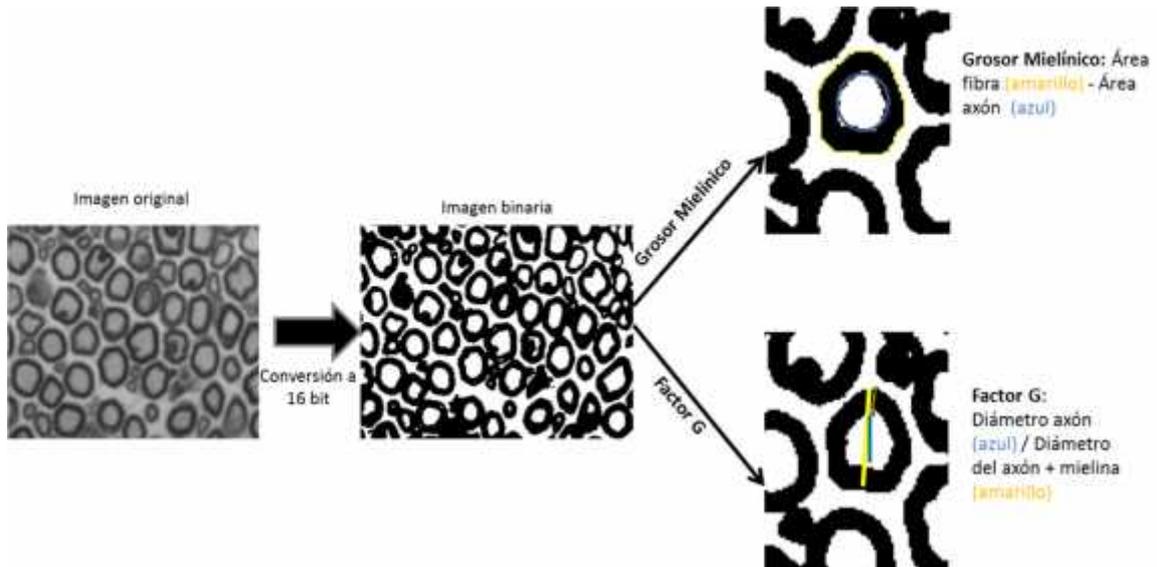


Figura 4.9.6a. Esquema explicativo de cómo se procesaron las imágenes para la cuantificación del Área Mielínica y factor *g*.

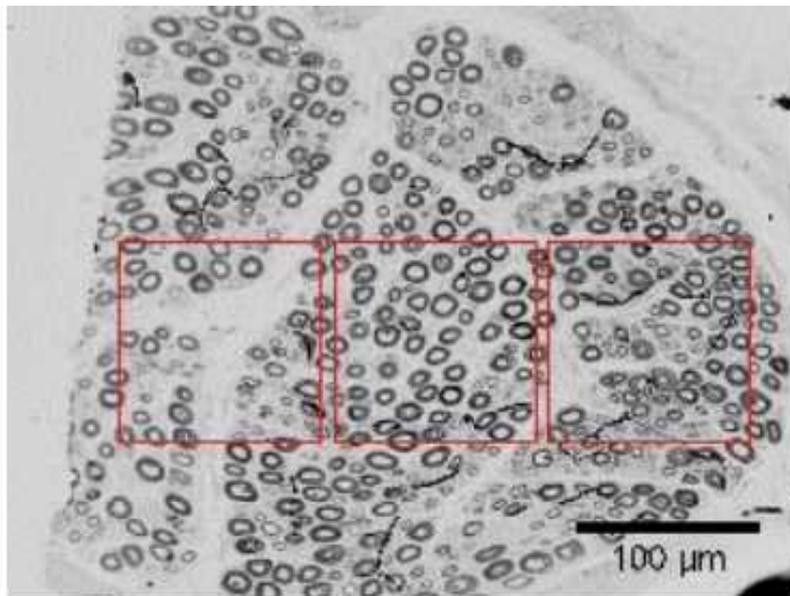


Figura 4.9.6b. Esquema explicativo del método de cuantificación de 3 ventanas. Imagen tomada de la Tesis de Rosso, 2008.

4.9.7 Para la evaluación de la ultraestructura de la fibra nerviosa TrJ y wt mediante microscopía electrónica, **objetivo específico 7**, se analizó la misma cualitativamente explorando la presencia y organización de agregosomas alrededor de los núcleos, vacuolas autofágicas y la estructura de la mielina en ambos genotipos en condiciones AL y RC.

5. Resultados

5.1 Evaluar la expresión de la proteína PMP22 en agregosomas perinucleares asociados al citoesqueleto de vimentina y PMP22 total, en CS de fibras nerviosas periféricas wt y TrJ alimentados AL.

La expresión de PMP22, fue analizada en dos condiciones: a) PMP22 formando agregados resistentes al AF y b) PMP22 total.

a) Para determinar las condiciones del tratamiento con AF, se trabajó con iguales concentraciones de ácido, poniéndose a punto los tiempos de desenmascaramiento para lograr visualizar las formas perinucleares agregadas de PMP22. Tal como se detalló en la sección anterior se utilizaron tiempos de 5, 10 y 15 segundos, los resultados se muestran en la figura 5.1.1.

Las imágenes con el tratamiento durante 5 segundos comienzan a mostrar algunas señales discretas alrededor de los núcleos (Fig. 5.1.1 A). Al analizar la relación dominio perinuclear/fibra (P/F) no se hallaron diferencias significativas entre ambos grupos genotípicos (Fig. 5.1.1 B). A los 10 segundos se observa una clara marcación alrededor de los núcleos en ambos genotipos, sin embargo la marcación para las fibras TrJ es mayor (wt: $10,5 \pm 0,8$; TrJ: $20,82 \pm 1,4$). Al cuantificar la relación se observó un significativo incremento en las fibras TrJ, el cual se debe principalmente al incremento de la intensidad de señal alrededor de los núcleos (Fig. 5.1.1 C). Finalmente a los 15 segundos se observa una clara marcación de los agregados en ambos genotipos, las fibras TrJ presentan un incremento de la señal perinuclear y un aumento de la señal en toda la fibra, en tanto en wt el incremento es exclusivamente en la región perinuclear. Como consecuencia, el tratamiento de 15 segundos de AF muestra la disminución de la relación P/F TrJ sobre la P/F wt (Fig. 5.1.1 D). En base a estos resultados se creyó conveniente para evaluar los agregosomas perinucleares, trabajar con tiempos de desenmascaramiento con AF de 10 segundos.

Otro parámetro evaluado fue la relación entre la cantidad de núcleos que presentaban marcación de PMP22 luego del desenmascaramiento sobre cantidad de núcleos totales (Tabla IIA). No se hallaron diferencias entre ambos genotipos en condiciones AL, pero sí cierta tendencia de incremento en el genotipo TrJ.

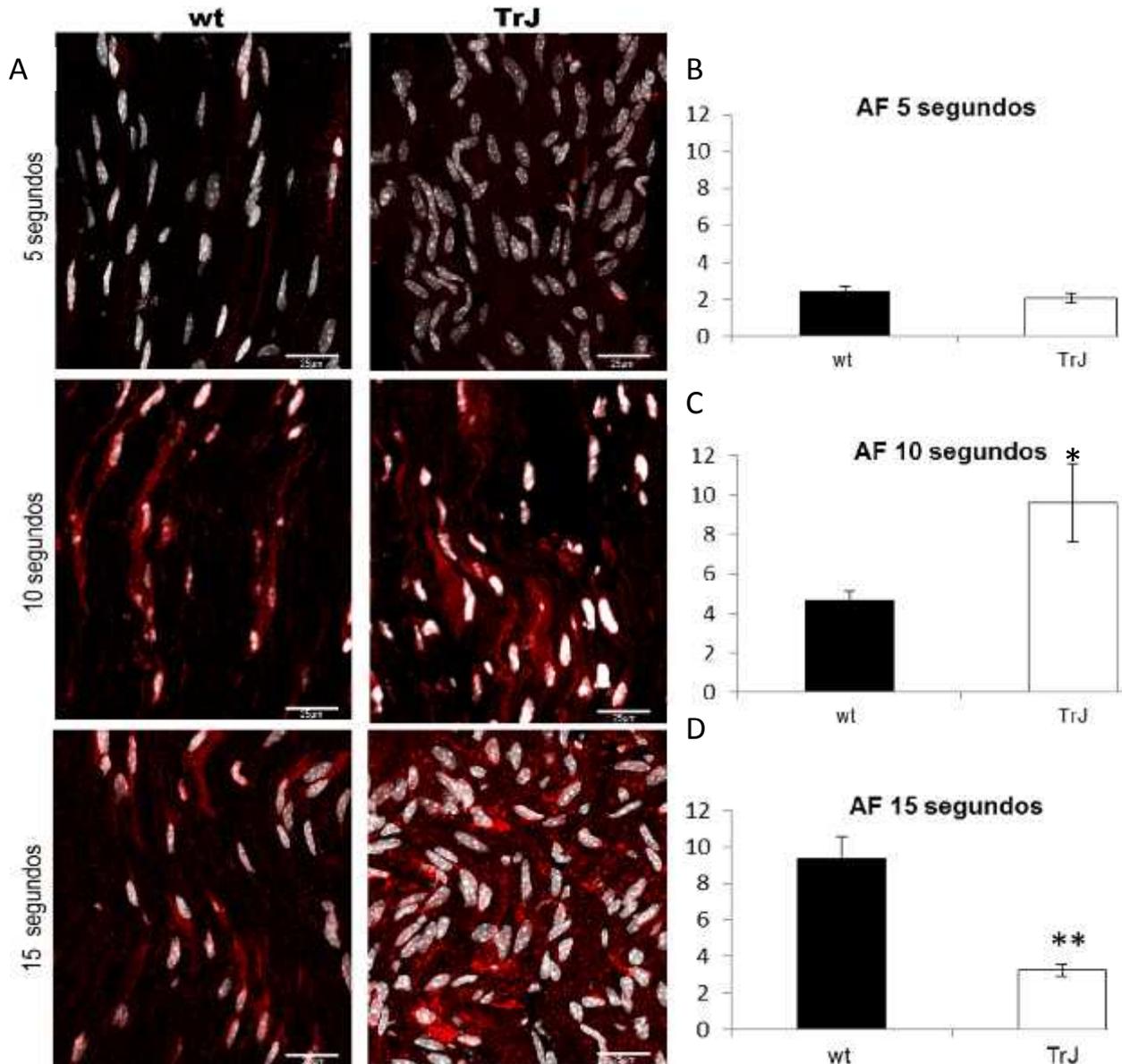
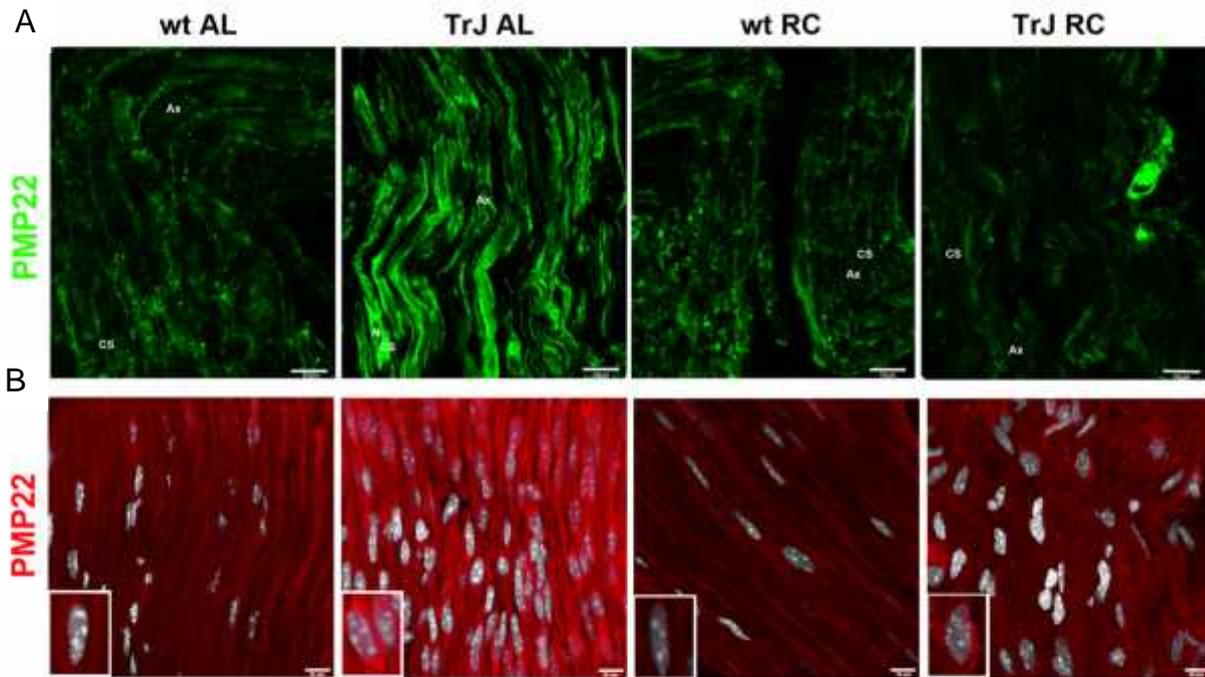


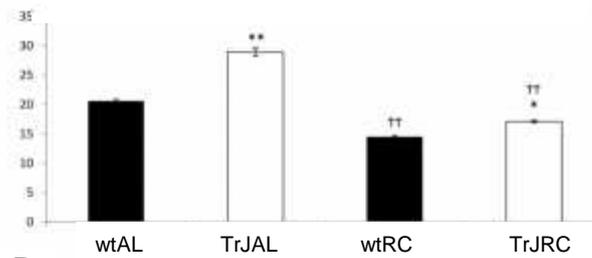
Figura 5.1.1 Cinética de desenmascaramiento de agregados de PMP22 con AF. **A:** Las imágenes se corresponden a proyecciones máximas de criosecciones de nervio ciático inmunomarcadas para PMP22 (rojo) y Dapi (blanco) wt y TrJ tratadas previamente durante 5, 10 y 15 segundos con AF. **B, C y D:** Los gráficos representan las medias de la relación P/F de intensidad de fluorescencia de PMP22 para ambos genotipos. Los asteriscos indican diferencias de * $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$ entre genotipos dentro de cada tratamiento.

Los agregosomas perinucleares en las CS se han descrito como un sello intracelular del metabolismo patológico de CMT1E. En este sentido, el tratamiento con AF permitió cuantificar las estructuras resistentes que se unían al anticuerpo contra PMP22 y que nosotros consideramos agregados. El análisis de la señal muestra que su ubicación se corresponde mayoritariamente con regiones perinucleares. Comparando la señal entre ambos genotipos AL, es evidente una mayor intensidad alrededor de núcleos TrJ respecto a los wt (Fig 5.1.2 B). Estos resultados se confirman mediante la cuantificación de la señal, donde la intensidad TrJ se encuentra incrementada en un 50% con respecto a la wt (wtAL: $16,24 \pm 1,05$ UA vs TrJAL: $25,74 \pm 1,33$ UA; $p < 0.001$) (Fig 5.1.2 D).

b) La evaluación de la intensidad de señal de PMP22 total (sin desenmascaramiento con AF) nos permitió visualizar la distribución de la proteína en los diferentes dominios de la fibra nerviosa. Si bien su señal no es exclusiva de dominio gliales, nos acotaremos a analizar esta región de la fibra. La ubicación celular de la proteína una vez sintetizada y plegada, corresponde a regiones mielínicas, donde cumple su rol estructural, sin embargo, no se observa señal del anticuerpo en estas regiones. La distribución de la señal a nivel de dominios gliales, se localiza principalmente en el citoplasma externo de la CS. Se observa además, una acumulación de la señal alrededor de los núcleos en las CS de fibras nerviosas TrJ (Fig 5.1.2 A). Tal como se observa en las imágenes de la Fig. 5.1.2 y confirman las cuantificaciones, la intensidad de PMP22 en dominios gliales es significativamente mayor en CS de ciáticos TrJ (wtAL: $20,62 \pm 0,29$ UA vs TrJAL: $28,96 \pm 0,72$ UA; $p < 0.001$), con un incremento aproximado del 30% (Fig 5.1.2 C).



C Media de intensidad de PMP22 en dominios gliales



D Media de intensidad de PMP22 desenmascarada en dominios perinucleares

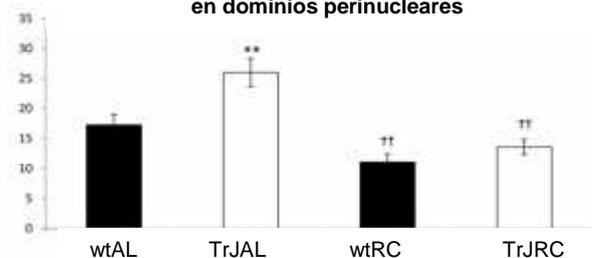


Figura 5.1.2 Distribución e intensidad de PMP22 y de agregados de PMP22 en la CS. **A:** El panel superior muestra proyecciones máximas de imágenes de criosecciones de nervio ciático inmunomarcadas para PMP22 (verde) wt y TrJ en condiciones AL y RC. Ax indica dominios axonales, CS dominios gliales y N indica núcleos. **B:** En el panel inferior se muestran criosecciones previamente desenmascaradas con AF wt y TrJ en condiciones AL y RC, donde se observa principalmente señal del anticuerpo PMP22 (rojo) alrededor de los núcleos. En el panel inferior izquierdo de cada foto se seleccionaron núcleos representativos de cada condición. **C:** El gráfico representa la media de intensidad de fluorescencia de PMP22 en dominios gliales para ambos genotipos AL y bajo RC. **D:** El gráfico representa la media de intensidad de fluorescencia de PMP22 desenmascarada en dominios perinucleares AL y bajo RC. Los asteriscos indican diferencias de * $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$ entre genotipos dentro de un tratamiento y las cruces † $p < 0,05$ y †† $p < 0,001$ entre tratamientos dentro de un mismo genotipo.

En acuerdo con los resultados obtenidos mediante el desenmascaramiento de las crio secciones y marcación con PMP22, también se evaluó la señal de Vimentina en los dominios perinucleares. Tal como se observa en las imágenes de la Fig.5.1.3 A, ambos genotipos presentan cierta colocación de las señales de PMP22 y Vimentina. Esta colocación es mayor en los individuos TrJ. Complementando las imágenes, la cuantificación permitió observar niveles de fluorescencia de Vimentina 6 veces mayores alrededor de los núcleos TrJ en comparación con los wt (wtAL: $4,21 \pm 0,65$ UA vs TrJAL: $26,27 \pm 1,25$ UA; $p < 0,001$) (Fig 5.1.3 B). Debido a que la cuantificación de la señal se realizó con un desenmascaramiento previo de AF, la señal persistente se encuentra asociada a la región periférica de los agregados.

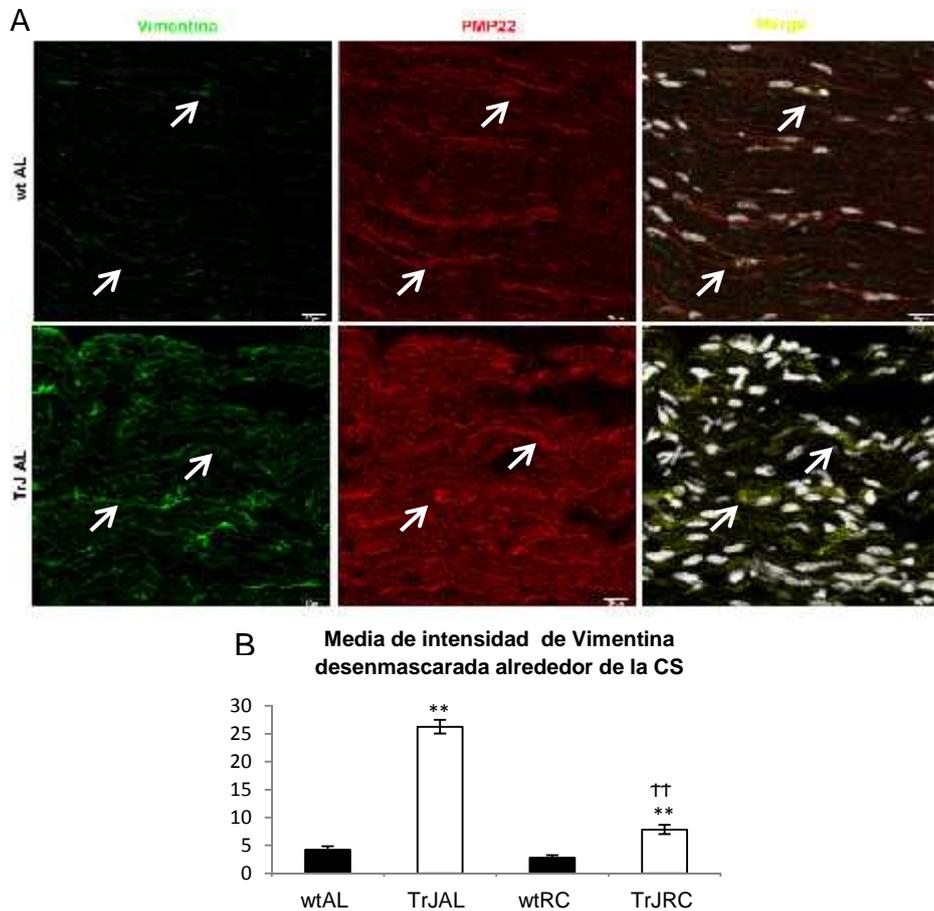


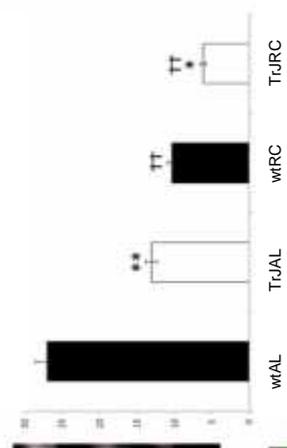
Figura 5.1.3. Vimentina y PMP22 desenmascaradas. **A:** El panel superior muestra proyecciones máximas de imágenes de crio secciones desenmascaradas con AF de nervio ciático inmunomarcadas para Vimentina (verde), PMP22 (rojo) y la superposición de ambas imágenes (amarillo) para los genotipos wt (arriba) y TrJ (abajo) en condiciones AL. La tinción con Dapi (blanco) indica los núcleos. Las flechas indican regiones alrededor de los núcleos donde hay colocación de ambas señales. **B:** El gráfico representa la media de intensidad de fluorescencia de Vimentina en dominios perinucleares para ambos genotipos AL y bajo RC. Los dobles asteriscos indican diferencias $** p < 0,001$ entre genotipos dentro de un mismo tratamiento y las cruces indican diferencias $\dagger\dagger p < 0,001$ entre los tratamientos para el mismo genotipo.

5.2 Evaluar cambios metabólicos en CS de fibras nerviosas de ratones wt y TrJ alimentados AL, consecuencia de la presencia de agregados, focalizándonos en la activación de las vías autofágica-lisosomal.

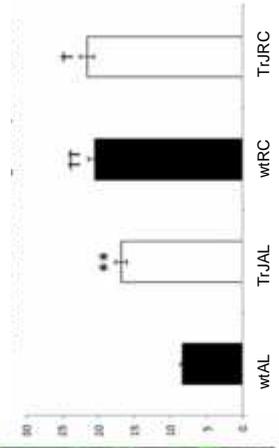
Las diferencias metabólicas entre ambos genotipos en condiciones AL fueron evaluadas utilizando marcadores de la ruta autofágico-lisosomal. El análisis se realizó utilizando los marcadores LC3 (del inglés Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) usualmente utilizado para evaluar actividad autofágica y LAMP1 (del inglés Lysosomal-associated membrane protein-1) utilizado como indicador lisosomal. El análisis de los marcadores se realizó principalmente en regiones perinucleares de las CS para ambos genotipos en condiciones AL y RC (Fig. 5.2.1 C y E). Inicialmente se evaluó la relación entre la cantidad de núcleos que presentaban marcación de LC3+ o LAMP1+ sobre cantidad de núcleos totales (los núcleos clasificados dentro de los grupos LC3+ o LAMP1+ eran aquellos que presentaban señal del marcador en al menos $\frac{3}{4}$ de la región perinuclear, ver resultados en Tabla II B y C). No se hallaron diferencias entre ambos genotipos en condiciones AL. Del análisis cualitativo de las imágenes se aprecian diferencias en la marcación de LC3, pero no en la de LAMP1. Al cuantificar estas señales encontramos intensidades mayores de LC3 en CS de ratones TrJ respecto a los wt (wtAL: $8,3 \pm 0,3$ UA; TrJAL: $16,9 \pm 0,8$ UA; $p < 0,001$) (Fig. 5.2.1 D. Respecto a la cuantificación de la señal de LAMP1 no se encontraron diferencias entre los genotipos en condiciones AL (wtAL: $8,1 \pm 0,5$ UA; TrJAL: $8,3 \pm 0,3$ UA) (Fig. 5.2.1 F).

La evaluación de la señal de Ribosomas alrededor de los núcleos se realizó con una doble función. Por un lado permite la evaluación de la ribofagia glial y por otro permite indirectamente observar la actividad de síntesis de proteínas en las CS. Las imágenes sugieren una mayor marcación en las CS wt respecto a las TrJ, dato que se confirma con la cuantificación de la señal (wtAL: $26,96 \pm 1,54$ AU; TrJAL: $13,02 \pm 0,72$ AU; $p < 0,001$).

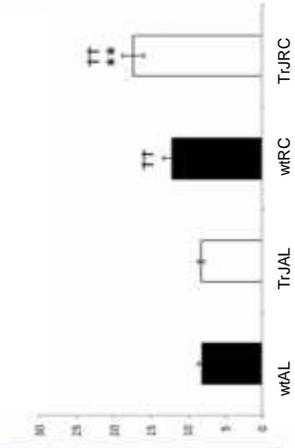
B Media de intensidad de Ribosomas



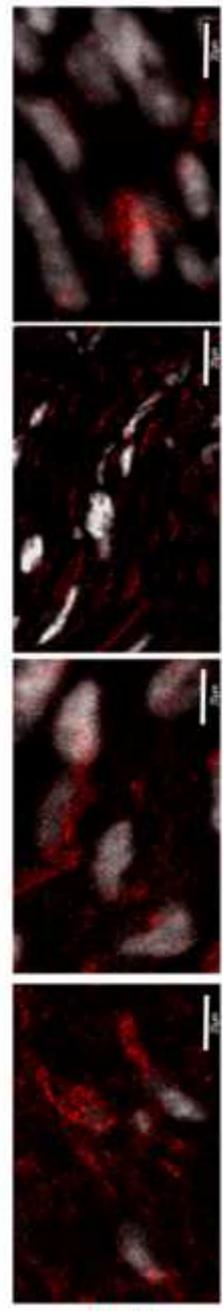
D Media de intensidad de LC3



F Media de intensidad de LAMP1

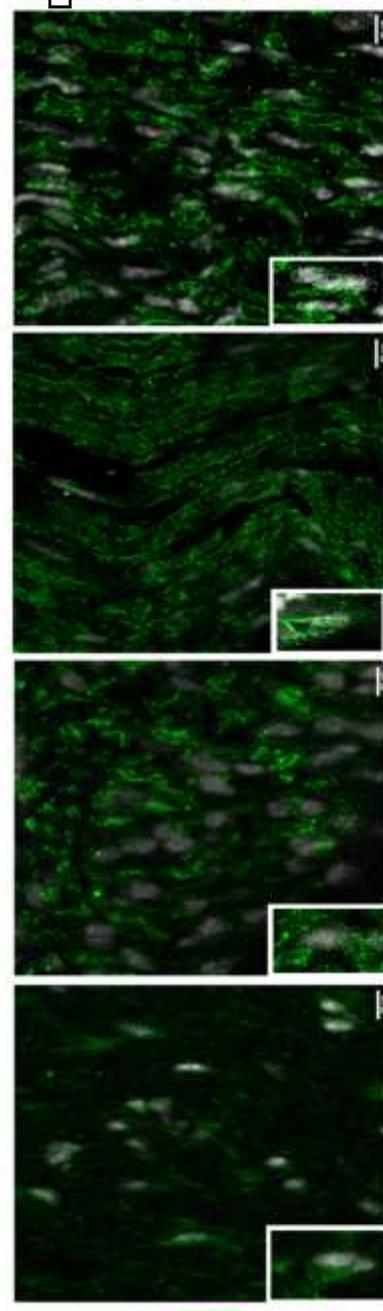


A



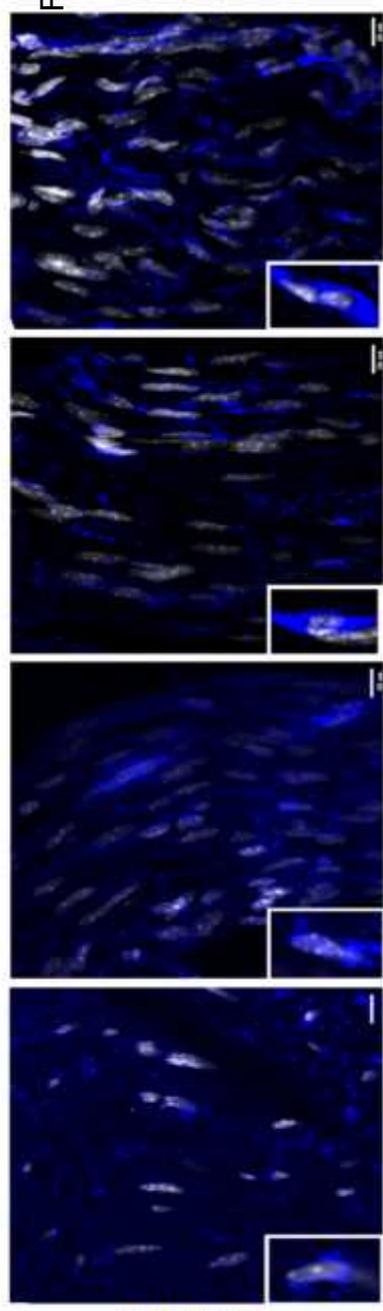
Rib

C



LC3

E



LAMP1

Figura 5.2.1 Expresión de marcadores de rutas autofágica-lisosomal. **A, C y E:** Las imágenes se corresponden con proyecciones máximas de criosecciones de nervio ciático inmunomarcadas para Ribosomas (rojo), LC3 (verde) y LAMP1 (azul) y TrJ en condiciones AL y RC. En el panel inferior izquierdo de las imágenes **C y E** se seleccionaron núcleos representativos de cada condición. **B, D y F:** Los gráficos representan la media de intensidad de fluorescencia de Rib, LC3 y LAMP1 en dominios perinucleares para ambos genotipos AL y bajo RC. Los asteriscos indican diferencias de * $p < 0,05$ y *** $p < 0,001$ entre genotipos dentro de un tratamiento y las cruces † $p < 0,05$ y †† $p < 0,001$ entre tratamientos dentro de un mismo genotipo.

Tabla II. Cantidad de núcleos PMP22, LC3 y LAMP1 sobre núcleos totales en criosecciones de nervio ciático expresado en porcentaje (%).

Tratamientos y Genotipos	wtAL	TrJAL	wtRC	TrJRC
(A) Núcleos PMP22+	22,1 ±3,6	30,1±3,9	12,6±3,1	15,8±3,5
(B) Núcleos LC3+	18,0 ±7,4	24,0±8,9	24,4,±11,5	33,4±3,6
(C) Núcleos LAMP1+	57,8 ±15,5	70,0±11,4	74,3,±14,9	83,0±9,4

5.3 Evaluar el tratamiento de RC analizando las fibras nerviosas periféricas de ratones wt y TrJ, sometidos a este tratamiento, con los parámetros analizados en los objetivos 2 y 3.

Las figuras y los gráficos de este objetivo específico ya se han presentado anteriormente (Fig. 5.1.1, 5.1.2, 5.2.1 y tabla II), sin embargo corresponde a este objetivo específico su análisis. Los resultados previos en condiciones AL muestran un panorama en el cual encontramos un incremento en la intensidad de fluorescencia de agregados de PMP22 y de PMP22 en general, asociado a mayor señal de LC3 y menor de Ribosomas en las CS de las fibras nerviosas periféricas TrJ respecto al wt. LAMP1, sin embargo, no mostró una expresión diferente asociada en relación al genotipo.

En respuesta al tratamiento de RC, cuando evaluamos las estructuras resistentes a la acción del AF, observamos una disminución marcada de la señal de PMP22 en regiones perinucleares en ambos genotipos (wtRC: 11,0 ± 0,37 UA; TrJRC: 13,7 ± 0,69 UA), desapareciendo las diferencias entre ellos (Fig 5.1.2 B y D). Siguiendo en la misma línea, hay una drástica disminución de la intensidad de Vimentina en ambos genotipos alrededor de los núcleos bajo RC, que avalan la disminución de los agregados (wtRC: 2,78 ± 0,45 UA; TrJRC: 7,85 ± 0,84 UA; p<0,001) (Fig. 5.1.2 B). En concordancia con estos resultados, la expresión de PMP22 en dominios gliales mostró una expresión más discreta y puntiforme de PMP22, con disminución de los grandes agrupamientos citoplasmáticos presentes en los ratones TrJ AL. Al cuantificarse esta señal se observa una disminución notoria en la intensidad en ambos genotipos, que acerca sus diferencias (wtRC: 14,51 ± 0,22 UA; TrJRC: 17,11 ± 0,20 UA; p<0.05).

La respuesta en la señal de LC3 a la RC consistió en un incremento discreto en su intensidad de señal en ambos genotipos (wtRC: 20,5 ± 0,9 UA, p<0,001; TrJRC: 21,6 ±

0,9 UA; $p < 0,05$). Este incremento es menos evidente en el genotipo TrJ, sin embargo no hay diferencias genotípicas en la respuesta al tratamiento (Fig 5.2.1 C y D).

La intensidad de LAMP1 sufrió un incremento en ambos genotipos (wtRC: $12,2 \pm 1,2$ UA, $p < 0,001$; TrJRC: $17,4 \pm 1,4$ UA; $p < 0,001$), mostrando los individuos TrJ una respuesta más robusta con el tratamiento de RC (Fig 5.2.1 E y F).

Ambos genotipos responden disminuyendo la intensidad de fluorescencia de Ribosomas en regiones perinucleares en respuesta a la dieta restringida (wtRC: $10,3 \pm 0,64$ UA, $p < 0,001$; TrJRC: $6,12 \pm 0,33$ UA; $p < 0,001$), a pesar de ello siguen manteniendo las diferencias genotípicas ($p < 0,05$) (Fig.5.2.1 A y B).

5.4 Estudiar la cantidad, morfología y tamaños de núcleos de las CS en las fibras nerviosas periféricas de ratones wt y TrJ alimentados AL y bajo RC.

A pesar de que ya se han presentado varias imágenes donde se muestra la señal de Dapi, en este objetivo nos enfocamos particularmente en su estudio. El análisis inicial consistió en determinar la existencia de una relación entre el número de núcleos y el genotipo, en condiciones AL, tal como se ha reportado en la literatura (Henry, 1983). En nuestro caso, se observó que el número de núcleos respecto al número de fibras es 3 veces mayor en TrJ que en wt (wtAL: $1,1 \pm 0,1$; TrJAL: $3,3 \pm 0,4$; $p < 0,001$). Luego del tratamiento de RC se observó una disminución no significativa en los nervios TrJ y un aumento en los wt respecto del tratamiento AL (wtRC: $1,5 \pm 0,4$; TrJRC: $2,9 \pm 0,3$; $p < 0,05$) (Fig.5.4.1 B). A pesar de ello, las diferencias entre genotipos en condiciones de RC son menores que las observadas en condiciones AL. La figura 5.4.1 muestra los núcleos de cada genotipo bajo cada tratamiento, así como los datos mencionados.

Respecto de las dimensiones de los núcleos, considerando el área y el perímetro, no se encontraron diferencias genotípicas ni efectos del tratamiento. Sólo las fibras wt incrementaron levemente su área (Fig.5.4.1 C).

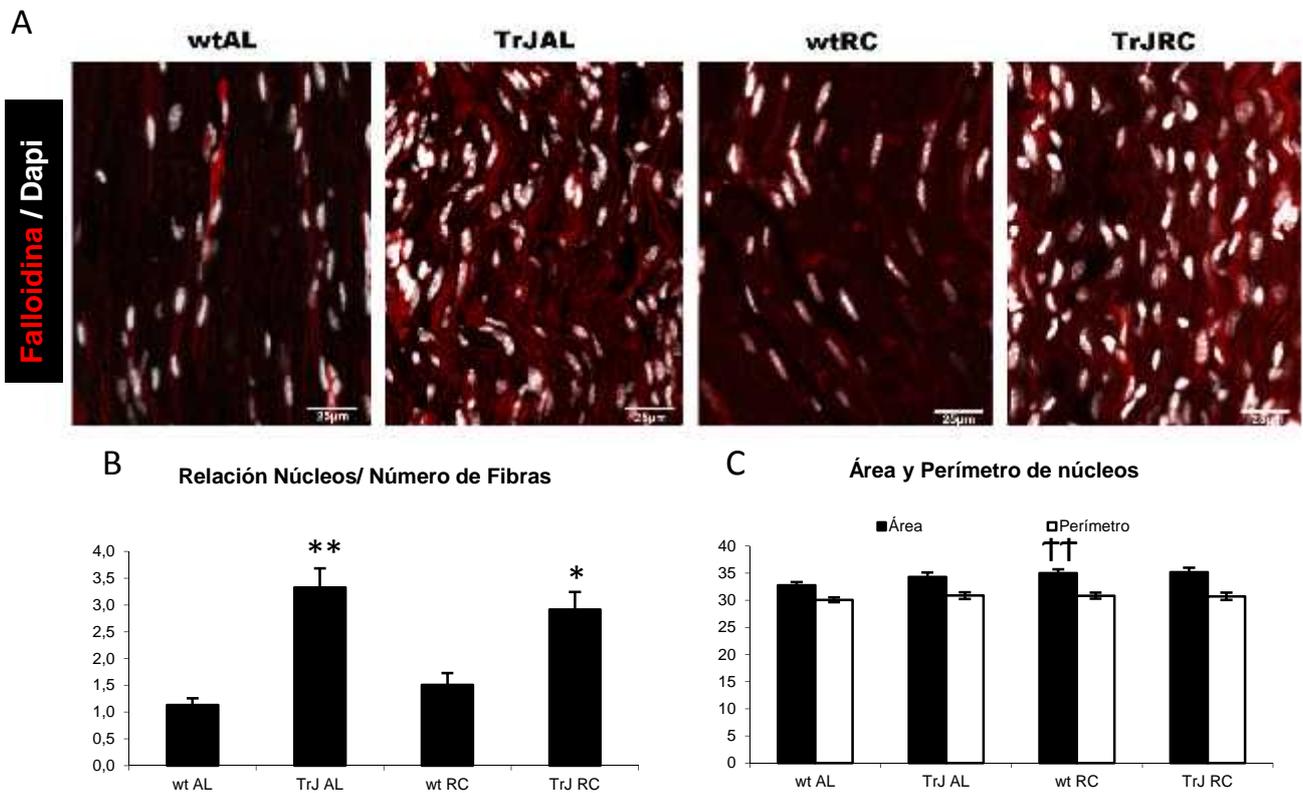


Figura 5.4.1 Análisis de cantidad y dimensiones de los núcleos. **A:** Las imágenes se corresponden con proyecciones máximas de criosecciones de nervio ciático marcadas con Falloidina (rojo) y Dapi (blanco) wt y TrJ en condiciones AL y RC. **B:** El gráfico representa la media de cantidad de núcleos por fibra nerviosas para ambos genotipos AL y bajo RC. **C:** Los asteriscos indican diferencias de * $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$ entre genotipos dentro de un tratamiento y las cruces †† $p < 0,001$ entre tratamientos dentro de un mismo genotipo.

5.5 Estudiar la citoarquitectura en las fibras nerviosas periféricas de ratones wt y TrJ, alimentados AL y sometidos a RC.

Para llevar adelante este análisis se evaluaron distintos componentes del citoesqueleto.

Microfilamentos. Para el análisis de los microfilamentos se estudió la distribución de los mismos con la utilización de una sonda (Falloidina) que se une al microfilamento polimerizado y se observa en la figura 5.4.1A. En condiciones AL la intensidad de señal de Falloidina es mayor en las fibras TrJ tanto en dominios gliales como axonales (CS: wtAL: $14,05 \pm 0,16$ UA; TrJAL: $18,65 \pm 0,26$ UA; $p < 0,001$ y Ax: wtAL: $16,30 \pm 0,17$ UA; TrJAL: $30,78 \pm 0,41$ UA; $p < 0,001$) (Fig.5.5.1 B). Si comparamos las relaciones entre ambas señales medidas a la misma altura de la fibra (excluyendo nodos, ISL y núcleos) se observa que la intensidad en los dos dominios no varía notoriamente en el genotipo wt (Relación intensidad CS/Ax=1,16) pero si lo hace en los TrJ (Relación intensidad CS/Ax=1,65). La respuesta al tratamiento de RC del citoesqueleto de actina parece ser genotipo específica: mientras las fibras wt disminuyen su intensidad en ambos dominios (CS: wtRC: $8,31 \pm 0,07$ UA $p < 0,001$ y Ax: wtRC: $10,79 \pm 0,09$ UA $p < 0,001$), la fibras

TrJ muestran un incremento de la intensidad en dominios gliales y una disminución en dominios axonales (CS: TrJRC: $20,91 \pm 0,42$ UA $p < 0,001$ y Ax: TrJRC: $25,64 \pm 0,52$ UA $p < 0,001$) (Fig.5.5.1 B). A pesar de presentar diferentes respuestas al tratamiento de RC, al evaluar la relación intensidad de fluorescencia de actina en CS/Ax, se observa una homogeneización de la respuesta de ambos genotipos (Relación intensidad CS/Ax wt=1,29 y TrJ=1,22).

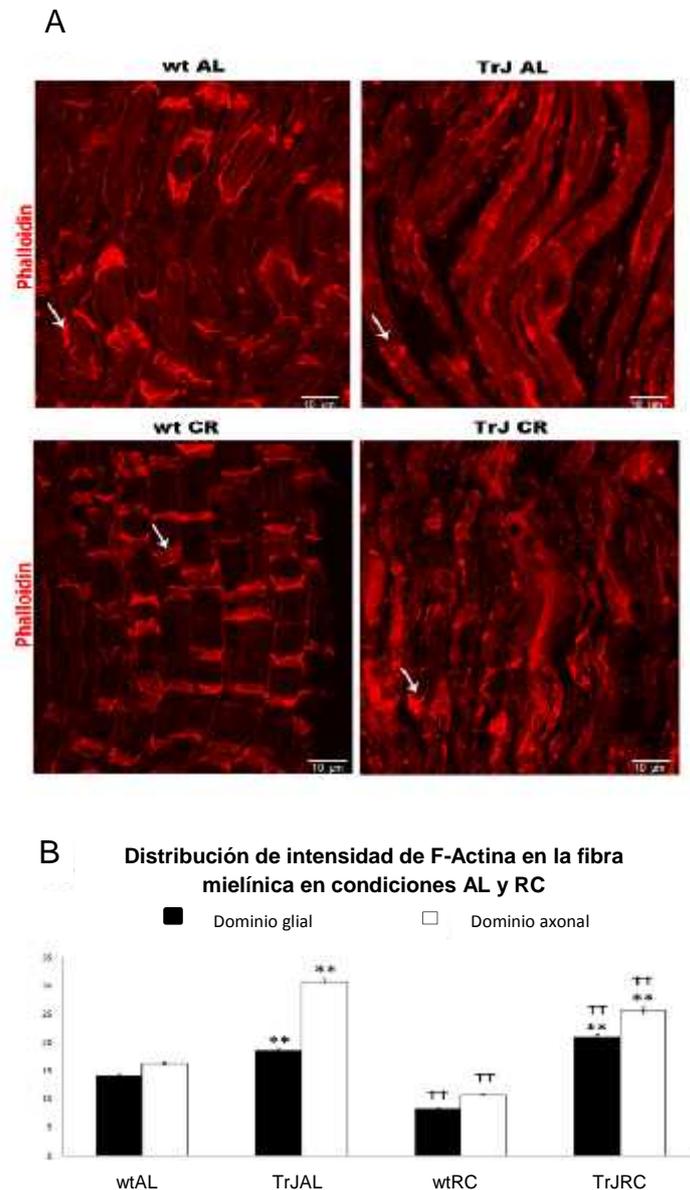


Figura 5.5.1 Distribución de microfilamentos en las fibras mielínicas periféricas del nervio ciático. **A:** Las imágenes se corresponden con proyecciones máximas de criosecciones de nervio ciático marcadas con Falloidina (rojo) wt y TrJ en condiciones AL y RC. Las flechas indican ISL en todas las condiciones. **B:** El gráfico representa la media de intensidad de fluorescencia de Fall en dominios gliales y axonales para ambos genotipos AL y bajo RC. Los asteriscos indican diferencias de ** $p < 0,001$ entre genotipos dentro de un tratamiento y las cruces †† $p < 0,001$ entre tratamientos dentro de un mismo genotipo.

Filamentos Intermedios. Otro aspecto evaluado fueron los filamentos intermedios, complementando el análisis de la expresión de vimentina, en relación a los agregosomas perinucleares (figura 5.1.2). Nos enfocamos en el análisis de la expresión de los neurofilamentos, mediante el estudio de su subunidad menor (Neurofilamento 68, Nf-68). Estas imágenes no se lograron tomar con los mismos valores de PMT, debido a que no se encontró un valor que permitiera la visualización correcta de este marcador para todas las condiciones. Para observar la expresión de este marcador en condiciones de RC, se debió incrementar el valor del PMT, lo cual indicó inicialmente una disminución en su expresión. Por este motivo se evaluó la intensidad en condiciones AL y luego en RC. Si bien el Nf68 es un marcador neuronal, en nuestro grupo ya se ha observado marcación de este anticuerpo en regiones gliales y aquí observamos también marcación glial.

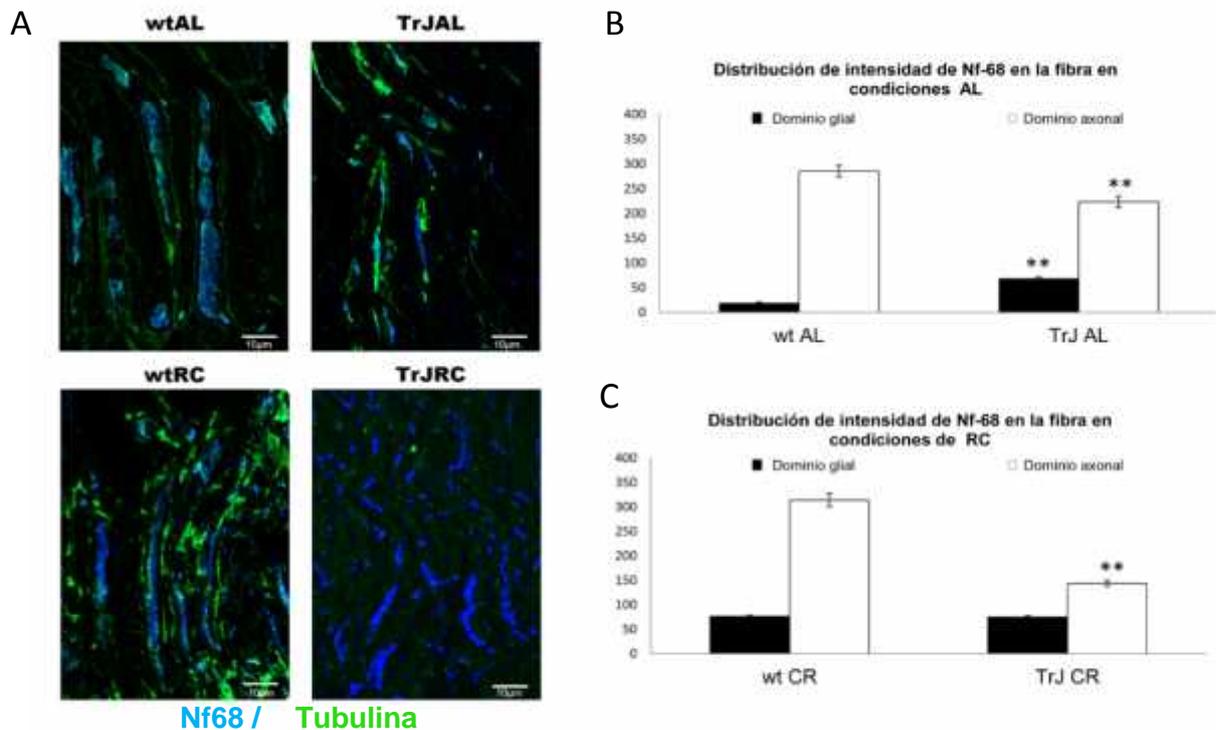


Figura 5.5.2 Distribución de Neurofilamento 68 en las fibras mielínicas periféricas del nervio ciático.

A: Las imágenes se corresponden con proyecciones máximas de criosecciones de nervio ciático marcadas con Neurofilamento 68 (azul) y Tubulina (verde) wt y TrJ en condiciones AL y RC. **B:** El gráfico representa la media de intensidad de fluorescencia de Nf68 en dominios gliales y axonales para ambos genotipos AL. **C:** El gráfico representa la media de intensidad de fluorescencia de Nf68 en dominios gliales y axonales para ambos genotipos RC. Los asteriscos indican diferencias de ** $p < 0,001$ entre genotipos dentro de un tratamiento.

Se observa una marcación diferente para ambos genotipos. Mientras los wt presentan una señal casi continua del marcador a nivel axonal, los axones TrJ parecen tener una señal más particulada (Fig.5.5.2 A y B). La intensidad de fluorescencia mostrada por las fibras TrJ en regiones gliales es mayor y en dominios axonales es menor respecto a las wt (CS: wtAL: $19,44 \pm 1,52$ UA, Ax: wtAL: $285,34 \pm 11,48$ UA; CS: TrJAL: $69,28 \pm 2,67$ UA, $p < 0,001$, Ax: TrJAL: $223,50 \pm 11,36$, $p < 0,001$). El tratamiento de RC mantiene el perfil de las intensidades, diferenciándose a nivel axonal con una mayor disminución de la intensidad de la señal en las fibras TrJ respecto a las wt. A nivel de dominios gliales no se encontraron diferencias genotípicas bajo RC (CS: wtRC: $76,0 \pm 3,40$ UA, Ax: wtRC: $313,7 \pm 13,5$ UA; CS: TrJRC: $74,56 \pm 3,37$ UA, Ax: TrJAL: $143,45 \pm 11,36$, $p < 0,001$) (Fig.5.5.2 C)

Microtúbulos. Para el análisis de los microtúbulos se decidió utilizar la relación entre intensidad de fluorescencia de Tubulina Acetilada sobre Tubulina como un indicativo de la cantidad de tubulina que se encuentra estabilizada. Esta relación fue evaluada través de los diferentes dominios de la fibra nerviosa. Las imágenes de las superposiciones de ambos marcadores indican que en condiciones AL las fibras wt presentan una mayor colocalización entre ambos marcadores respecto a lo observado en el genotipo TrJ (Fig.5.5.3 A). A su vez, la distribución de la tubulina acetilada en los TrJ es difusa, no acotándose a dominios específicos, e incluso invadiendo parcialmente regiones mielínicas. En condiciones de RC, ambos genotipos parecen disminuir mayoritariamente su intensidad de Tubulina Acetilada y parece observarse una mayor colocalización en los nervios TrJ bajo RC, lo cual podría indicar una mejor estructuración de los microtubulos.

Resultado de la cuantificación de ambas señales y de la relación entre ambas, se observa una mayor relación en dominios gliales en ambos genotipos en condiciones AL. Asimismo, las fibras TrJ presentaron una relación significativamente mayor respecto a las fibras wt en éstos dominios (CS: wtAL: $1,47 \pm 0,02$; CS: TrJAL: $2,36 \pm 0,04$; $p < 0,001$). A nivel axonal no hay diferencias genotípicas (Ax: wtAL: $0,78 \pm 0,01$; Ax: TrJAL: $0,92 \pm 0,02$). En condiciones de RC, las cuantificaciones muestran una disminución de la relación en ambos genotipos en dominios gliales (CS: wtRC: $1,13 \pm 0,03$; CS: TrJAL: $1,13 \pm 0,02$) y un pequeño incremento a nivel axonal en el genotipo TrJ (Ax: wtRC: $1,24 \pm 0,02$; Ax: TrJAL: $0,99 \pm 0,01$; $p < 0,001$).

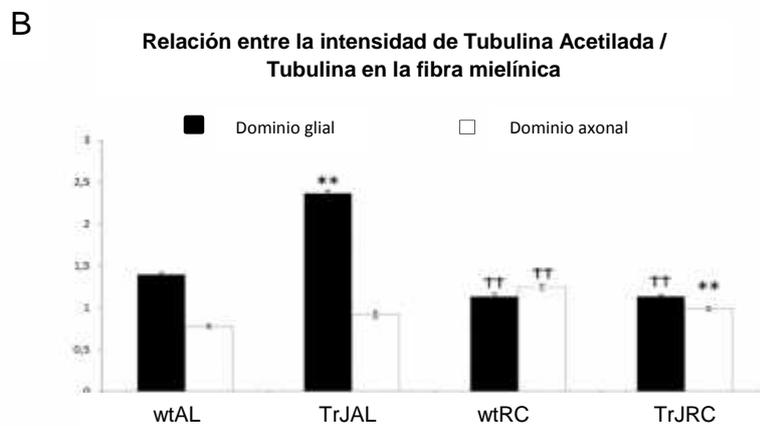
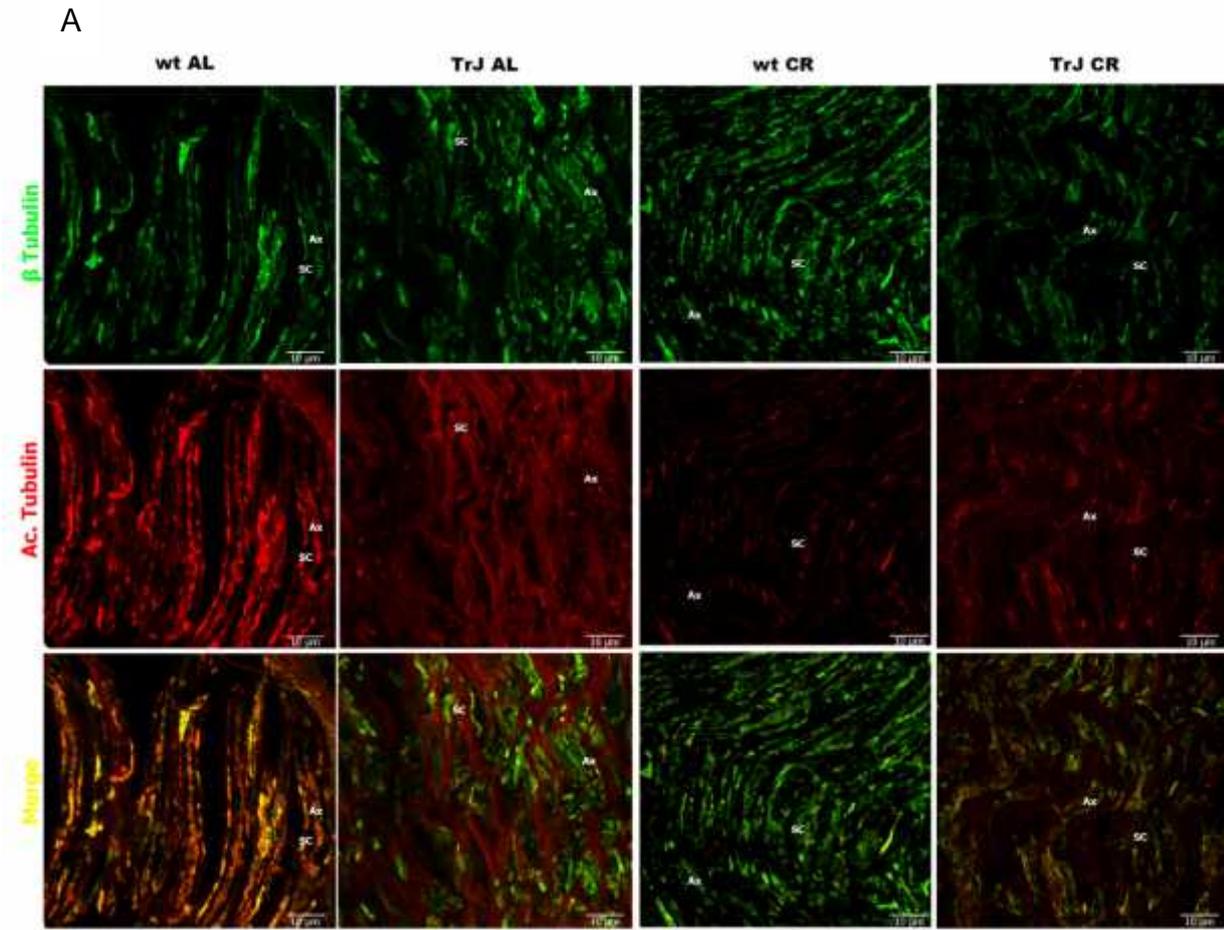


Figura 5.5.3 Distribución de microtúbulos en las fibras mielínicas periféricas del nervio ciático. A: Las imágenes se corresponden con proyecciones máximas de criosecciones de nervio ciático marcadas con Tubulina (verde) , Tubulina Acetilada (rojo) y la superposición de ambos marcadores wt y TrJ en condiciones AL y RC. Ax muestra dominios axonales, CS dominios gliales. **B:** El gráfico representa la relación entre la intensidad de fluorescencia de TubAcet / Tub en dominios gliales y axonales para ambos genotipos AL y bajo RC. Los asteriscos indican diferencias de ** $p < 0,001$ entre genotipos dentro de un tratamiento y las cruces †† $p < 0,001$ entre tratamientos dentro de un mismo genotipo.

5.6 Analizar la morfología y estructura de la mielina en las fibras mielínicas wt y TrJ AL. En comparación con estos, se estudiaron los cambios en la mielina en respuesta al tratamiento de RC.

La determinación de los parámetros morfométricos nos permite apreciar los cambios en la morfología del nervio ciático así como los cambios presentes en las fibras nerviosas periféricas en todas las condiciones experimentales.

Diámetro de la Fibra. En condiciones AL se observan diferentes perfiles en los histogramas de frecuencia de los diámetros de las fibras mielínicas para nervios wt y TrJ (Fig. 5.6.1 A y B). Mientras las fibras wt muestran una distribución bimodal con dos máximos en los diámetros de 10-12 y 16-18 μ m, los nervios TrJ presentan una distribución unimodal con una máxima en diámetros de 6-8 μ m y una disminución en los diámetros mayores a estos valores, salvo para las fibras de gran diámetro donde hay un incremento sobre las wt. Como resultado del tratamiento de RC, ambos genotipos modifican sus histogramas. Los nervios wt pasan a tener una distribución bimodal más evidente (con máximos en 10-12 y 18-20 μ m). Por su parte, los nervios TrJ muestran una distribución posiblemente unimodal centrada alrededor de diámetros de 10-12 μ m. Las imágenes muestran claramente un menor grosor en las fibras TrJ respecto a las wt y parecen indicar un incremento en el grosor luego del tratamiento (Fig. 5.6.1 C).

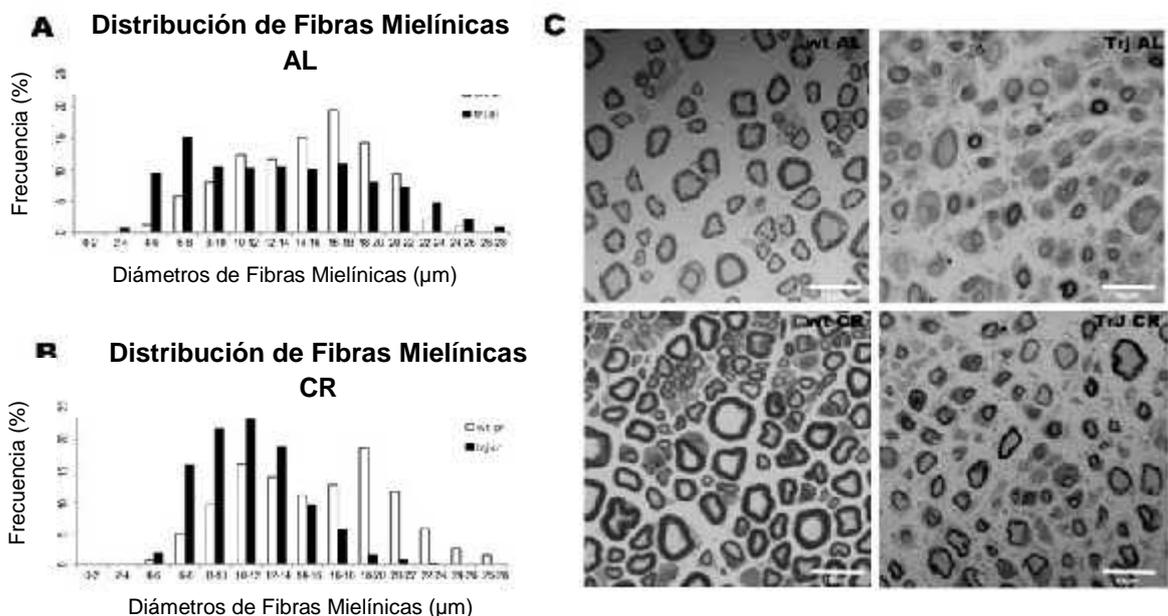


Figura 5.6.1 Distribución de diámetros de fibras mielínicas en nervio ciático. A y B: Los gráficos corresponden a histogramas de frecuencia de diámetros wt (blanco) y TrJ (negro) presentes en nervios ciáticos AL (A) y de ratones sometidos a RC (B). Las fotografías mostradas en C corresponden a cortes transversales de nervios ciáticos representativas de todas las condiciones experimentales.

Factor g. Respecto a este, se observó un incremento en las fibras mielínicas TrJ en comparación las wt (wtAL: $0,41 \pm 0,001 \mu\text{m}$; TrJAL: $0,42 \pm 0,001 \mu\text{m}$; $p < 0,0001$). En respuesta a RC, disminuyó el factor g, indicando un incremento en el grosor mielínico. Este incremento es más evidente en el genotipo TrJ ($p < 0,0001$). Las diferencias en el factor g entre ambos genotipos son menores luego del tratamiento (wtRC: $0,39 \pm 0,001 \mu\text{m}$; TrJRC= $0,39 \pm 0,001 \mu\text{m}$; $p=0,02$) (Fig. 5.6.2 A). En concordancia con estas medidas, cuando se analizan los resultados de la cuantificación de áreas mielínicas en diámetros menores a $18 \mu\text{m}$, se observa una mayor área ocupada por mielina en las fibras wt respecto a las TrJ en condiciones AL (wtAL= $89,2 \pm 2,02 \mu\text{m}^2$; TrJAL= $58,66 \pm 1,80 \mu\text{m}^2$; $p < 0,001$). El tratamiento de RC, tiene efectos sobre el área ocupada por la mielina en el genotipo TrJ, el cual se observó incrementado respecto a TrJ AL (TrJAL= $58,7 \pm 1,8 \mu\text{m}^2$; TrJCR= $69,1 \pm 1,4 \mu\text{m}^2$; $p < 0,0001$) (Fig.5.6.2 B). En relación a la densidad de fibras mielínicas en el nervio ciático, los resultados indican que hay una mayor presencia de fibras mielínicas en el genotipo wt respecto al TrJ en condiciones AL (wt= $45,1 \pm 2,2$ fibras per $100 \mu\text{m}^2$; TrJ= $35,4 \pm 1,3$ fibras per $100 \mu\text{m}^2$; $p < 0,001$). Luego del tratamiento de RC, las diferencias genotípicas se mantienen (wtCR= $51,7 \pm 1,4$ fibers per $100 \mu\text{m}^2$; $p < 0,05$ and TrJCR= $39,5 \pm 1,4$ fibers per $100 \mu\text{m}^2$; $p < 0,001$). A pesar de ello, ambos genotipos incrementan su densidad ($p < 0,05$) (Fig. 5.6.2 C).

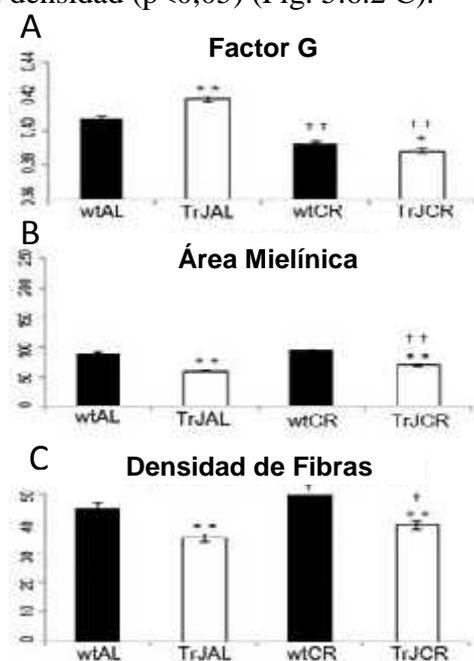
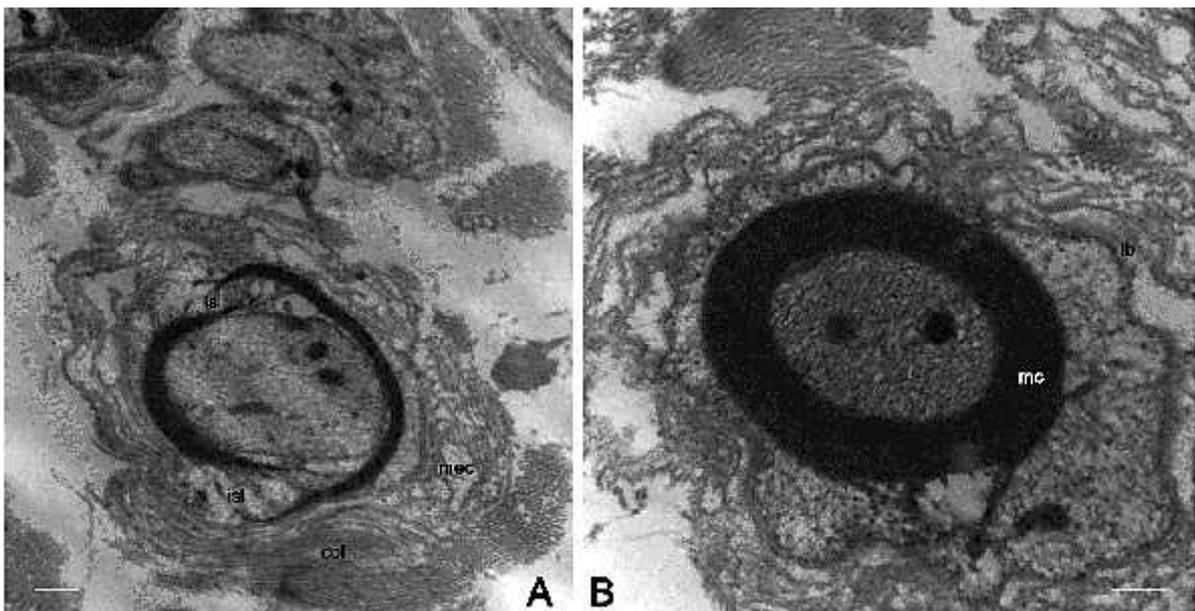


Figura 5.6.2 Parámetros morfométricos de fibras mielínicas en nervio ciático. **A:** Gráfico de medias de factor g para fibras wt y TrJ AL y RC. **B:** Gráfico de medias de Área mielínica para fibras wt y TrJ AL y RC. **C:** Gráfico de medias de densidad de fibras mielínicas wt y TrJ AL y RC. Los asteriscos indican diferencias de * $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$ entre genotipos dentro de un tratamiento y las cruces † $p < 0,05$ y †† $p < 0,001$ entre tratamientos dentro de un mismo genotipo.

5.7 Analizar cualitativamente la ultraestructura de la fibra nerviosa TrJ y wt AL y bajo RC.

El análisis de la ultraestructura nos permitió observar con mayor resolución la estructura de la mielina y confirmar la presencia de estructuras tales como agregosomas y vesículas de la ruta autofágica-lisosomal, que ya habían sido analizadas mediante la utilización de marcadores específicos. Asimismo, esta técnica nos permitió observar la ultraestructura de la MEC, la cual en los cortes semi-finos ya se mostraba diferente para ambos genotipos.

Las fibras wt y TrJ en condiciones AL mostraron diferencias notorias en sus grosores mielínicos, donde el genotipo TrJ, tal como se cuantificó en el objetivo específico anterior y se ha reportado en la literatura, presenta un adelgazamiento mielínico. La figura 5.7.1 ilustra lo mencionado. Además hay una mejor organización mielínica en los nervios wt, tanto a nivel de la mielina compacta, como a nivel de la mielina laxa (ISL). Adicionalmente se observó una lámina basal y MEC bien estructuradas en este último genotipo. A diferencia de éste, en las fibras TrJ la mielina compacta estaba adelgazada y la lámina basal expandida se unía a una MEC laxa y mal organizada. Así mismo, se pudo observar en el genotipo TrJ la presencia de un citoesqueleto glial también más expandido con presencia de estructuras vesiculares alrededor de la mielina.



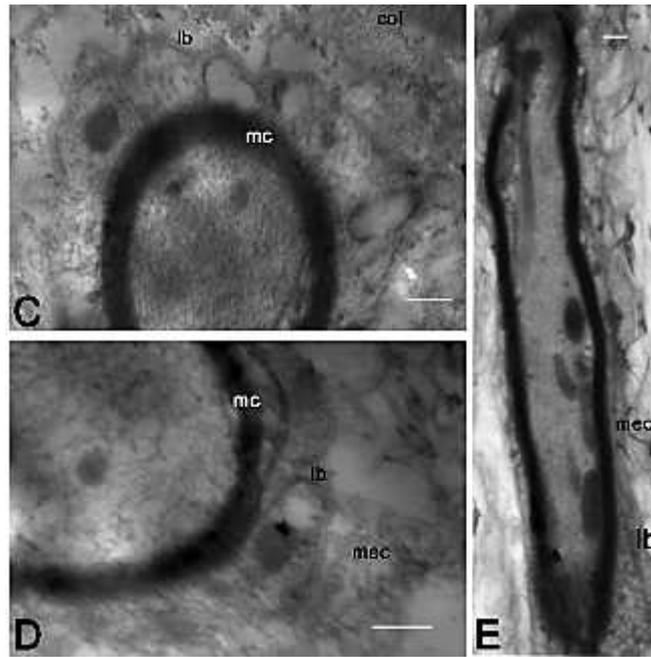
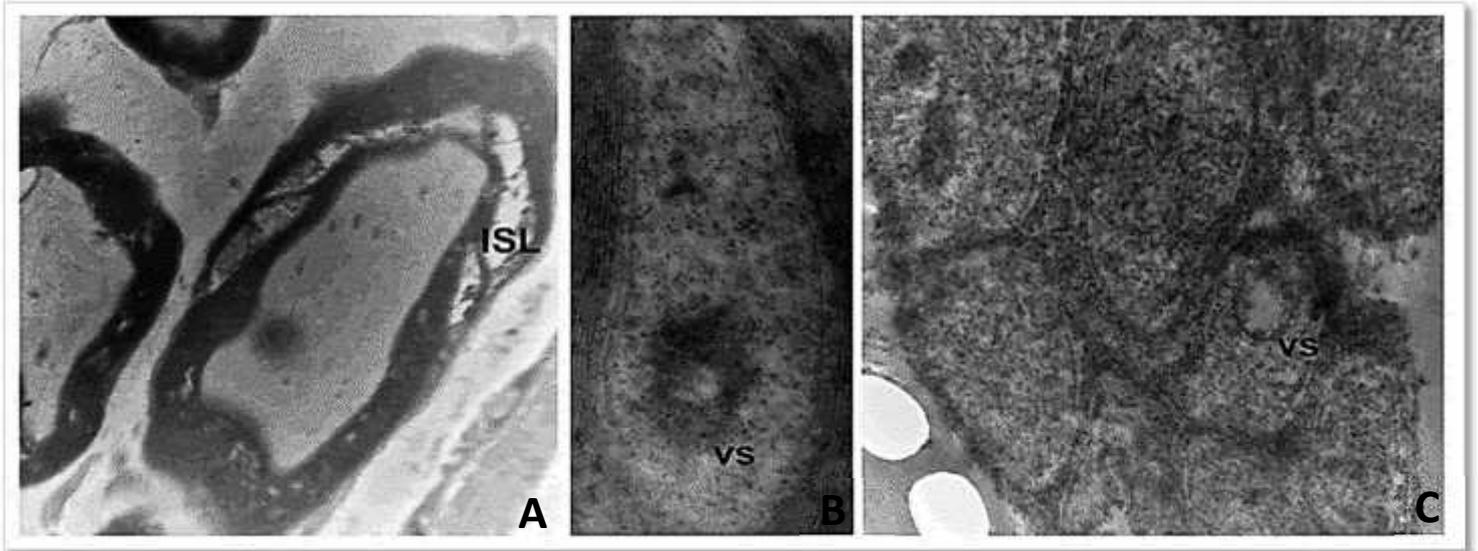


Figura 5.7.1. Las fibras nerviosas periféricas de ratones de genotipo wt y TrJ alimentados AL. Las fibras nerviosas wt (A y B) muestran una mielina bien organizada tanto en regiones compactas (B, mc) como laxa (A, isl). La lámina basal (lb) y la matriz extracelular (mec) están bien estructuradas en el genotipo wt. En las fibras TrJ (C, D y E) la mielina compacta está adelgazada, la lámina basal parece levemente hinchada y la matriz extracelular es muy laxa y mal organizada. isl: incisuras de Schmidt-Lanterman; col: colágeno. Las barras representan en A, B, C y D: 250nm; en E: 500nm.

En condiciones de RC, las fibras nerviosas wt presentaron buena estructuración mielínica a nivel de la mielina compacta y laxa y se observó un incremento de las estructuras vesiculares a varios niveles, observando presencia de vesículas a nivel glial (no se muestran en las figuras), axonal y en las fibras amielínicas (Fig. 5.7.2). A diferencia de esto, las fibras nerviosas TrJ presentaron en general una mejor estructuración mielínica. A pesar de la disminución observada en la presencia de agregados, aún se observaron algunos, cuya estructura coincidió con lo reportado previamente presentando un material denso rodeado por un halo de vimentina a su alrededor (Fortun et al., 2003). Además se detectan estructuras vesiculares y lo que podrían ser fagoforos y autofagosomas con distintos grados de maduración (Fig. 5.7.2). La presencia de estructuras que alternan la mielina compacta y tiene apariencia de semi-incisuras fue una observación frecuente que también pudo observarse en el genotipo wt, pero siempre en respuesta al tratamiento de RC.

wt RC



TrJ RC

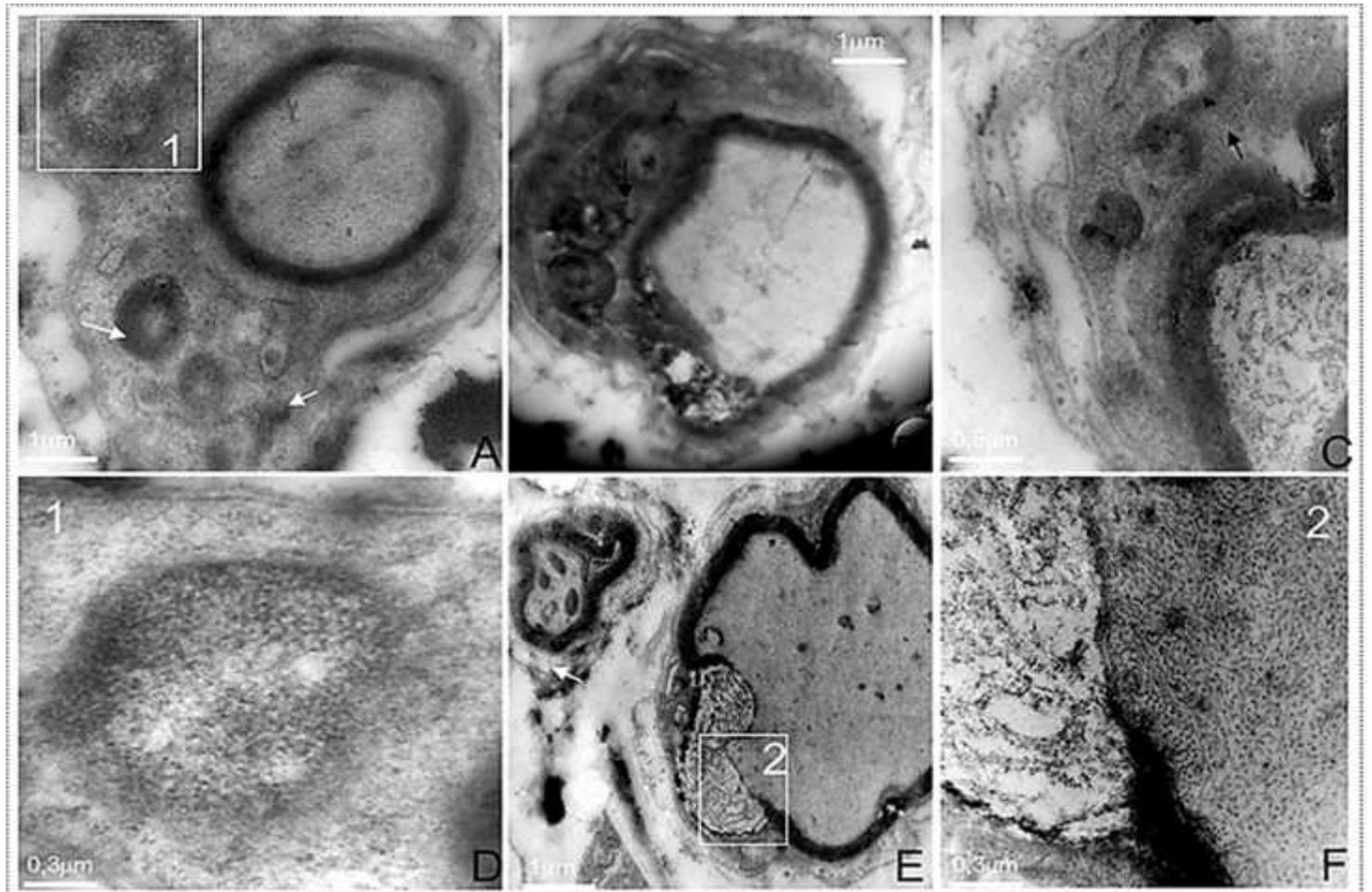


Figura 5.7.2. Las fibras nerviosas periféricas de ratones de genotipo wt y TrJ bajo RC. Las fibras nerviosas wtRC (A y B) muestran una mielina bien organizada tanto en regiones compactas (B) como laxa (A). En las fibras TrJRC a nivel mielínico se observa la mielina aún adelgazada, presencia de agregados (A y D) y estructuras vesiculares junto a autofagosomas en diferentes estados de maduración (B y C). En (E y F) se observa una estructura que fue frecuentemente observada y podría corresponderse con hemi-incisuras.

6. Discusión

La presente tesis de maestría analiza los efectos de un tratamiento de RC leve sobre el SNP en ratones normales y en condiciones neurodegenerativas crónicas (TrJ). Para llevar a cabo este análisis inicialmente se debieron determinar las diferencias genotípicas atendiendo varios aspectos particulares de la fibra nerviosa, tales como la presencia de agregomas PMP22 en CS y expresión de esta proteína a nivel glial, niveles basales de activación de la ruta autofágica-lisosomal y la citoarquitectura de la fibra, incluida la mielina. Analizados estos, mediante la utilización de diferentes técnicas de microscopía, logramos determinar las condiciones genotípicas iniciales que nos permitieron posteriormente evaluar los efectos del tratamiento sobre la fibra nerviosa.

6.1 Los perfiles de expresión de PMP22 en los nervios TrJ difieren de los wt y ambos cambian drásticamente en respuesta a la RC.

La presencia de agregados proteicos ricos en PMP22 fueron puestos en evidencia en ambos genotipos, siendo notoriamente mayores en los ratones portadores de la mutación L16P (TrJ). En este sentido, se observó un incremento del 50% en la intensidad de PMP22 agregada en los TrJ respecto de los wt. La presencia de agregados de menor tamaño e intensidad de PMP22 en el genotipo wt fue detectada en nuestros estudios. En acuerdo con estos resultados, se han observado agregomas de PMP22 en condiciones wt bajo condiciones de inhibición del proteasoma (Ryan *et al.*, 2002).

El método de evaluación seleccionado para determinar los agregados de PMP22 (digestión con AF), permitió detectar a los 10 segundos las estructuras buscadas en regiones pericentriolares/perinucleares principalmente en el genotipo TrJ. Si continuamos la digestión (tratamientos de 15 segundos) observamos al igual que en el tiempo anterior una intensidad de señal de PMP22 en el genotipo TrJ mayor a la wt, sin embargo se comienzan a visualizar otras estructuras agregadas dispersas en la fibra nerviosa y no acotadas al dominio perinuclear. Esto explica el cambio en la relación P/F (intensidad perinuclear/intensidad de la fibra) observada cuando pasamos de 10 a 15 segundos de tratamiento. Las estructuras resistentes que aparecen con tratamientos con AF de 15 segundos podrían corresponderse con los pequeños agregados (oligómeros y/o multímetros). En este sentido, en general la agregación proteica resulta de proteínas que

se unen en una conformación anormal, llevando a la formación de intermediarios oligoméricos (Merlini *et al.*, 2001). Estos intermediarios se agregan y pueden madurar en pequeños agregados proteicos, los cuales, estructurados o no, continúan creciendo y multimerizando en grandes agregados o inclusiones (Kopito, 2000). Estos grandes agregados coalescen en los agregosomas o agresomas. Su ubicación es pericentriolar, conteniendo proteínas mal plegadas, ubiquitinizadas, las cuales serán rodeadas de filamentos intermedios como vimentina o keratina (Johnston *et al.*, 1998; Kopito, 2000), como ya hemos señalado.

El criterio utilizado por nosotros para la evaluación de los agregados consistió en buscar en regiones perinucleares áreas resistentes a la degradación con AF junto a la presencia de vimentina alrededor de ellos. Los controles realizados con Falloidina no presentaron señal alguna en ninguno de los tiempos (datos no mostrados), lo cual evidencia la actividad del AF sobre la estructura de la fibra. Otros investigadores han utilizado otros criterios como la doble marcación de PMP22 y Ub, ubicación perinuclear, diámetros mayor a 1 μm y exclusión de ER y Golgi (Notterpek *et al.*, 1999b). Sin embargo, ambos criterios confluyen en un único resultado, que consiste en una mayor agregación en fibras nerviosas TrJ respecto de las wt.

Adicionalmente y considerando el halo de vimentina que sostiene a los agregados de PMP22, fue determinada la señal de vimentina en los dominios perinucleares. Si bien el tratamiento con AF degrada muchas de las estructuras allí presentes, en concordancia con los resultados previos de PMP22, encontramos una cantidad de vimentina en las fibras TrJ 6 veces mayor sobre la wt.

Más allá del incremento en la intensidad de señal de PMP22 en el genotipo TrJ, lo cual nos habla de la mayor presencia y cantidad de agregados en este genotipo, también se evaluó si los nervios ciáticos del genotipo TrJ presentaban una mayor proporción de CS con agregados en relación a los núcleos de CS totales. A pesar de no encontrarse diferencias significativas en la cantidad de núcleos PMP22+ entre fibras wt y TrJ, si se observó una tendencia al incremento en fibras TrJ. Esta cantidad de núcleos marcados para PMP22 disminuyen bajo RC, sin embargo continuamos sin encontrar diferencias significativas en estos datos. En este sentido creemos que el criterio utilizado fue un criterio que solo nos permitió cuantificar agregados de gran tamaño y eso influyó en los resultados obtenidos. De todas formas otros investigadores han observado una cantidad

aproximada de 28% de agregados perinucleares en nervios adultos TrJ AL (Fortun *et al.*, 2005), lo cual concuerda con nuestros resultados del 30%.

La utilización de un segundo método de cuantificación de PMP22 permitió cuantificar la señal en el citoplasma externo de dominios gliales. Estos resultados son coincidentes con los previos, sin embargo el dominio cuantificado fue otro, lo cual brinda información adicional. Ambas señales de PMP22 mantienen el mismo perfil encontrando una disminución en la intensidad de los wt respecto a los TrJ del 30%. Debido a la naturaleza hidrofóbica de la proteína de membrana y a su función estructural, la misma es sintetizada en el retículo endoplasmático rugoso, después pasa al Golgi donde es glicosilada y mediante vesículas llega a la membrana. El análisis de estos resultados permite evaluar la cantidad de proteína presente en el citoplasma glial. Allí, PMP22 puede estar siendo asistida para su replegamiento por chaperonas, marcada para la degradación o formando oligómeros o multímeros. La cuantificación de la proteína en estos dominios así como la cuantificación de la proteína en agregados de PMP22, pone en evidencia un notorio incremento y acumulación de la proteína en condiciones TrJ. Estos resultados son coincidentes con publicaciones previas de nuestro grupo (Kun *et al.*, 2012b; Rosso *et al.*, 2012) así como con reportes de otros investigadores (Notterpek *et al.*, 1999b; Ryan *et al.*, 2002; Rangaraju *et al.*, 2008). En respuesta al tratamiento de RC, las disminuciones a nivel de PMP22 resultan evidentes y se observan tanto a nivel de los agregomas como a nivel citoplasmático. La primera disminución podría relacionarse con incrementos en la macroautofagia y degradación lisosomal, tal como indican los incrementos en los marcadores LC3 y LAMP1. En concordancia con estos resultados, los ratones TrJ frente a un tratamiento de Ayuno intermitente responden disminuyendo la frecuencia de agregados en un 50% (Madorsky *et al.*, 2009). La disminución a nivel citoplasmático podría estar indicando otras respuestas al tratamiento que implican tipos alternativos de autofagia que nosotros aún no hemos evaluado. En este sentido, se ha observado que a consecuencia de tratamientos de RC también se potencia la respuesta de las HSPs (Selsby *et al.*, 2005). Estas promueven *in vitro* el correcto plegamiento y la disminución en la agregación de PMP22 en modelos de sobreexpresión (Rangaraju *et al.*, 2008). A pesar de que nuestro modelo es diferente y la PMP22 TrJ portadora de la mutación puntual no logrará plegarse correctamente, la potenciación de estas chaperonas podría colaborar con el plegamiento de otras proteínas con las cuales PMP22 dimeriza o multimeriza,

arrastrándolas hacia los agregados, colaborado así con el mantenimiento de la homeostasis de la CS.

A pesar de que nos acotamos a analizar la expresión de PMP22 exclusivamente en dominios gliales, es notoria la presencia de la proteína en dominios axonales. En este sentido, se ha reportado la expresión de PMP22 en varios tejidos y tipos celulares, e inclusive se ha descrito la expresión en las neuronas motoras espinales a bajos niveles durante el desarrollo y la adultez (Parmantier *et al.*, 1995; 1997). Adicionalmente, un estudio reciente mostró que la sobreexpresión de PMP22 incrementa la pérdida de neuronas motoras en ratones, sin embargo las deficiencias en esta proteína no alterarían el número de neuronas motoras jóvenes (Nattkamper *et al.*, 2009). A pesar de haber sido poco se considerada en la literatura la expresión de PMP22 a nivel axonal, sus cambios podrían contribuir con el proceso neurodegenerativo de los nervios TrJ. Nuestros resultados indican que el tratamiento de RC influyó en este dominio disminuyendo significativamente la intensidad en ambos genotipos (datos no mostrados).

6.2 Las rutas autofágica-lisosomal se encuentran alteradas en los nervios TrJ y responden al tratamiento incrementando su flujo en ambos genotipos.

El incremento en la intensidad de LC3 en el genotipo TrJ en condiciones AL observado en nuestros análisis, coincide con resultados previos donde se indica que la presencia de desmielinización y proteínas dañadas en agregados, induciría la aparición de autofagosomas rodeando estas estructuras (Notterpek *et al.*, 1997). Complementando esta información, se han observado perfiles autofágicos numerosos en los nervios TrJ (Fortun *et al.*, 2003). Asimismo, CS de otros modelos murinos con alteraciones genéticas en PMP22 (C22, sobreexpresión del gen) muestra una elevada inmunoreactividad para Atg7 (proteína que participa en la formación del autofagosoma) y en algunos casos colocalización con los agregados de PMP22 (Robertson *et al.*, 1999).

A pesar de encontrar LC3 incrementada en TrJ, no se observaron diferencias significativas entre los genotipos en condiciones AL en la marcación para LAMP1. Esto podría indicar un tránsito de la ruta autofágica lisosomal defectivo en el genotipo TrJ (en la figura 6.2 se observa como es el flujo normal de la ruta autofágica-lisosomal, así como lo que podría estar sucediendo en nuestro modelo experimental). El incremento en LC3 no correlacionado con un incremento de LAMP1 en TrJ podría estar evidenciando a nivel

celular un aumento de la cantidad de autofagosomas, los cuales no podrían ser degradados por mecanismos que desconocemos actualmente y que no ha sido reportados por otros investigadores.

En desacuerdo con nuestros resultados, otros trabajos muestran un incremento de este marcador lisosomal en homogeneizados de nervios TrJ respecto a los wt, así como en C22 (Notterpek *et al.*, 1997; Fortun *et al.*, 2006). En nuestra opinión estas diferencias podrían deberse, al menos parcialmente, a la metodología utilizada, dado que en la homogeneización de los nervios entran otros dominios celulares y otras células (axón), diferentes a las regiones específicas que hemos analizado nosotros.

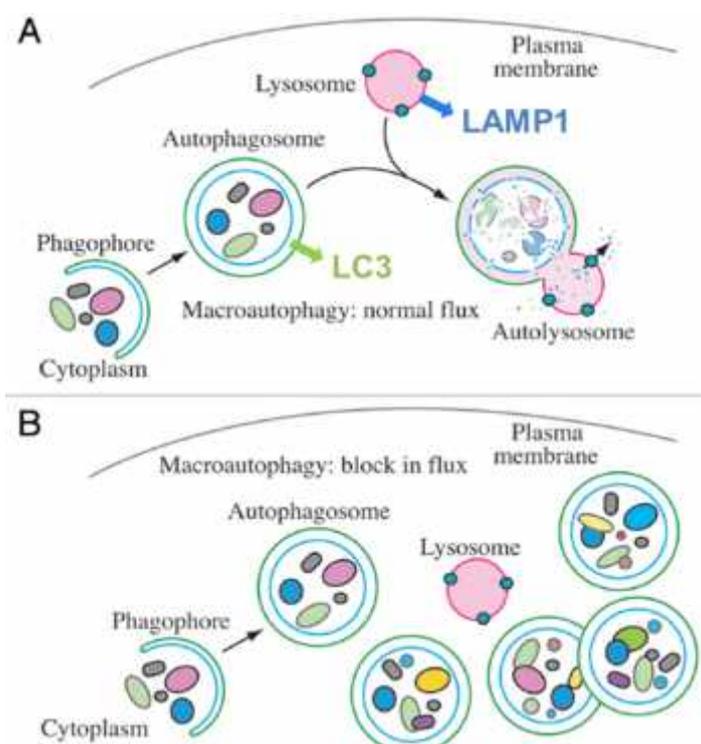


Figura 6.1. Modelo esquemático mostrando la inducción de la formación del autofagosoma cuando hay un flujo normal en la macroautofagia (A). Se muestran además las vesículas intermedias aclarando que intermediario indica cada marcador utilizado. Así mismo, en (B) se muestra que sucede cuando el flujo está bloqueado o es limitado, lo que resulta en el incremento del número de autofagosomas. Figura tomada y modificada de Klionsky *et al.*, 2012.

A pesar del aumento observado a nivel basal en LC3 de CS TrJ, se ha observado que la activación de la ruta autofágica-lisosomal en nervios adultos neuropáticos es incapaz de degradar todos los agregados, los cuales tarde o temprano terminarían acumulándose (Fortun *et al.*, 2003). Por este motivo potenciar aún más esta respuesta puede hacer la diferencia. Esta activación basal presente en los nervios TrJ puede explicar por qué en respuesta a RC la intensidad de LC3 TrJ no se incrementa tanto como la wt. A diferencia

de esto la respuesta lisosomal es más robusta en los TrJ, los cuales en condiciones basales presentan igual intensidad que los wt.

No se observaron diferencias genotípicas en cuanto a la cantidad de núcleos inmunomarcados para ambos marcadores. Dado que la respuesta al tratamiento de RC es sistémica e incluye a todas las células, se esperaba obtener un aumento en la cantidad de núcleos LC3 y LAMP+. Creemos que la discrepancia entre estos resultados y los esperados, al igual que en la cuantificación anterior para núcleos PMP22+, pueden ser consecuencia de un criterio muy estricto a la hora de definir los núcleos positivos para la señal de cada uno de los anticuerpos.

La marcación para ribosomas es mayor en el genotipo wt respecto al TrJ en condiciones AL. La disminución en los niveles de intensidad de ribosomas en nervios TrJ, podría relacionarse con la mayor intensidad de LC3, debido a que el aumento en la autofagia reduce los niveles de ribosomas (Cebollero *et al.*, 2013). En respuesta al tratamiento de RC hay una drástica disminución de la cantidad de Ribosomas en ambos genotipos. La ribofagia que ocurre como consecuencia de la privación de nutrientes es un hecho frecuente. Puede ocurrir de forma selectiva o como consecuencia del secuestro de un cargo citoplasmático donde azarosamente se encuentren ribosomas. La importancia de la degradación de los ribosomas durante la restricción de nutrientes radica en generar una disminución en la traducción proteica, proceso celular que consume grandes cantidades de energía (Cebollero *et al.*, 2013). A un nivel más general todos los procesos catabólicos se ven favorecidos frente a los procesos anabólicos. Adicionalmente, el hecho de que los ribosomas constituyan la mitad de la masa proteica celular, lleva a que la degradación de estos, represente una de las mayores fuentes de AA durante los tiempos de restricción (Warner, 1999).

Las disminuciones en la intensidad de PMP22 desenmascarada y sin desenmascarar, vimentina y ribosomas asociadas al incremento en LC3 y LAMP1 sugieren un incremento notorio de la ruta autofágica-lisosomal en las CS de ambos genotipos en RC y una disminución de los agregados de PMP22. A pesar de ello debemos considerar también que la disminución en la síntesis proteica consecuencia de la RC podría estar repercutiendo en los resultados, influyendo por lo menos en la cantidad de PMP22 citoplasmática (sin desenmascarar).

Finalizando esta sección queremos mencionar que idealmente, para realizar un monitoreo correcto de los sustratos autofágicos sería necesario lograr monitorear la dinámica del proceso autofágico y verificar cuales sustratos han llegado al lisosoma y cuales son degradados (Klionsky *et al.*, 2012). En nuestro caso no se pudo realizar una evaluación de este tipo debido a la naturaleza del diseño experimental, que implicaba la evaluación del tratamiento una vez finalizado este. Asimismo, estudios de colocalización entre PMP22, LAMP y LC3, podrían enriquecer y complementar nuestros resultados.

6.3 La cantidad de núcleos de CS en el genotipo TrJ es mayor que en wt y existe una tendencia a la disminución con el tratamiento.

Se estudió la relación núcleo/número de fibras, con el fin de tener una idea más precisa del exceso de núcleos en el genotipo TrJ. Los resultados indicaron que el genotipo TrJ presenta 3 veces más núcleos por fibra que los wt. Este resultado concuerda con resultados previamente reportados, donde se menciona la presencia excesiva de núcleos de CS en nervios TrJ a causa de la proliferación excesiva de sus CS (Henry *et al.*, 1983; Li *et al.*, 2013a). Esto tiene una explicación biológica que radica en que los nervios desmielinizados las CS pierden contacto con el axón y presentan la capacidad de desdiferenciarse y proliferar para posteriormente volver a intentar remielinizar el axón (Jessen & Mirsky, 2005; Notterpek & Tolwani, 1999; Atanasoski *et al.*, 2002). En respuesta al tratamiento de RC los nervios TrJ pasan a tener una relación entre núcleo/fibra 2 veces mayor que los wt, por lo cual observamos una tendencia a la baja en esta relación. Estudios de RC en CS tomadas de ratones de diferentes edades, muestran que la restricción dietaria mantiene el fenotipo diferenciado de las CS, lo cual resulta en un efecto beneficioso para el mantenimiento estructural axonal y mielínico que preservaría la arquitectura funcional de la fibra nerviosa (Rangaraju *et al.*, 2008).

Otros parámetros medidos fueron las dimensiones de los núcleos, donde no se hallaron diferencias significativas importantes ni entre genotipos, ni entre tratamientos.

6.4 La citoarquitectura de la fibra nerviosa es genotipo específico y modulable por el tratamiento de RC.

Como ya hemos mencionado, las CS proveen soporte para la integridad funcional de los axones mielínicos, regulando su citoesqueleto, su contenido de organelos, los índices de transporte axonal, entre otros. Bajo condiciones de desmielinización, como ocurre en los nervios TrJ, alteraciones en las proteínas estructurales tanto del axón como de la mielina son efectos esperados. En la figura 6.4 se resumen los principales resultados encontrados a nivel del citoesqueleto en condiciones AL y RC.

Tratamientos /Componentes del citoesqueleto	AL	RC
Actina: F-actina	> densidad en ambos dominios (glial y axonal) de la fibra TrJ en comparación con la wt (en concordancia con Kun et al, 2012).	marcadas diferencias genotípicas, destacándose una disminución global en fibras wt junto a incremento glial y disminución axonal en las TrJ.
Tubulina: Relación Tub. Acetilada/ β Tubulina	la relación se muestra incrementada a nivel glial en ambos genotipos, presentando los TrJ una mayor acetilación en este dominio y similares valores a nivel axonal.	la relación muestra una disminución a nivel glial que es común a ambos genotipos y a nivel axonal un incremento en el wt.
Filamentos Intermedios: Nurofilamento 68	los NF muestran una menor expresión axonal en TrJ.	los NF no parecen responder al tratamiento.

Figura 6.4.1. Resumen de los principales resultados encontrados en condiciones AL y RC para ambos genotipos. En condiciones AL las fibras TrJ presentan una citoarquitectura neurodegenerativa, en la que cada componente muestra una expresión específica y determinan una citoarquitectura asociada al genotipo TrJ. El citoesqueleto de la fibra responde al tratamiento de RC con respuestas específicas diferentes para cada elemento del citoesqueleto e incluso con respuestas dominio-específicas.

Así en condiciones AL y a nivel del citoesqueleto de microfilamentos observamos una mayor intensidad de microfilamentos polimerizados (F-actina) en los diferentes dominios de la fibra nerviosa (axonal y glial) TrJ en comparación con las wt. Estos resultados concuerdan con resultados previos publicados por nuestro grupo donde se observó una mayor intensidad en dominios gliales específicos (ISL y NR) de la fibra nerviosa periférica TrJ respecto a la wt (Kun *et al.*, 2012a). En condiciones AL, los niveles

mayores de F-actina en TrJ podrían explicarse parcialmente por la presencia del receptor tirosin-kinasa tipo C (TrkC) en nervios ciáticos TrJ adultos. Este último, se expresa en los nervios ciáticos en crecimiento de ratones wt en estadios de desarrollo, pero no se ha detectado en nervios adultos wt. TrkC induce la migración de las CS y a través de cascadas de señalización promueve la polimerización de actina en el desarrollo y bajo injurias (Liu *et al.*, 2007).

Asimismo, si bien los niveles de polimerización parecen ser equivalentes en los diferentes dominios de las fibras wt, las fibras TrJ cuentan con un citoesqueleto de microfilamentos mucho más denso a nivel axonal que a nivel glial. Estos resultados podrían ser consecuencia de un mecanismo estructural compensatorio que tienda a mantener la estructura en los nervios TrJ frente al proceso desmielinizante presente en estos nervios. Desde el punto de vista de la regulación de la expresión de los microfilamentos, el incremento en las cantidades de actina polimerizada observado puede deberse a: una mayor síntesis, a una menor degradación del polímero, o una combinación de ambos procesos. Estos análisis se están llevando a cabo por otra integrante de nuestro grupo (Lic. Karina Cal).

La respuesta al tratamiento de RC del citoesqueleto de actina es diferente para cada genotipo. Los ratones wt responden disminuyendo su intensidad en general (dominio glial y axonal). Los ratones TrJ incrementan su intensidad en dominios gliales y la disminuyen en el axón. Sin embargo, la relación intensidad de F-actina glía/axón es específica de cada genotipo en condiciones AL (diferenciándose por su incremento la relación TrJAL) y estas diferencias tienden a desaparecer bajo RC. Aquí la relación presenta un valor similar en ambos genotipos. En caso de que la hipótesis planteada previamente respecto al incremento de la densidad de F-actina a nivel axonal en TrJ con el fin de soportar la estructura fuese cierta, este mecanismo compensatorio estaría siendo menos utilizado en RC. Bajo RC se observa una disminución significativa de la intensidad a este nivel. Las vías por las cuales la restricción alimenticia aplicada, es capaz de influir en los niveles de F-actina de esta forma, son inciertas. Asimismo, la literatura respecto a la polimerización de los microfilamentos y la RC es escasa. Más adelante se plantea un posible mecanismo que podría estimular la polimerización de la actina a consecuencia de la RC.

Los filamentos intermedios fueron evaluados observando la intensidad del Neurofilamento 68 (Nf68). En condiciones AL hay una menor intensidad axonal en el

genotipo TrJ, lo que podría evidenciar una menor densidad en sus axones. Este perfil de densidad genotipo específico se mantiene con el tratamiento de RC donde la intensidad de Nf68 continúa siendo menor en los axones wt que en los TrJ. Estos resultados podrían estar relacionados con los procesos de desmielinización presentes en el genotipo TrJ, así como con sus alteradas relaciones axo-gliales. En acuerdo con esto, se ha observado que las alteraciones en el gen de *nefl* afectan el transporte axonal lento y rápido anterógrado, así como el transporte axonal retrógrado, perturbando la localización y el transporte de la mitocondria y causando la fragmentación del Golgi, llevando a la neurodegeneración (Perez-Olle *et al.*, 2002; Brownlees *et al.*, 2002). A pesar de no haber logrado una cuantificación comparable de este marcador en los diferentes tratamientos, el impedimento en la comparación indicaría una disminución en su intensidad. Sin embargo, el perfil genotípico específico a nivel axonal no se modificó con la RC. A este nivel el tratamiento no parece haber tenido efecto.

A pesar de que los Nf en principio se creían marcadores exclusivamente axonales, nuestro grupo ha encontrado su expresión a nivel glial tanto en condiciones normales como en el modelo TrJ. En estos últimos además se ha observado acumulación de la proteína en dominios perinucleares de la CS así como de su mensajero (Kun *et al.*, 2012b). En este sentido el perfil de intensidad de Nf68 en condiciones AL (mayor en TrJ que en wt a nivel glial) cambia con la RC homogeneizando los niveles en ambos genotipos, por lo cual el tratamiento tendría distintas repuestas en los diferentes dominios de la fibra nerviosa. Los mecanismos por los cuales la RC logra nivelar estos resultados aún los desconocemos.

A nivel de los microtúbulos (MT), nuestros análisis se han focalizado en observar la estructuración de estos últimos, utilizando la relación Tubulina Acetilada/ α -tubulina. La acetilación de α -tubulina en la Lys40 es una modificación post-traduccional que regula la unión a kinesina y dineína, controlando así el transporte de proteínas y orgánulos dentro de la célula. Asimismo, existe controversia en cuanto al rol funcional de la acetilación de la α -Tubulina. A pesar de ello, se acepta que los MT acetilados representan una subpoblación de MT estables (Piperno *et al.*, 1987; Reed *et al.*, 2006; Sadoul *et al.*, 2012), aunque la acetilación de la tubulina por sí misma no promueve la estabilidad de los MT (Westermann *et al.*, 2003).

Nuestros resultados en condiciones AL indican mayores niveles de acetilación de la tubulina a nivel glial que axonal en ambos genotipos, presentando las CS TrJ niveles

significativamente mayores que las wt. Nuestra interpretación de los resultados es limitada debido a la poca información concerniente a la acetilación de los MT en las CS, sin embargo estos resultados nos permiten sugerir la presencia de MT hiper-acetilados a nivel glial (si comparamos con la acetilación a nivel axonal) en condiciones AL. Estos resultados hacen acuerdo con los resultados previos donde se indican mayores niveles de autofagia en el genotipo TrJ. Los incrementos en la acetilación de la tubulina durante la inducción de la autofagia son explicados por la pérdida de la inhibición de la α -tubulina-N-acetyltransferasa 1 (α -TAT1), lo cual genera una hiper-acetilación de la tubulina en respuesta a la limitación de nutrientes (Madeo et al., 2014). Otra hipótesis posible podría ser que la impronta de la dinámica estructural del citoesqueleto de MT obedece a intensa actividad celular de ésta célula gigante, involucrada en el mantenimiento mielínico y axonal. Adicionalmente habría que considerar que en las CS TrJ la estabilización de los MT podría contribuir compensando estructuralmente a la fibra, de la disminución mielínica, tal como planteamos ocurriría a nivel axonal con los filamentos de actina. Los mecanismos celulares que llevarían a esta hiper-acetilación son en nuestro caso todavía desconocidos. A pesar de ello, parecen dejar en evidencia un desplazamiento del equilibrio acetilación/desacetilación en favor de la acetilación. El incremento en la acetilación puede ser resultado de una mayor acetilación (Tubulina acetil transferasa, TAT), menor desacetilación (Histona desacetilasa 6, HDAC6 e Histona desacetilasa 2 Sirt2) o ambos procesos. Así, una menor actividad desacetilasa de HDAC6 en estas células podría también contribuir a la interpretación de nuestros resultados. En efecto, otros autores han señalado que HDAC6 actúa desacetilando α -tubulina y cortactina, entre otros sustratos. Como consecuencia de la inhibición de la actividad desacetilasa, se promueve la estabilización de los MT y se favorece la actividad de la cortactina interactuando con los filamentos de actina y promoviendo su polimerización (Li *et al.*, 2013b).

Al mismo tiempo, existe una explicación alternativa y/o complementaria que también involucra HDAC6. Esta enzima además de su actividad desacetilasa, presenta una función en el transporte de proteínas ubiquitinizadas hacia el agresoma. Funciona de esta forma, como un puente entre las dineínas y las moléculas poliubiquitinizadas (Hyttinen *et al.*, 2014) (Figura 2). Tanto los eventos de formación de agresomas como la autofagia misma, requieren de un citoesqueleto de MT estable sobre el cual ocurra el tráfico de pequeños agregados y lisosomas, hacia dominios perinucleares mediante el transporte retrogrado mediado por dineínas (Iwata *et al.*, 2005; Ryhanen *et al.*, 2011; Hyttinen *et al.*, 2014). Como ya hemos visto, las CS TrJ presentan agregados proteicos y una autofagia AL espontáneamente activada, por este motivo HDAC6 podría estar participando del tráfico de los multímetros o pequeños agregados (poliubiquitinizados), función que requiere un

citoesqueleto de MT estable. En este sentido el estudio de esta desacetilasa en las CS podría constituir un interesante abordaje para complementar y explicar los resultados obtenidos.

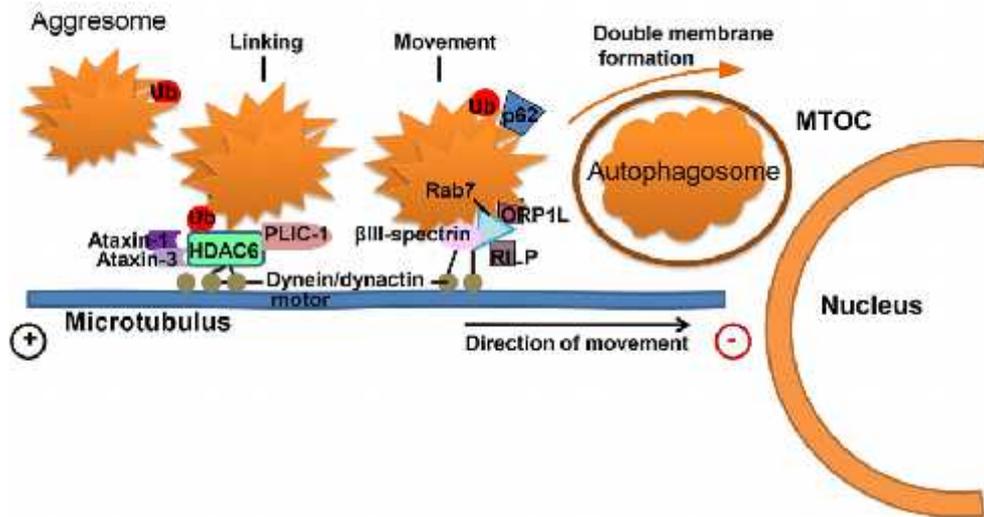


Figura 6.2. HDAC6 funciona como el puente entre los sustratos poliubiquitinizados y el motor molecular dineína, a las cuales se une y mediante su movimiento hacia el extremo menos (perinuclear) logra llevar los sustratos hacia el agresoma. Figura tomada de Hyttinen *et al.*, 2014

Resultado de la RC, el citoesqueleto de los MT se remodela, disminuyendo los niveles de acetilación a nivel glial en ambos genotipos, a niveles similares a los observados en condiciones AL a nivel axonal. Los mecanismos por los cuales la RC actúa a este nivel sobre la fibra nerviosa periférica son desconocidos, pero a consecuencia del aumento de la autofagia hubiéramos esperado un incremento en la acetilación no observado. A pesar de que en nuestro modelo se ha postula la RC como un instrumento que permite la potenciación autofágica mediante el secuestro o inhibición de mTOR (Rangaraju *et al.*, 2008; Madorsky *et al.*, 2009), también se ha reconocido que en condiciones de privación de nutrientes, se estimula la actividad del grupo de las histonas desacetilasas (SIRTs), dentro de las cuales se encuentra Sirt2. El hecho de la activación de Sirt2 podría explicar los resultados antes mencionados, ya que la estimulación de la actividad desacetilasa de estas enzimas actuaría sobre los microtúbulos desacetilándolos, sin embargo la actividad y presencia de esta enzima deberá ser estudiada para confirmar la hipótesis. Adicionalmente la actividad desacetilasa de HDAC6 podría verse incrementada, así como su actividad de puente entre multímeros poliubiquitinizados y la dineína, con el fin de que ocurra la degradación de los agregados y la fusión

autofagosoma-lisosoma. Profundizar en la respuesta a estos resultados estudiando enzimas acetilasas y desacetilasas de los MT, puede brindar información específica sobre cuál es el mecanismo que estaría mediando los efectos de la RC en la re-estructuración de la fibra nerviosa.

6.5 La morfología y estructura de las fibras mielínicas de ambos genotipos AL responden a la RC, incrementando su grosor y confirmando la activación de la ruta autofágica-lisosomal.

En los nervios periféricos mixtos, tal como el nervio ciático, axones sensoriales y motores están rodeados por mielina presentando diámetros que varían entre 1-30 μm (Suderland, 1968). En nuestros estudios se intentó abarcar ese espectro de diámetros encontrándose en los nervios wt una población de fibras diferente a la TrJ. Mientras el genotipo wt presenta dos subpoblaciones marcadas, los TrJ presentan sobre todo disminución en las fibras de calibres medios y grandes, con excepción de los tamaños mayores a 22 μm de diámetro. Esto podría ser una respuesta de las fibras para no disminuir su VCN o representar axones degenerando.

Las diferencias en el grosor y estructura mielínica entre ambos genotipos en condiciones AL así como la menor densidad mielínica en los nervios TrJ son evidentes. El adelgazamiento mielínico de las fibras TrJ queda de manifiesto con su mayor valor de factor g, así como el de su menor área mielínica. Los cambios histopatológicos de los nervios TrJ reportados previamente incluyen atrofia de fibras nerviosas, mielinas delgadas y una lámina basal laxa (Henry *et al.*, 1983). Estos reportes coinciden parcialmente con nuestros resultados y adicionalmente, concuerdan también con los signos clínicos observados en pacientes CMT1E (Li *et al.*, 2013a).

Los incrementos del grosor mielínico y densidad de fibras mielínicas TrJ bajo RC, repercuten en un mejor funcionamiento de la fibra nerviosa. El incremento en el grosor mielínico se relaciona con la eficiencia en la conducción del PA en la fibra nerviosa, por lo cual estas mejoras estructurales tienen consecuencias directas sobre la funcionalidad. Estos resultados además concuerdan con una tendencia a la recuperación motora de los ratones TrJ observadas previamente en mi tesis de grado (<http://www.bib.fcien.edu.uy/files/etd/pasan/uy24-15528.pdf>).

Por otro lado la observación del corrimiento del histograma de frecuencia de fibras mielínicas TrJ hacia valores de diámetros menores coincide con la observación de que los ratones que son sometidos a tratamientos de restricciones en su dieta presentan órganos y tejidos más pequeños que los de ratones AL (Weindruch & Sohal, 1997). A pesar de esta disminución en el tamaño, las fibras TrJ bajo RC muestran un proceso de recuperación de la mielinización, como ya hemos mencionado.

Los análisis de la ultraestructura permiten confirmar los resultados de la microscopía confocal y óptica. Creemos que en este sentido un análisis más profundo e incluso semi-cuantitativo nos permitirá afirmar el incremento en la aparición de vesículas tipo autofágicas, desaparición de inclusiones citoplasmáticas de tamaños diversos así como, mejoras en la estructuración mielínica en ambos genotipos en respuesta al tratamiento de RC.

Las observaciones cualitativas obtenidas al momento mostraron la presencia en el genotipo TrJ en condiciones AL de estructuras densas alrededor de las fibras, así como vesículas en el citoplasma externo de las CS, que no fueron observadas con la misma frecuencia en el genotipo wt. Estas observaciones coinciden con lo encontrado por otros autores en nervios wt, donde estas estructuras están ausentes (Fortun *et al.*, 2006; Madorski *et al.*, 2009). Coincidente con las medidas y observaciones en los cortes semi-finos, la mielina se observó adelgazada en los TrJ. En respuesta al tratamiento de RC, se detectaron autofagosomas con una morfología heterogénea indicando diferentes grados de maduración así como la verificación de que el proceso autofágico está sucediendo. Estudios anteriores muestran como resultado de un tratamiento de ayuno intermitente, perfiles que incluyen vacuolas con membranas aisladas, dobles o múltiples membranas y autofagosomas maduros (Madorski *et al.*, 2009), los cuales coinciden parcialmente con nuestras observaciones. A pesar de la presencia de estas estructuras vacuolares, se observó así mismo la persistencia de agregados en el genotipo TrJ. La aparición de las hemi-incisuras con una alta frecuencia en el genotipo TrJ, pero también en menor proporción en el wt, podría ser un signo indicador de fenómenos de remielinización ya observados en períodos embrionarios y de regeneración nerviosa (Ghabriel & Allt, 1979; Ghabriel & Allt, 1980).

6.6 La RC como herramienta terapéutica

La capacidad celular para prevenir la acumulación de proteínas en agregados va decayendo con el envejecimiento celular, lo cual facilita el desarrollo de las diferentes enfermedades neurodegenerativas. Así, la presencia de agregados proteicos intracelulares es un sello celular de una amplia variedad de desórdenes neurológicos incluyendo las taupatías, sinucleopatías, entre otros, dentro de los cuales se incluye CMT1E. En el estudio de una terapia para esta última se ha focalizado esta tesis.

En respuesta a la presencia de proteínas dañadas o desnaturalizadas, primariamente las células acuden al sistema de las chaperonas, las cuales tienden a normalizar los daños proteicos inducidos y prevenir la formación de agregados. Seguido a esto, si este proceso de reparación no es exitoso, el sistema Ub-proteasoma tomará el control para degradar las proteínas dañadas. Si ambos mecanismos fallan, entonces se induce la agregación proteica, la cual se ve acompañada espontáneamente de la presencia de autofagosomas, como indicador de una consecuente macroautofagia. Adicionalmente otros tipos de autofagia como la mediada por chaperonas y LAMP2 podrían verse inducidas. De esta forma, las patologías antes mencionadas que confluyen en la formación de agregados, son objeto de fallas en los sistemas de degradación anteriormente mencionados.

A pesar de que la relación entre la agregación y la patogénesis no resulta evidente, varios estudios han demostrado que la eliminación de los mismos permite la reversión sintomática, aliviando la disfunción celular y potenciando la recuperación en los diferentes desordenes neurodegenerativos (Yamamoto & Simonsen, 2011). En particular en el SNP, la pérdida mielínica asociada al envejecimiento de los nervios y el organismo, se correlaciona con la pérdida de funcionalidad del SNP. Asimismo, tanto la pérdida mielínica como el decaimiento de las defensas celulares contra la acumulación proteica, se ven exacerbadas en CMT1E. En esta neuropatía periférica crónica los mecanismos de reparación celular están continuamente activados intentando re-establecer el equilibrio funcional de la fibra nerviosa.

En este sentido se ha reportado que intervenciones en la dieta disminuyen la pérdida axonal, mostrando efectos benéficos en la arquitectura de las fibras mielínicas que incluyen la expresión y localización de proteínas tanto gliales como axonales, preservando así el desempeño locomotor (Rangaraju *et al.*, 2008; Madorsky *et al.*, 2009).

Nuestros resultados confirman y complementan lo antes mencionado, revelando que la implementación de un tratamiento leve de RC en fibras nerviosas periféricas atenúa significativamente el fenotipo neurodegenerativo del modelo TrJ. Si bien se observó una sensibilidad mayor al tratamiento en los ratones TrJ (ver Tesis de grado Bresque 2012), estos resultados se acompañan de una tendencia a una mejor performance locomotora. Esta mejora funcional podría estar asociada a los cambios morfológicos que presentaron las fibras periféricas, incluyendo disminución de los agregados proteicos, incrementos de la ruta autofágica-lisosomal, tendencia a la diferenciación de las CS de los nervios TrJ, remodelación de la citoarquitectura glial y axonal, incrementos en la densidad de fibras mielínicas, grosor mielínico, mejor estructuración de la vaina, entre otros.

Al momento, las terapias que existen para el tratamiento de las neuropatías CMT se distinguen entre aproximaciones terapéuticas que tratan la causa primaria de la patología (por ejemplo corrigen la expresión del gen mutante) de aquellas en las que el foco se hace en el camino patológico final de los trastornos CMT, fomentando la neuroprotección. Así, se utilizan como herramientas terapéuticas los antagonistas de progesteronas, la vitamina C, las neurotrofinas y la eritropoyetina (EPO) Alternativamente, tomando en cuenta los beneficios que se le otorgan al potenciamiento de la autofagia en la prevención y cura de los procesos neurodegenerativos centrales y periféricos, los investigadores y las compañías farmacéuticas se han abocado activamente en la obtención de diferentes aproximaciones para inducir la autofagia (Nave *et al.*, 2007).

En contrapartida a esto, los tratamientos de restricciones en la dieta constituyen un grupo de tratamientos simples, sanos y no costosos para regular la autofagia sistémicamente en la mayoría de los tejidos. Beneficios adicionales en la salud general, se han asociado al tratamiento de RC, tales como la extensión de la vida y la protección contra enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer así como otras enfermedades neurodegenerativas (McCay *et al.*, 1935; Weindruch & Walford, 1988; Colman *et al.*, 2009). Nuestros resultados y los resultados del ayuno intermitente en el SNP, indican que los cambios nutricionales pueden afectar profundamente la estructura de la fibra nerviosa, logrando beneficios que no solo incluyen este sistema, sino que repercuten sobre todo el organismo.

6.7 Conclusiones finales y perspectivas

1.- El tráfico de la proteína PMP22 se ve alterado en el genotipo TrJ, lo cual es puesto de manifiesto mediante la formación de agregados e intermediarios oligoméricos citoplasmáticos. Éstos fueron evaluados mediante microscopía confocal cuantitativa donde se observaron incrementados. La RC actúa disminuyendo la presencia de la proteína a ambos niveles. Estos estudios podrían complementarse mediante WB evaluando fracciones insolubles de la disgregación de nervios periféricos. Asimismo, se podrían explorar distintos tiempos de tratamientos con AF que permitan evaluar formas intermedias de agregación, que no han sido considerados en este estudio.

2.- La ruta autofágica-lisosomal se ve alterada en el genotipo TrJ, indicando un incremento en la presencia de autofagosomas que no parece verse acompañada de un incremento a nivel de lisosomas. Apoyando este incremento se observa también una disminución en el contenido de ribosomas. Estudios bioquímicos, evaluación de otros marcadores tales como mTOR, LAMP2, catepsina D, entre otros, reafirmarían estas observaciones. Asimismo, la realización de estudios que permitieran ver degradación de PMP22 in vivo e incluso estudios de colocalización podrían reforzar estos análisis.

3.- Las disminuciones en la intensidad de PMP22 desenmascarada y sin desenmascarar, junto a las de vimentina y ribosomas asociadas al incremento en LC3 y LAMP1 sugieren un incremento notorio de la ruta autofágica-lisosomal en las CS de ambos genotipos en RC y una disminución de los agregados de PMP22. Los mismos experimentos propuestos anteriormente podrían complementar estos análisis.

4.- El número de núcleos por fibra es una constante asociada al genotipo que disminuye levemente en el genotipo TrJ bajo RC. Análisis de la cantidad de CS proliferantes y apoptóticas mediante la utilización de marcadores específicos podrían ayudar a complementar estos resultados.

5.- El citoesqueleto del genotipo TrJ se ve profundamente influenciado por los procesos neurodegenerativos que influyen a cada uno de sus componentes afectando diferencialmente a cada uno de los dominios de la fibra nerviosa periférica. El citoesqueleto de la fibra responde al tratamiento de RC con respuestas específicas diferentes para cada elemento del citoesqueleto e incluso con respuestas dominio-específicas. Los mecanismos y las vías por las cuales la disponibilidad energética incide

sobre los diferentes componentes del citoesqueleto difieren en función del contexto genético. Análisis bioquímicos, el análisis de proteínas motoras, estudios con estabilizadores y desestabilizadores, así como con enzimas que modifiquen post-traduccionalmente a los componentes del citoesqueleto mencionados, podrían ser útiles para la comprensión y profundización de estos resultados.

6.- La estructura de las fibras TrJ se asocian a hipo-mielinización y lámina basal redundante, así como presencia de agregados en las CS y frecuentes estructuras vacuolares. Todos estos parámetros fueron confirmados. En respuesta al tratamiento de RC, todos estos parámetros cambian, observándose principalmente incrementos en el grosor mielínico, indicadores de remielinización junto a autofagosomas en diferentes estados de maduración. Para mejorar estos resultados el incremento mielínico se podría confirmar haciendo fraccionamiento subcelular y evaluación de proteínas mielínicas en fracciones enriquecidas en mielina, separación de estructuras insolubles para evaluar agregados, y análisis cuantitativos mediante MET.

ANEXO I: Rutas de re plegamiento y degradación celular.

La expresión, plegamiento, función y degradación proteica son procesos estrictamente regulados en pos de la homeostasis celular. Cuando este equilibrio se desplaza, la acumulación de proteínas en agregosomas es un hecho frecuente que ofrece las condiciones apropiadas para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, que en algunos casos son llamadas proteinopatías o agregopatías (Sherman & Goldberg, 2001; Zerovnik, 2010).

Las proteínas mal plegadas o agregadas son generalmente asistidas por **chaperonas**, tales como **HSPs** (Hsp27, Hsp40, Hsp60, Hsp70, Hsp90, etc) así como por complejos de chaperonas que típicamente incrementan la eficiencia o la velocidad de plegamiento, estabilizando regiones particulares y previniendo interacciones no específicas, reduciendo así la probabilidad de agregación (Hytinen *et al.*, 2014).

Si aún así, el plegamiento falla, entonces el péptido será destinado a la degradación mediante su marcaje con Ubiquitina (Ub). El **sistema Ubiquitina-proteasoma** y el sistema de chaperonas constituyen los mecanismos de defensa celular inicial contra la acumulación de proteínas mal plegadas. El proteasoma es un complejo multi-catalítico de 26S que permite la degradación de proteínas (Goldberg, 2003). Su estructura es similar a la de un barril, estando formada por un núcleo catalítico 20S y dos subunidades reguladores 19S en la parte superior e inferior. Estas últimas presentan múltiples sitios que reconocen los sustratos ubiquitinizados, moviéndolos hacia el núcleo del barril para su degradación. Para ser destinadas al complejo proteasomal, las proteínas deben sufrir una modificación post-traduccional de ubiquitinación que es producto de una cascada secuencial de reacciones enzimáticas que incluyen activadores, enzimas conjugadas y ligasas (Komander & Rape, 2012). En la figura 1 se muestra como ocurre el proceso de ubiquitinación. Consecuencia de esta cascada, la Ub, polipéptido de 76AA, se une covalentemente a sustratos que serán reconocidos por el proteasoma.

El sistema Ub-proteasoma degrada entre el 80-90% de las proteínas incluyendo proteínas de vida corta, anormales, desnaturalizadas y/o dañadas. El producto final de degradación consiste en pequeños péptidos (3-25AA) que posteriormente serán degradados por peptidasas en AA para su reutilización (Lilienbaum, 2013).

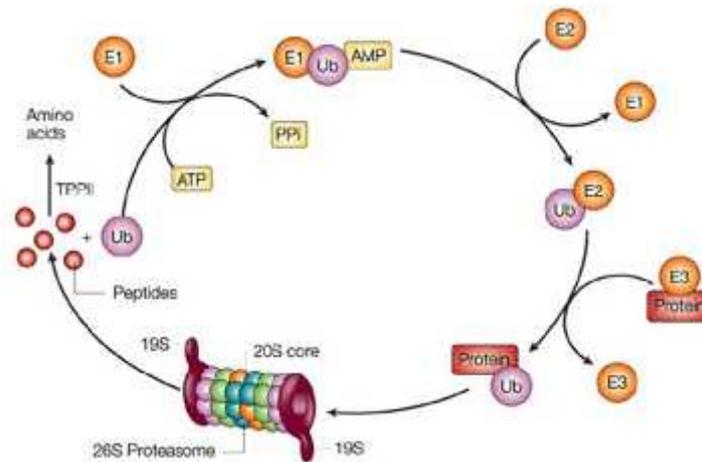


Figura 1. Sistema ubiquitín proteosoma (SUP). La unión covalente de la Ub al sustrato ocurre a través de la acción secuencial de tres enzimas E1, E2 y E3. Primero, la Ub es activada por E1 en un proceso que requiere ATP. El segundo paso consiste en transferir la Ub al centro activo del E1, con la liberación de AMP. Luego la Ub activada es transferida a E2 a través de una reacción de trans-tioesterificación. En el paso final, se requiere la actividad de enzimas ligasas E3 que se unen al sustrato y catalizan la transferencia de la Ub activada de E2 al sustrato a través de la formación de una unión isopeptídica covalente. Figura extraída de <http://slideplayer.us/slide/574582/>

Continuando con las rutas de degradación, si los sistemas anteriores fallan aún queda una ruta degradativa alternativa, **la autofagia**. Esta última, es un evento celular constitutivo que incluye múltiples pasos que van desde la degradación de diversos cargos citoplasmáticos celulares secuestrándolos en autofagosomas, hasta su subsecuente fusión con lisosomas (Klionsky & Emr, 2000). Esta respuesta está muy conservada entre especies y se activa ante diferentes estímulos.

La autofagia ha emergido en los últimos tiempos como un proceso celular crítico importante en la homeostasis metabólica permitiendo a las células remover y reciclar eficientemente los constituyentes celulares, así como prevenir la acumulación de proteínas y organelos dañados (Alirezai *et al.*, 2011). Además se ha catalogado como una ruta celular importante para la adaptación a condiciones de estrés (como la privación de nutrientes), donde mediante la catálisis de los productos de degradación generaría energía y bloques para la construcción o síntesis de nuevas moléculas (Cebollero *et al.*, 2012). Estudios recientes han mostrado que la autofagia en neuronas es un mecanismo protector que enlentece el avance de los desórdenes neurodegenerativos y su inhibición se asocia con la neurodegeneración (Martinez-Vicente & Cuervo, 2007).

Como ya hemos mencionado la autofagia puede ser utilizada para la limpieza de los componentes celulares y organelos defectuosos, removiendo las proteínas mal plegadas,

atacando los organismos infecciosos, procesando antígenos, suprimiendo tumores y controlando el crecimiento celular, entre otros (Figura 2).

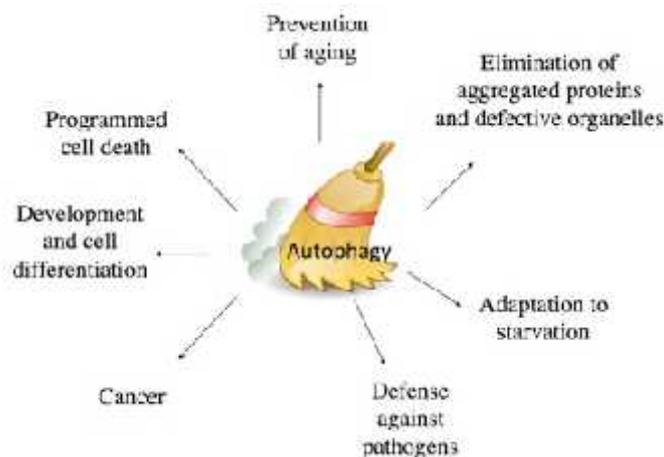


Figura 2. Diferentes roles celulares de la autofagia. Figura tomada de http://www2.iib.uam.es/rescalante_lab/Sitio_web/Investigacion.html

El sistema Ub-proteasoma y la autofagia tienen varios elementos de interacción, y parecen trabajar cooperativamente y complementariamente en la degradación y reciclaje celular (Lilienbaum, 2013).

La autofagia puede ser clasificada en 3 grandes grupos:

1. **Microautofagia**, mediante la cual la membrana del lisosoma forma pequeñas invaginaciones con material citoplasmático que es llevado dentro del lumen lisosomal donde es degradado.
2. **Autofagia mediada por chaperonas (CMA del inglés chaperone mediated autophagy)**, la cual implica la importación directa a través de un transportador de la membrana lisosomal de sustratos que contienen el motivo KFERQ y son reconocidas por un grupo específico de chaperonas.
3. **Macroautofagia**, proceso mediante el cual constituyentes citoplasmáticos pueden ser secuestrados en un compartimento delimitado por una doble membrana, autofagosoma. Este se fusiona posteriormente con el lisosoma donde se degrada su contenido o formará un anfisoma que se fusiona con vesículas de la ruta endocítica.

Generalmente cuando se habla de autofagia, mayormente nos estamos refiriendo a la macroautofagia. Los compartimentos autofágicos incluyen: el fagoforo que secuestra el cargo (pre-autofagosoma), el autofagosoma, el anfisoma (generado por la fusión del

autofagosoma con los endosomas) y el autolisosoma (generado por la fusión de autofagosoma o anfisoma con el lisosoma). En la figura 3 se muestran algunos de ellos.

La formación del autofagosoma es un proceso complejo y altamente regulado que requiere la presencia de varias proteínas relacionadas a la autofagia Atg (resultado de la expresión de los genes *Atg*, del inglés autophagy-related genes). Estas proteínas Atg forman complejos funcionales que median las principales etapas de la macroautofagia: nucleación, expansión y maduración (Figura 3).

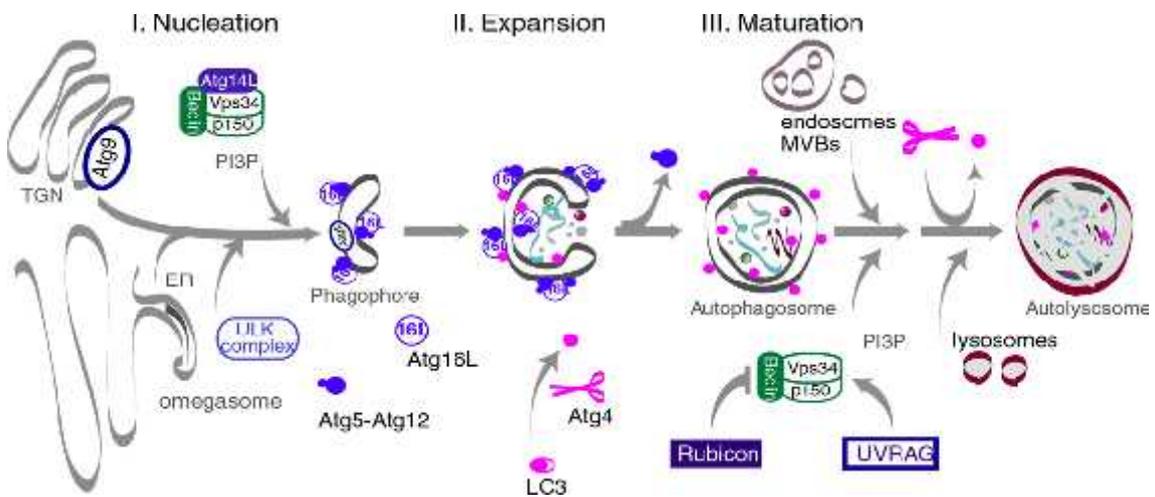


Figura 3. Resumen esquemático de la macroautofagia. Los pasos tempranos (nucleación y expansión) requieren las siguientes proteínas: complejo Atg1/unc-51 ULX, Vps34/ fosfatidilinositol-3-quinasa clase III (PI3K, del inglés) Complejo I, la proteína transmembrana Atg9 y su maquinaria cíclica asociada TGN y las 2 proteínas tipo Ubiquina Atg12 y LC3 (el homólogo mamífero de Atg8) y sus sistemas conjugados. La maduración de los autofagosomas involucra la fusión de diferentes compartimentos endocíticos (endosomas tempranos, cuerpos multi-vesiculares y endosomas tardíos) para formar anfisomas que contienen tanto el contenido del autofagosoma como el de endosomas. Alternativamente pueden fusionarse directamente con los lisosomas. Finalmente el material citoplasmático secuestrado será degradado resultando en macromoléculas recicladas que podrán ser reutilizadas por la célula.

El origen de la membrana del autofagosoma no está claro aún, sin embargo se cree que podría originarse tanto del retículo endoplasmático, como el Golgi y/o las mitocondrias (Reggiori, 2006). El mecanismo y regulación de la nucleación del autofagosoma aún no se ha comprendido completamente, pero al parecer la inhibición de mTOR es crítica para evocar la respuesta autofágica mediante la deprivación de nutrientes. En condiciones ricas de nutrientes, mTOR (serina/Treonina kinasa) fosforila el complejo ULK1 inhibiendo su función y previniendo la formación del autofagosomas. Cuando la actividad mTOR es

inhibida (mediante privación de nutrientes o Rapamicina) el complejo ULK se desfosforila activándose para la formación de las membranas autofágicas (Neufeueld, 2010; Yamamoto & Simonsen, 2011).

Si bien antes se pensaba que la macroautofagia inducida por la privación de nutrientes era un proceso no selectivo, estudios recientes han demostrado que puede ser un proceso selectivo mediante el secuestro de determinadas estructuras que van desde proteínas a organelos específicos en células de mamíferos (Olzmann, 2008; Cebollero *et al.*, 2011; Yamamoto & Simonsen, 2011). Los mecanismos involucrados en la selección de un cargo específico, constituyen un área de intenso estudio en la actualidad. Así, ha surgido una clasificación nueva dentro de la autofagia que incluye: **autofagia no selectiva y selectiva**. Durante la primera, un volumen de citoplasma que puede incluir organelos o no, es secuestrado dentro del autofagosoma. En el segundo, un cargo específico es exclusivamente rodeado autofagosomas, y este tiene un tamaño coincidente con el cargo y un menor contenido citoplasmático (Kraft *et al.*, 2009). Se ha postulado que los mecanismos implicados en la selectividad incluyen un receptor, que sería reconocido por el autofagosoma o reclutaría la maquinaria Atg. Por otro lado, también se ha postulado que la Ub podría funcionar como una molécula de señalización para alguno tipo de autofagia selectiva en eucariotas superiores (Kraft *et al.*, 2010).

Algunos ejemplos de la autofagia selectiva lo constituye la degradación selectiva de los agregomas o agregosomas, conocida como **agrefagia o agregofagia**, la cual estaría dada por la presencia del receptor p62 junto a la proteína adaptadora Alfy (Yamamoto & Simonsen, 2011). Otro es la **ribofagia**, la cual se cree que ocurre antes que otros procesos selectivos y estaría dada por la presencia de Ubp3 y su cofactor Bre5 (Kraft *et al.*, 2008), aunque también se ha visto que Ubp3 influencia la ubiquitinación de Atg19 (Baxter *et al.*, 2005).

7. Referencias

A

Abe I, Ochiai N, Ichimura H, Tsujino A, Sun J, Hara Y. 2004. Internodes can nearly double in length with gradual elongation of the adult rat sciatic nerve. *J Orthop Res.* 22(3):571-7.

Ahmed Z, Brown RA. 1999. Adhesion, alignment, and migration of cultured Schwann cells on ultrathin fibronectin fibres. *Cell Motil Cytoskeleton.* 42(4):331-43.

Albrecht DE, Sherman DL, Brophy PJ, Froehner SC. 2008. The ABCA1 cholesterol transporter associates with one of two distinct dystrophin-based scaffolds in Schwann cells. *Glia.*56:611–618.

Alirezaei M, Kemball CC, Whitton JL. 2011. Autophagy, inflammation and neurodegenerative disease. *Eur J Neurosci.* 33(2):197-204.

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

Attardi LD1, Reczek EE, Cosmas C, Demicco EG, McCurrach ME, Lowe SW, Jacks T. 2000. PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family. *Genes Dev.* 14(6):704-18.

B

Baron-Van Evercooren A, Kleinman HK, Seppä HE, Rentier B, Dubois-Dalcq M. 1982. Fibronectin promotes rat Schwann cell growth and motility. *J Cell Biol.* 93(1):211-6.

Baxter BK, Abeliovich H, Zhang X, Stirling AG, Burlingame AL, Goldfarb DS. 2005. Atg19p ubiquitination and the cytoplasm to vacuole trafficking pathway in yeast. *Journal of Biological Chemistry.* 280(47):39067–39076.

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

Birchmeier C, Nave KA. 2008. Neuregulin-1, a key axonal signal that drives Schwann cell growth and differentiation. *Glia.* 56(14):1491-7.

Bird TD. 2013 Charcot-Marie-Tooth Hereditary Neuropathy Overview. 1998 [Updated 2013]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, et al., editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK135>

Bradke F, Dotti CG. 1999. The role of local actin instability in axon formation. *Science,* 283:1931-1934.

Bremer J, O'Connor T, Tiberi C, Rehrauer H, Weis J, Aguzzi A. 2010. Ablation of Dicer from murine Schwann cells increases their proliferation while blocking myelination. *PLoS One.* 5(8):e12450.

Brownlees J, Ackerley S, Grierson AJ, Jacobsen NJ, Shea K, Anderton BH, Leigh PN, Shaw CE, Miller CC. 2002. Charcot-Marie-Tooth disease neurofilament mutations disrupt neurofilament assembly and axonal transport. *Hum Mol Genet.* 11(23):2837-44.

Bryan DJ, Litchfield CR, Manchio JV, Logvinenko T, Holway AH, Austin J, Summerhayes IC, Rieger-Christ KM. 2012. Spatiotemporal expression profiling of proteins in rat sciatic nerve regeneration using reverse phase protein arrays. *Proteome Sci.* 10: 9.

Buchberg AM1, Brownell E, Nagata S, Jenkins NA, Copeland NG. 1989. A comprehensive genetic map of murine chromosome 11 reveals extensive linkage conservation between mouse and human. *Genetics.* 122(1):153-61.

C

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

Cebollero E, Reggiori F, Kraft C. 2012. Reticulophagy and ribophagy: regulated degradation of protein production factories. *Int J Cell Biol.* 182834.

Chan JR, Jolicoeur C, Yamauchi J, Elliott J, Fawcett JP, Ng BK, Cayouette M. 2006. The Polarity Protein Par-3 Directly Interacts with p75NTR to Regulate Myelination. *Science.* 314 (5800):832-836.

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

Chen ZL, Strickland S. 2003. Laminin 1 is critical for Schwann cell differentiation, axon myelination, and regeneration in the peripheral nerve. *J Cell Biol.* 163(4):889–899.

Chernousov MA, Yu WM, Chen ZL, Carey DJ, Strickland S. 2008. Regulation of Schwann cell function by the extracellular matrix. *Glia.* 56(14):1498-507

Colman R, Anderson R, Johnson S, Kastman E, Kosmatka K, Beasley T, Allison D, Cruzen C, Simmons H, Kemnitz J, Weindruch R. 2009. Caloric Restriction Delays Disease Onset and Mortality in Rhesus Monkeys. *Science.* 325: 5937: 201-204

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

Cuervo AM, Bergamini E, Brunk UT, Dröge W, French M, Terman A. 2005. Autophagy and aging: the importance of maintaining "clean" cells. *Autophagy.* 1(3):131-40. Review.

D

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

F

Feltri ML1, Wrabetz L. 2005. Laminins and their receptors in Schwann cells and hereditary neuropathies. *J Peripher Nerv Syst.* 10(2):128-43.

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

Fortun J, Go JC, Li J, Amici SA, Dunn WA Jr, Notterpek L. 2006. Alterations in degradative pathways and protein aggregation in a neuropathy model based on PMP22 overexpression. *Neurobiol Dis.* 22(1):153-64.

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

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

G

Ghabriel, MN and Allt G. 1979. The role of Schmidt-Lanterman incisures in Wallerian degeneration. I. A quantitative teased fibre study. *Acta Neuropathol.* 48, 83-93.

Ghabriel, MN and Allt G. 1980. Schmidt-Lanterman incisures I. A light and electron microscopy study of remyelinating peripheral nerve fibres. *Acta Neuropathol.* 52, 85-95.

Ghabriel, MN and Allt G. 1987. Incisures of Schmidt-Lanterman, *Progress in Neurobiology* 17:25-58.

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

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

Gonzalez-Perez F, Udina E, Navarro X. 2013. Extracellular Matrix Components in Peripheral Nerve Regeneration. In Stefano Geuna, Isabelle Perroteau, Pierluigi Tos and Bruno Battiston, editors: *International Review of Neurobiology*, 108: 257-275.

H

Hall, S M and Williams PL. 1970. Studies on the “incisures” of Schmidt and Lanterman. *J. Cell Sci.* 6: 767-791.

Hasse B, Bosse F, Hanenberg H, Muller HW. 2004. Peripheral myelin protein 22 kDa and protein zero: domain specific transinteractions. *Mol Cell Neurosci* 27:370–378.

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

Hille B. 2001. *Ion channels of excitable membranes.* Sunderland, MA: Sinauer Associates. xviii, 814,

Hyttinen J, Amadio M, Viir J, Pascale A, Salminen A, Kaarniranta K. 2014. Clearance of misfolded and aggregated proteins by autophagy and implications for aggregation diseases. *Ageing Research Reviews* 18:16–28.

I

Iwata A, Riley BE, Johnston JA, Kopito RR. 2005. HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *J Biol Chem.* 280(48):40282-92.

J

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

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

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

Johnston JA1, Ward CL, Kopito RR. 1998. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol.* 143(7):1883-98.

K

Kidd GJ, Andrews SB, Trapp BD. 1994. Organization of microtubules in myelinating Schwann cells. *J Neurocytol.*23:801–810.

King R. 2013. Microscopic anatomy: normal structure. *Handb Clin Neurol.* Chapter2 .115: 7-27

Klionsky DJ, Emr SD. 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science.* 290(5497):1717-21.

Klionsky DJ et al., 2012. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy.* 8(4):445-544.

Komander, D., Rape, M., 2012. The ubiquitin code. *Annu. Rev. Biochem.* 81, 203–229.

Kopito, R.R., 2000. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol.* 10, 524–530.

Kraft C, Deplazes A, Sohrmann M, Peter M. 2008. Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nature Cell Biology*, 10(5):602–610.

Kraft C, Peter M, Hofmann K. 2010. Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nature Cell Biology.* 12(9): 836–841.

Kraft C, Reggiori F, Peter M. 2009. Selective types of autophagy in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1793(9):1404–1412.

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

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

Kun A, Rosso G, Canclini L, Bresque M, Romeo C, Cal K, Calliari A, Hanuz A, Sotelo-Silveira JR, Sotelo JR. 2012b. The Schwann Cell-Axon Link in Normal Condition or Neuro-Degenerative Diseases: An Immunocytochemical Approach. *Applications of Immunocytochemistry.* InTech. p.:249-266.

L

La Marca R, Cerri F, Horiuchi K, Bachi A, Feltri ML, Wrabetz L, Blobel CP, Quattrini A, Salzer JL, Taveggia C. 2011. TACE (ADAM17) inhibits Schwann cell myelination. *Nat Neurosci.* 14(7):857-65.

Lee HK, Seo IA, Park HK, Park YM, Ahn KJ, Yoo YH, Park HT. 2007. Nidogen is a prosurvival and promigratory factor for adult Schwann cells. *J Neurochem.* 102(3):686-98.

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

Li Y, Shin D, Kwon SH. 2013b. Histone deacetylase 6 plays a role as a distinct regulator of diverse cellular processes. *FEBS J.* 280(3):775-93.

Lilienbaum, A., 2013. Relationship between the proteasomal system and autophagy. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 4, 1–26.

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

Liu, N., Varma, S., Tsao, D., Shooter, E., Tolwani, R., 2007. Depleting endogenous neurothophin-3 enhances myelin formation in the Trembler-J mouse, a model of a peripheral neuropathy. *Jour. Neurosc. Res.* 85, 2863-2869.

M

Madeo F, Pietrocola F, Eisenberg T, Kroemer G. 2014. Caloric restriction mimetics: towards a molecular definition. *Nat Rev Drug Discov.* 13(10):727-40.

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

Maier M, Berger P and Suter U. 2002. Understanding Schwann cell–neurone interactions: The key to Charcot–Marie–Tooth disease? *J. Anat.* 200:357–366

Manfioletti G, Ruaro ME, Del SG, Philipson L, Schneider C. 1990. A growth arrest-specific (gas) gene codes for a membrane protein. *Mol Cell Biol* 10:2924–2930

Martinez-Vicente M, Cuervo AM. 2007. Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol.* 6:352–361.

Mathews GA, Ffrench-Constant C. 1995. Embryonic fibronectins are up-regulated following peripheral nerve injury in rats. *J Neurobiol.* 26(2):171-88.

McCay CM, Crowell MF, Maynard LA. 1935. The effect of retarded growth upon the length of life-span upon the ultimate body size. *J Nutr* 10:63–79. .

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

Merlini G1, Bellotti V, Andreola A, Palladini G, Obici L, Casarini S, Perfetti V. 2001. Protein aggregation. *Clin Chem Lab Med.* 39(11):1065-75.

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

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

N

Nattkämper H, Halfter H, Khazaei MR, Lohmann T, Gess B, Eisenacher M, Willscher E, Young P. 2009. Varying survival of motoneurons and activation of distinct molecular mechanism in response to altered peripheral myelin protein 22 gene dosage. *J Neurochem.* 110(3):935-46

Nave KA, Sereda MW, Ehrenreich H. 2007. Mechanisms of disease: inherited demyelinating neuropathies—from basic to clinical research. *Nature Reviews Neurology.* 3:453-464

Nave KA, Attardi LD, Reczek EE, Cosmas C, Demicco EG, McCurrach ME, Lowe SW, Jacks T. 2000. PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family. *Genes Dev.* 14(6):704-18.

Neufeld, T.P., 2010. TOR-dependent control of autophagy: biting the hand that feeds. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 157–168

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

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

Notterpek L, Shooter EM, Snipes GJ. 1997. Upregulation of the endosomal-lysosomal pathway in the trembler-J neuropathy. *J Neurosci.* 17(11):4190-200.

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

O

Oguievetskaia K, Cifuentes-Diaz C, Girault JA, Goutebroze L. 2006. Contacts cellulaires des fibres myélinisées du système nerveux périphérique, *Medicine/Science*, 21:162-9.

Ohsawa Y, Murakami T, Miyazaki Y, Shirabe T, Sunada Y. 2006. Peripheral myelin protein 22 is expressed in human central nervous system. *J Neurol Sci* 247:11–15

Olzmann, J.A., Li, L., Chin, L.S., 2008. Aggregate formation and neurodegenerative diseases: therapeutic implications. *Curr. Med. Chem.* 15, 47–60

P

Parmantier E, Cabon F, Braun C, D'Urso D, Muller HW, Zalc B. 1995. Peripheral myelin protein-22 is expressed in rat and mouse brain and spinal cord motoneurons. *Eur J Neurosci* 7:1080–1088

Parmantier E, Braun C, Thomas JL, Peyron F, Martinez S, Zalc B. 1997. *J Comp Neurol.* PMP-22 expression in the central nervous system of the embryonic mouse defines potential transverse segments and longitudinal columns. 378(2):159-72.

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

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

Pereira JA, Baumann R, Normén C, Somandin C, Mieke M, Jacob C, Lüthmann T, Hall-Bozic H, Mantei N, Meijer D, Suter U. 2010. Dicer in Schwann cells is required for myelination and axonal integrity. *J Neurosci.* 30(19):6763-75.

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

Perez-Olle R, Leung CL, Liem RK. 2002-.Effects of Charcot-Marie-Tooth-linked mutations of the neurofilament light subunit on intermediate filament formation. *Cell Sci.* 115(Pt 24):4937-46.

Piperno G, LeDizet M, Chang XJ. 1987. Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *J. Cell Biol.* 104:289–302.

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

Q

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

Quintes S, Goebbels S, Saher G, Schwab MH, Nave KA. 2010. Neuron-glia signaling and the protection of axon function by Schwann cells. *J PeripherNervSyst.* 15(1):10-6.

R

Ramón y Cajal, S. 1933. *Histology*. London: Bailliere, Tindall & Cox.

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

Rasi K, Hurskainen M, Kallio M, Stavén S, Sormunen R, Heape AM, Avila RL, Kirschner D, Muona A, Tolonen U, Tanila H, Huhtala P, Soininen R, Pihlajaniemi T. 2010. Lack of collagen XV impairs peripheral nerve maturation and, when combined with laminin-411 deficiency, leads to basement membrane abnormalities and sensorimotor dysfunction. *J Neurosci.* 30(43):14490-501.

Ravikumar B, Rubinsztein DC. 2004. Can autophagy protect against neurodegeneration caused by aggregate-prone proteins? *Neuroreport.* 15(16):2443-5. Review.

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

Reed NA, Cai D, Blasius TL, Jih GT, Meyhofer E, Gaertig J, Verhey KJ. 2006. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Current Biology.* 16:2166-2172.

Reggiori F. 2006. Membrane origin for autophagy. *Curr Top Dev Biol.*74:1-30.

Robertson AM, Huxley C, King RH, Thomas PK. 1999. Development of early postnatal peripheral nerve abnormalities in Trembler-J and PMP22 transgenic mice. *J Anat.* 3:331-9.

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.

Romero E, Cuisenaire O, Deneff JF, Delbeke J, Macq B, Veraart C. 2000. Automatic morphometry of nerve histological sections. *J Neurosci Methods.* 97(2):111-22.

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

Rosso G, Negreira C, Sotelo JR, Kun A. 2012. Myelinating and demyelinating phenotype of Trembler-J mouse (a model of Charcot-Marie-Tooth human disease) analyzed by atomic force microscopy and confocal microscopy. *J Mol Recognit.* 25(5):247-55.

Rosso G. 2008. Estudio molecular y morfológico en Sistema Nervioso Periférico proveniente de pacientes portadores de la neuropatía de origen genético Charcot-Marie-Tooth. Tesina de grado.

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* 474:578-588

Russo M, Laura M, Polke JM, Davis MB, Blake J, Brandner S, Hughes RA, Houlden H, Bennett DL, Lunn MP, Reilly MM. 2011. Variable phenotypes are associated with PMP22 missense mutations. *NeuromusculDisord.* 21:106-114

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

Ryhänen T, Viiri J, Hyttinen JM, Uusitalo H, Salminen A, Kaarniranta K. 2011. Influence of Hsp90 and HDAC inhibition and tubulin acetylation on perinuclear protein aggregation in human retinal pigment epithelial cells. *J Biomed Biotechnol.* 798052

S

Sadoul K, Wang J, Diagouraga B, Khochbin S. 2011. The tale of protein lysine acetylation in the cytoplasm. *J Biomed Biotechnol.* 2011:970382.

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

Saito F, Masaki T, Kamakura K, Anderson LV, Fujita S, Fukuta-Ohi H, Sunada Y, Shimizu T, Matsumura K. 1999. Characterization of the transmembrane molecular architecture of the dystroglycan complex in schwann cells. *J Biol Chem* 274:8240-8246.

Sakakura M, Hadziselimovic A, Wang Z, Schey KL, Sanders CR. 2011. Structural basis for the Trembler-J phenotype of Charcot-Marie-Tooth disease. *Structure.* 19(8):1160-9.

Sakisaka, T, Takai Y. 2004. Biology and pathology of nectins and nectinlike molecules. *Curr.Opin. Cell Biol.* 16:513-521.

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

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

Salzer, JL. 2003 Polarized domains of myelinated axons. *Neuron.* 40: 297-318.

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

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

Selsby JT1, Judge AR, Yimlamai T, Leeuwenburgh C, Dodd SL. 2005. Life long calorie restriction increases heat shock proteins and proteasome activity in soleus muscles of Fisher 344 rats. *Exp Gerontol.* 40(1-2):37-42.

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

Sherman DL, Fabrizi C, Gillespie CS, Brophy PJ. 2001. Specific disruption of a schwann cell dystrophin-related protein complex in a demyelinating neuropathy. *Neuron*. 30:677–687.

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

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

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

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

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

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

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

Spiegel I, Adamsky K, Eshed Y, Milo R, Sabanay H, Sarig-Nadir O, Horresh I, Scherer SS, Rasband MN, Peles E. 2007. A central role for Necl4 (SynCAM4) in Schwann cell-axon interaction and myelination. *Nat Neurosci*. 10(7):861-9.

Stiess M, Bradke F. 2011. Neuronal polarization: the cytoskeleton leads the way. *Dev Neurobiol*. 71(6):430-44.

Susuki K, Rasband MN. 2008. Molecular mechanisms of node of Ranvier formation. *Curr Opin Cell Biol*. 20(6):616-23.

Suter U, Moskow JJ, Welcher AA, Snipes GJ, Kosaras B, Sidman RL, Buchberg AM, Shooter EM. 1992. A leucine-to-proline mutation in the putative first transmembrane domain of the 22-kDa peripheral myelin protein in the trembler-J mouse. *Proc Natl Acad Sci*. 89(10):4382-6.

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

T

Taylor V, Zraggen C, Naef R, Suter U. 2000. Membrane topology of peripheral myelin protein 22. *J Neurosci Res* 62:15–27.

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

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

Trapp, B.D. 1990. The myelin-associated glycoprotein: location and potential functions. In *Myelination and Dysmyelination*. vol. 605. D. Colman, I.Duncan, and R. Skoff, editors. The New York Academy of Sciences, New York.29–43.

Trapp, BD.; Pfeiffer, S.; Kidd, G. 2004. *Cell biology of Myelin assembly*. Elsevier Academic Press

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.* 2(4):288-91.

vandeWetering RA, Gabreëls-Festen AA, Kremer H, Kalscheuer VM, Gabreëls FJ, Mariman EC.1999. Regulation and expression of the murine PMP22 gene. *Mamm Genome* 10:419–22.

W

Warner JR. 1999. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci.* 24(11):437-40.

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

Weindruch R1, Sohal RS. 1997. Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Caloric intake and aging. *N Engl J Med.* 337(14):986-94.

Weindruch RH, Walford RL. 1988. *The Retardation of Aging and Disease by Dietary Restriction* (Charles C. Thomas, Springfield, IL, 1988).

Welcher AA, De LM, Suter U, Snipes GJ, Meakin SO, Shooter EM. 1992. Isolation of transcriptionally regulated sequences associated with neuronal and non-neuronal cell interactions. *Prog Brain Res* 94:163–176

Westermann S, Weber K. 2003. Post-translational modifications regulate microtubule function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:938–947.

Witte H & Bradke F. 2008. The role of the cytoskeleton during neuronal polarization. *18(5):479–487*

Witte H, Neukirchen D, Bradke F. 2008. Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *J Cell Biol.*180:619-632.

Y

Yamada H, Denzer AJ, Hori H, Tanaka T, Anderson LV, Fujita S, Fukuta-Ohi H, Shimizu T, Ruegg MA, Matsumura K. 1996. Dystroglycan is a dual receptor for agrin and laminin-2 in Schwann cell membrane. *J Biol Chem.* 271:23418–23423.

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

Yamamoto A1, Simonsen A. 2011. The elimination of accumulated and aggregated proteins: a role for aggrephagy in neurodegeneration. *Neurobiol Dis.* 43(1):17-28.

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. 2005. Coordinate control of axon defasciculation and myelination by laminin-2 and -8. *J Cell Biol.* 168(4):655-66.

Yun B, Anderegg A, Menichella D, Wrabetz L, Feltri ML, Awatramani R. 2010. MicroRNA-deficient Schwann cells display congenital hypomyelination. *J Neurosci.* 30(22):7722-8.

Z

Zerovnik E. 2010. Protein conformational pathology in Alzheimer's and other neurodegenerative diseases; new targets for therapy. *Current Alzheimer research.* 7/1(74-83), 1875-5828.

Zhang J, Oswald TM, Lineaweaver WC, Chen Z, Zhang G, Chen Z, Zhang F. 2003. Enhancement of rat sciatic nerve regeneration by fibronectin and laminin through a silicone chamber. *J Reconstr Microsurg.* 19(7):467-472.

7. AGRADECIMIENTOS

Luego de varios meses de escritura y sobre todo de análisis de datos para la redacción de esta tesis, así como otros más de cursos, mesada, presentaciones en congresos y más, me toca redactar la parte final de la tesis.

Realmente no tengo más que palabras de agradecimiento para todos los seres vivos que han convivido durante el transcurso de la tesis a mi alrededor, con especial énfasis en aquellos más cercanos y que han sobrellevado conmigo en estos dos años y medio, la carrera literal por realizar una tesis de Maestría en los tiempos estipulados. Gracias a todos ellos por haberme permitido cumplir la meta personal que significaba terminar la tesis en este tiempo, resignando muchas veces sus deseos personales y empujándome para lograrlo.

En primer lugar quiero agradecer a mi Tutora, la Dra. Alejandra Kun, con quien desde hace 6 años vengo trabajando y compartiendo parte de la vida. En mi tesis de grado le agradecí por contagiarme su amor por la ciencia y al día de hoy continua haciéndolo igual que antes. Haberme formado durante estos años a su lado ha significado para mí un gran crecimiento y agradezco enormemente su generosidad y paciencia así como su comprensión frente a todos los eventos que hemos compartido. Millones de Gracias!

Por supuesto mis compañeros de laboratorio que me han acompañado también durante todo este proceso haciéndome invaluable aportes tanto en mi vida académico como en mi vida real. Gonzalo, Carlitos, Karina Carlos P, Monica, y los Coyitas, gracias totales!

También agradezco al Jefe del DPAN, al Boli por abrirme las puertas de su laboratorio y que junto a Coya, siempre han estado atentos y dispuestos a ayudar! Gracias!

A Miguel Co-tutor por sus aportes y haberme recibido en su laboratorio en España, gracias!

Agradezco por supuesto a mi Flia y amigos que me bancan todas y cada una de mis ausencias, debido a esta loca idea de terminar rápido y hacer mil cosas al mismo tiempo. Mil gracias por seguirme queriendo igual!

A mi pareja que más que nadie se ha bancado mis ausencias, salidas tardes, llevarme, traerme, esperar, nervios y más nervios, tristezas y alegrías, pocas vacaciones y siempre con tareas pendientes, gracias!!! Prometo q mi doctorado no será así!!!

Agradezco también a la ANII que me ha permitido realizar esta tesis en tiempo record, debido a su no financiamiento. Pero más agradezco a la CAP, que me ha financiado durante los últimos meses para terminar mi tesis.

Agradezco también a CSIC y PEDECIBA que gracias a su financiación he podido comprar los reactivos necesarios para avanzar con mi tesis.

Agradezco al Tribunal, casi todos elegidos por sus aptitudes y confiando en que realizaran valiosos aportes a mi tesis. Además por la generosidad de aceptar una tesis a esta altura del año donde todos estamos deseosos de no tener más actividades, gracias!

Por último, agradezco al Instituto que desde su humildad y grandeza, me ha inspirado con su espíritu luchador a intentar seguir creciendo y formándome como científica, y con él a todos los compañeros cercanos y no tan cercanos, con los que me cruzo diariamente en esta hermosa institución y desde su sonrisa o indiferencia han pasado por mis días y mi vida durante todos estos años.

Gracias infinitas!