



**BENEMÉRITA**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**LICENCIATURA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**TESIS:**

**“ESTUDIO DE LOS NIVELES PROTEÍCOS DE LA  
PROTEÍNA ASOCIADA A LOS MICROTUBULOS (MAP6) Y  
TUBULINA ALFA EN LA RATA *taiep*”**

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACOBIOLOGO**

**PRESENTA:**

**GUADALUPE RIVERA TORRUCO**

**DIRECTORA:**

**D.C. BERTHA ALICIA LEÓN CHAVEZ**

**ASESOR METODOLÓGICO:**

**M. C. ARACELI UGARTE ROJANO**

**Junio 2016**

## DEDICATORIA

*A mi padre René Rivera Quezada en el cielo, que me dio la vida, el ejemplo del estudio y la dedicación por tu carrera así como el apoyo para lograrlo.*

*A mi madre Irma Torruco Rosaldo, quién me dio la vida, quién siempre me ha apoyado y dado la fortaleza para salir adelante.*

## AGRADECIMIENTOS

Doy las gracias a Dios por permitirme vivir esta experiencia que me encaminó hacia el futuro.

Agradezco infinitamente a mi directora de tesis, la Dr. Bertha A. León Chávez por su guía y paciencia en el inicio, elaboración y conclusión de este trabajo. Su ejemplo como mujer investigadora y gran persona me motivan a esforzarme y abrir mis horizontes.

Agradezco enormemente a mis compañeros y amigos que hice en mi estancia en el Laboratorio de Investigaciones Químico Clínicas, a Vic, Tino, Lupita, Kari, Ale, Ahuatzin y lady Wendy.

Agradezco a mis sinodales por tomarse el tiempo de leer y aconsejarme en la elaboración de este trabajo. Así también a mi asesora metodológica por estar presente en seminarios y apoyándonos con el modelo *taiep*.

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
bFGF	Factor de crecimiento básico de fibroblastos (también conocido como FGF2 o FGF- $\beta$ )
bHLH	Motivo estructural hélice-bucle-hélice básico
CLIP	Proteína de unión citoplasmática
CNP	2',3'-nucleotido cíclico 3'-fosfodiesterasa
CSPG	Sulfato de condroitina
FI	Filamentos intermedios
GDP	Guanosín difosfato
GGF	Factor de crecimiento glial
GSL	Glicoesfingolipidos
GTP	Guanosín trifosfato
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
ILK	Quinasa ligada a integrina
MAG	Glicoproteína asociada a mielina
MAP	Proteína asociada a microtubulos
MBP	Proteína básica de mielina
ME	Matriz extracelular
MF	Microfilamentos
MOG	Mielina glicoproteína de oligodendrocitos
MOR	Movimientos oculares rápidos
MT	Microtúbulos
MTOC	Centro de organización de microtubulos
NMDA	N-metil-D-aspartato
NRG1	Neurogulina 1
N-WASP	Proteína neuronal del síndrome de Wiskott-Aldrich
OPCs	Células precursoras de oligodendrocitos
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PINCH	Proteína rica en histidina y cisteína

PLP	Proteína proteolipídica
SD	Sprague-Dawley
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
STOP	Polipéptido de estabilización tubular
T°	Temperatura
WAVE	Proteína homóloga a verprolina de la familia WASP

## ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
Modelo animal de enfermedades hipomielinizantes/desmielinizantes .....	10
El citoesqueleto de los oligodendrocitos en el proceso de mielinización .....	11
Microtubúlos .....	19
Tubulina alfa ( $\alpha$ ).....	20
Proteínas asociadas a microtúbulos: MAP6 .....	22
<b>DEFINICION DEL PROBLEMA.....</b>	<b>26</b>
<b>A. Planteamiento</b> .....	26
<b>B. Pregunta científica</b> .....	27
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>28</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
Objetivo general.....	29
Objetivos particulares .....	29
<b>HIPOTESIS .....</b>	<b>30</b>
<b>DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>31</b>
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>33</b>
1. Manejo de animales .....	33
2. Ensayo inmunoenzimático (ELISA).....	33
3. Procesamiento de tejido para inclusión en parafina .....	34
4. Procesamiento de cortes histológicos.....	34
5. Tinción con hematoxilina y eosina.....	34
6. Inmunofluorescencia indirecta.....	34
7. Procesamiento de tejidos para corte en microtomo de congelación .....	35
8. Análisis estadístico.....	35
<b>DIAGRAMA DE TRABAJO .....</b>	<b>37</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
<b>CEREBELO.....</b>	<b>38</b>
Ensayo inmunoenzimático de ELISA .....	39

Estudio histológico con la tinción de Hematoxilina y Eosina .....	40
Muerte neuronal en cerebelo de rata taiep .....	43
Inmunofluorescencia indirecta.....	44
<b>TALLO CEREBRAL .....</b>	<b>47</b>
Ensayo inmunoenzimático de ELISA .....	48
Estudio histológico con la tinción de Hematoxilina y Eosina .....	50
Inmunofluorescencia indirecta.....	52
<b>MÉDULA ESPINAL .....</b>	<b>55</b>
Ensayo inmunoenzimático de ELISA .....	56
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>58</b>
<b>CONCLUSIÓN.....</b>	<b>60</b>
<b>APÉNDICE .....</b>	<b>61</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>70</b>

## RESUMEN

El modelo *taiep* caracterizado por presentar hipomielinización y desmielinización progresiva, resulta de gran interés para investigar los mecanismos implicados en el mantenimiento, producción y destrucción de esta capa aislante. Aunque las manifestaciones clínicas del modelo ya han sido caracterizadas y se sabe que el origen del problema radica en una acumulación de microtúbulos en las células productoras de mielina (los oligodendrocitos), se desconoce el mecanismo por el cual ocurre tal acumulación. El oligodendrocito es una célula que a lo largo de su maduración sufre drásticos cambios en su estructura, esto les permite migrar como células precursoras de oligodendrocitos (OPCs por sus siglas en inglés), recibir retroalimentación del medio a través de sus prolongaciones citoplasmáticas para seguir su migración, proliferar o madurar. Los OPCs exhiben factores de transcripción como Olig1, el cual además de servir como un marcador para diferenciarlos de los oligodendrocitos inmaduros y maduros (o mielinizantes) promueve su diferenciación en el cerebro. Se ha reportado la importancia de diversas proteínas asociadas en microdominios lipídicos, algunos ejemplos son la proteína neuronal del síndrome de Wiskott-Aldrich (N-WASP), Arp2/3, la cinasa Fyn, integrinas y claudinas. Estos cambios están regulados por factores de crecimiento, de los cuales se sabe, el modelo *taiep* presenta deficiencias. Muchos de los efectos intracelulares de la activación de estas proteínas resultan en modificaciones en el citoesqueleto, del cual nos interesa la regulación de los microtúbulos, estos varían continuamente en su dinamismo para permitir el movimiento, la formación de filopodios o en la división celular, en este trabajo se estudió el papel de la proteína asociada a microtúbulos 6 (MAP6), de la cual se sabe su principal función es conferirle estabilidad a los microtúbulos (MT). En este trabajo se midieron los niveles proteicos de MAP6, tubulina alfa y Olig1 por el método de ELISA. También se realizó inmunofluorescencia indirecta contra Olig1, MAP6 y tubulina alfa para corroborar de manera cualitativa los niveles de estos. Además se tomaron cortes histológicos teñidos con H&E para ver el daño celular en el modelo. Los resultados mostraron un incremento de MAP6 que pudiera

relacionarse directamente con la estabilización y acumulación de microtúbulos en la rata *taiep*, mientras que el déficit de Olig1 se relaciona con la disminución de la presencia de OPCs y la hipomielinización.

## INTRODUCCIÓN

### **Modelo animal de enfermedades hipomielinizantes/desmielinizantes**

La rata *taiep* presenta una mutación autosómica recesiva obtenida por cruces consanguíneos de una colonia de ratas de la cepa Sprague-Dawley en 1988 en el bioterio del Instituto de Fisiología de la BUAP. El nombre de esta mutante de mielina es el acrónimo de la primera letra de los síntomas que presenta: temblor, ataxia, episodios de inmovilidad, epilepsia y parálisis. El temblor es evidente a partir de los 15 días de edad, es fino, de alta frecuencia y se presenta en la parte posterior de la cola, incrementando en amplitud y disminuyendo en frecuencia a medida que aumenta la edad. La ataxia aparece a partir del cuarto mes de edad y posteriormente empiezan los episodios de inmovilidad, los cuales inician con la pérdida de enderezamiento y bradipnea profunda; condición que tarda de 4 segundos a 2 minutos seguidos de una recuperación espontánea. En algunos animales se presentan movimientos de tipo mioclónicos en las extremidades delanteras y posteriores al inicio de la inmovilidad aproximadamente entre los 5 y 6 meses de edad. Posteriormente, estas ratas desarrollan parálisis progresiva a partir del séptimo mes de edad.<sup>1</sup>

A diferencia de la mayoría de las cepas mutantes de mielina, la rata *taiep* tiene un periodo de vida casi normal y es capaz de reproducirse a pesar del deterioro neurológico progresivo, el temblor parece tener origen en el cerebelo con un pronunciado balanceo del tronco y problemas de la marcha. Parece haber una estrecha relación entre el agravamiento de los síntomas en la rata *taiep* y la pérdida progresiva de mielina. Este defecto es más severo en el cerebro que en la medula espinal, característica que comparte con la mayoría de las mutantes de mielina.<sup>2</sup>

Cortés y cols., en 2005 demostraron que los episodios de inmovilidad dependen de factores ambientales y biológicos, entre ellos el dimorfismo sexual, puesto que se observó que dichos episodios se encuentran con mayor frecuencia

en ratas macho que en hembras. Estos episodios se caracterizan por ser tanto espontáneos como inducidos, al sostenerles por la cola. Así también asocian estos episodios con la actividad del sueño MOR y demuestran que ésta susceptibilidad llega a un máximo entre los 8 y 10 meses.<sup>3</sup>

La rata *taiep* tiene un defecto en la mielinización del Sistema Nervioso Central (SNC), la cual es progresiva e incrementa con la edad, no se presenta de la misma forma en todas las regiones cerebrales y está asociada con una acumulación de microtúbulos en los oligodendrocitos que puede interrumpir el transporte de las proteínas de mielina o sus ARN mensajeros (ARNm) hacia las vainas de mielina, comprometiendo la síntesis de ésta proteína y su mantenimiento, el Sistema Nervioso Periférico (SNP) a diferencia del SNC se encuentra normalmente mielinizado. Sin embargo, aún se desconoce con precisión la naturaleza de la mutación que tiene la rata *taiep*.<sup>4</sup> La acumulación de microtúbulos en el oligodendrocito comienza a partir de los 12 a 15 días postnatales, es la principal anomalía en la rata *taiep*, este defecto podría deberse a un aumento en el ensamble de microtúbulos o bien por una disminución en su volumen, interrumpiendo de esta forma las interacciones macromoleculares entre ellos. Los oligodendrocitos de la rata *taiep* presentan una orientación de manera opuesta con polaridad aleatoria en los microtúbulos, el cual podría resultar en una interrupción del transporte vesicular de la célula.<sup>5</sup>

### **El citoesqueleto de los oligodendrocitos en el proceso de mielinización**

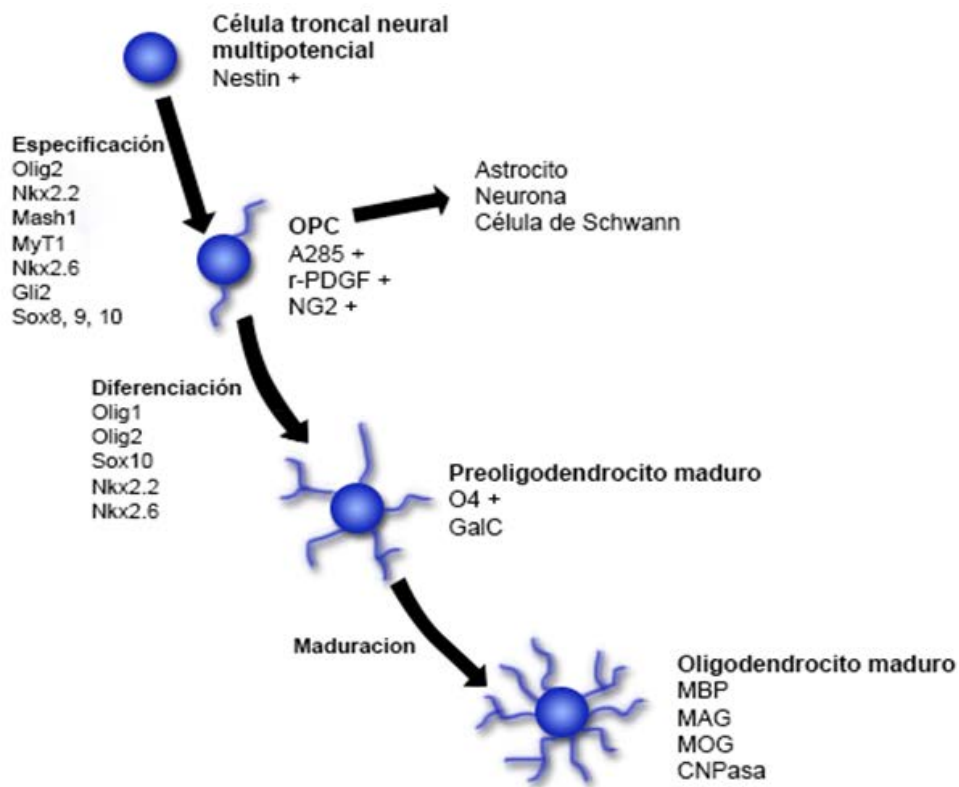
El citoesqueleto de los oligodendrocitos está compuesto de (MT) y microfilamentos de actina (MF) pero carecen de filamentos intermedios (FI) a diferencia de las células de Schwann (encargadas de la mielinización de los axones del SNP), que poseen diversos tipos de FI dependiendo del estado de desarrollo. En los oligodendrocitos, los MF median el crecimiento primario de las prolongaciones citoplasmáticas pero son los MT los que les confieren la mayor estabilidad mecánica. Adicionalmente, ambos sirven como un medio de transporte de organelos celulares, vesículas, proteínas y gránulos de ARNm, los cuales son

acarreados a lo largo de esta red de MT y MF por proteínas motoras como la cinesina, dineína y miosina.<sup>6</sup>

El proceso de la formación de la vaina de mielina puede dividirse en tres eventos específicos, pudiendo nombrarlos como: (1) Extensión celular “Cell spreading” y crecimiento de las prolongaciones citoplasmáticas, (2) Interacción célula-célula y envoltura primaria y (3) la compactación de la vaina de mielina.

Los oligodendrocitos son células gliales con múltiples prolongaciones, estos se originan en la zona subventricular y migran en forma de OPCs (células precursoras de oligodendrocitos, por sus siglas en inglés) estas células extienden sus múltiples prolongaciones y dependiendo de las señales recibidas, pueden continuar su migración, proliferar o convertirse en un oligodendrocito mielinizante.<sup>7</sup>

Los OPCs son células altamente proliferativas, móviles y bipolares, las cuales expresan altos niveles del gangliosido GT3 (reconocido por el anticuerpo A2B5), el receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa (PDGF $\alpha$ R) y el sulfato de condroitina NG2 (CSPG NG2, por sus siglas en inglés); su expresión y potenciación se encuentran reguladas por los factores de transcripción con el motivo estructural “hélice-giro-hélice básico” (bHLH, por sus siglas en inglés) Olig1 y Olig2, el factor homólogo achaete-scute tipo 1 de mamíferos (Mash1), proteína dedos de Zinc (Gli2) y el factor de transcripción tipo I para Mielina (MyT1). La diferenciación de los OPCs, requiere la función tanto de los factores mencionados como de los factores Nkx2.2 y Nkx2.6 (los cuales poseen un homodominio, participan en el desarrollo embrionario e indican la identidad celular); así como los factores SOX 8/9/10 (también participantes en el desarrollo embrionario e identidad celular). Los OPCs pueden diferenciarse en múltiples tipos celulares, tales como astrocitos, neuronas y células de Schwann, su diferenciación hacia oligodendrocitos inmaduros está regulada por factores de crecimiento, citocinas e incluso hormonas, además de los factores enumerados anteriormente, ya en un estadio de madurez se le asocia con la adquisición de proteínas de la mielina (las cuales se describen más adelante).<sup>8</sup>



**Fig. 1 Especificación y diferenciación de los oligodendrocitos.**

Olig1 y Olig2 además de servir como marcadores del linaje del oligodendrocito, poseen cada uno un rol fundamental. El uso de mutantes creados para la sobreexpresión o eliminación de estos factores señala que en el caso de Olig2, su sobreexpresión incrementa la generación de los oligodendrocitos diferenciados y potencia la tasa de migración de los OPCs.<sup>9</sup> Anteriormente, se confirmó que la presencia de Olig1 no es esencial en el desarrollo del oligodendrocito, al ser compensadas sus funciones por Olig2, sin embargo Dai y cols. (2015) señalan un rol único de Olig1, el cual es promover el encuentro, diferenciación y mielinización primaria de los OPCs en el cerebro, más no en la medula espinal.<sup>10,11</sup> Los OPCs además de participar en la mielinización del SNC durante el desarrollo, su proliferación está ligada con la desmielinización aguda, como una respuesta del organismo para intentar remielinizar las zonas dañadas, particularmente observado en enfermedades y modelos desmielinizantes.<sup>12</sup>

Esta primera etapa de formación de estas prolongaciones esta mediada por la reorganización del citoesqueleto con la formación de filopodios y lamelipodios a

través de la polimerización de actina y la subsecuente invasión de los MT. Es de interés particular la función de N-WASP y Arp2/3, los cuales median el comienzo de la formación del filopodio, seguido de la activación de las proteínas WAVE de una manera dependiente de Rac para convertir al filopodio en un lamelipodio.<sup>13</sup> Estos eventos intracelulares son mediados por diversos factores de crecimiento, de los cuales destacan el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) y el factor de crecimiento glial (GGF). Neuronas y astrocitos liberan PDGF y bFGF y se ha visto que estos factores de crecimiento median la proliferación de OPCs e inician el crecimiento primario de las prolongaciones del oligodendrocito en una manera calcio dependiente.<sup>14</sup> Por su parte, HGF (liberado por astrocitos) y GGF (liberado por neuronas) tienen un efecto mitogénico que inhibe la diferenciación.<sup>15,16</sup> En contraste con los factores de crecimiento, las moléculas de la matriz extracelular (ME) del oligodendrocito podrían jugar un rol principal en la primera etapa de la mielinización, a través de la señalización intracelular para regular al citoesqueleto. La ME está formada de proteínas tales como fibronectina, vitronectina, colágeno y laminina; estos componentes interactúan con las proteínas de membrana del oligodendrocito, principalmente los miembros de la familia de integrinas, las cuales están formadas de heterodímeros  $\alpha$  y  $\beta$ .<sup>17-19</sup> Durante esta primera fase, la laminina-2 se une a una integrina  $\alpha_6\beta_1$ , se ha visto que en otros procesos celulares se asocia a un complejo formado por ILK, PINCH y  $\alpha$ -parvina; este complejo es comúnmente conocido como IPP.<sup>20</sup> La fosforilación de  $\beta_1$  por ILK media la polimerización de actina a través del reclutamiento de paxilina y el complejo N-WASP/Arp2/3.<sup>21</sup> Chun y cols., en 2003 encontraron que en oligodendrocitos en cultivo existe la interacción integrina-ILK, con lo cual es posible que el mecanismo desencadenado por ILK también opere durante la mielinización.<sup>22</sup> Estudios hechos por Liang y cols. en 2004, demostraron que al enriquecer un cultivo de oligodendrocitos con fibronectina estos exhibían prolongaciones pronunciadas, las cuales están mediadas por la proteína cinasa Fyn, esta enzima ejerce su efecto a través de p190Rho-GAP para inactivar RhoA (miembro de la familia de GTPasas pequeñas que media la polimerización de

actina) así como también demostraron que la unión de la fibronectina a la fracción  $\beta_1$  de la integrina activaba a los miembros de la familia Rho: Cdc42 y Rac1 de una manera dependiente de Fyn, esta vía de señalización ha mostrado generar la formación de filopodios en fibroblastos.<sup>23,24</sup> La expresión de RhoA ha demostrado prevenir la extensión de las prolongaciones citoplasmáticas.<sup>25</sup> En oligodendrocitos, la cinasa Fyn ha sido implicada en diversos procesos celulares necesarios para la maduración del oligodendrocito y posterior mielinización, la señalización río abajo de Fyn puede dividirse en tres vías: (1) la ya mencionada RhoA/Cdc42/Rac-1 para regular la movilización de actina y mediar la sobrevivencia celular y diferenciación morfológica, (2) El reclutamiento de los MT que contribuye en la polaridad celular facilitando el transporte retrogrado y (3) la regulación de la síntesis de la proteína básica de mielina (MBP) modulando el transporte, estabilidad y regulación de la traducción del mRNA.<sup>26</sup> Además de las integrinas, se ha descrito que los oligodendrocitos poseen otro receptor para la laminina, los distroglicanos, los cuales ya han sido relacionados con el desarrollo de las células de Schwann y la mielinización por parte de éstas.<sup>27,28</sup> Se sugiere que los oligodendrocitos requieren diferentes receptores de laminina en los diferentes estadios de desarrollo, ya que ha sido ampliamente demostrado que las integrinas participan en la supervivencia celular y diferenciación inicial mientras que los distroglicanos están implicados en la formación de la vaina de mielina, mediando los primeras etapas de mielinización.<sup>19,29</sup>

El oligodendrocito sufre diversas modificaciones del citoesqueleto y membrana, las primeras para poder encontrar su objetivo, el axón; las segundas para remodelar la membrana y comenzar el proceso de mielinización. Unas de las modificaciones más destacadas de la membrana del oligodendrocito, es la formación de microdominios especializados en las vainas denominados “balsas lipídicas”.<sup>30</sup> Estos microdominios están compuestos por colesterol, glicoesfingolípidos (GSLs) y fosfolípidos con cadenas de ácidos grasos saturados, los cuales no se detectan en OPCs, sugiriendo que su formación se da durante la diferenciación y extensión de las prolongaciones citoplasmáticas del oligodendrocito.<sup>31</sup>

Estudios sobre las balsas lipídicas (*lipid rafts*) a diferentes estados de maduración del oligodendrocito en cultivo, demostraron la presencia de receptores a PDGF y a bFGF (también conocido como FGF2 o FGF- $\beta$ ).<sup>32,33</sup> El receptor a FGF2 es el mayormente expresado en los oligodendrocitos maduros, en contraste con otros receptores de la misma familia como FGFR3 y FGFR4, los cuales están ausentes en esta etapa del desarrollo del oligodendrocito.<sup>34,35</sup> Bryant y cols. en 2009 encontraron la presencia de dos isoformas de FGFR2 de 120 y 30 kDa en las balsas lipídicas de oligodendrocitos, la isoforma principal era fosforilada aún en ausencia de su ligando el FGF2, sugiriendo una función independiente de ligando. La activación de FGFR2 provoca la fosforilación del sustrato del factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 (FRS2), la señalización FGFR2-FRS2 en las balsas lipídicas se ha sugerido que opera vía fosfoinositol 3-quinasa/Akt en lugar de Ras/Mek/Erk (como se creía anteriormente), vía que media la sobrevivencia tanto de OPCs como oligodendrocitos maduros.<sup>33,36</sup> Se ha encontrado que los MT y MF están asociados con las balsas lipídicas y esto se ha observado solo en presencia de laminina-2 como sustrato.<sup>37</sup> Particularmente, la asociación del MT con las balsas lipídicas podría tener como propósito mediar el transporte de las vesículas de mielina hacia la creciente vaina de mielina. Las balsas lipídicas también poseen altos niveles de cinasa Fyn, F3/contactina, NCAM120, CNPasa y MOG (las dos últimas proteínas específicas de mielina).<sup>38,39</sup> La cinasa Fyn ha mostrado estar ampliamente ligada en la mielinización, ya que un ratón deficiente de esta proteína presenta hipomielinización severa y la inactivación de la Fyn constitutiva acarrea defectos en la mielinización. Fyn también interactúa directamente con la proteína asociada a microtúbulos tau a través del dominio SH3 y adicionalmente unirse a la tubulina.<sup>40,41</sup>

Como hemos visto, las balsas lipídicas juegan un rol bastante importante en los mecanismos de señalización que inician el proceso de mielinización, seguido a esto, se requiere dilucidar la interacción axón-oligodendrocito. En el SNP se ha demostrado que son los axones los que controlan la mielinización por parte de las células de Schwann.<sup>42</sup> De las moléculas que controlan esta relación, se ha identificado a la neurogulina-1 tipo III (NRG1), la cual es expresada por los axones

y se ha visto que se regula cuando la mielinización debe ocurrir, incluso el grosor de la vaina de mielina.<sup>43,44</sup> Hasta ahora no se ha identificado que moléculas controlan esto en el SNC, diversos estudios apuntan también al mecanismo de la NRG1-ErB indicando que una disminución en su señalización reduce la mielinización por parte de los oligodendrocitos.<sup>45-48</sup> Contradictoriamente, mutantes Knock out para los genes de NRG1 o ErbB demostraron no tener efecto sobre la mielinización, aunque el aumento de la expresión de NRG1 incrementó la mielinización.<sup>49</sup> Lundgaard y cols. en 2013 encontraron que en el SNC existen dos modos de mielinización; uno que es independiente de la actividad neuronal, y otro que es dependiente de ésta. NRG1 demostró intercambiar el mecanismo independiente por el dependiente, incrementando la acción del receptor NMDA en los OPCs. En presencia de NRG1, la mielinización se ve acelerada e incrementada, asimismo el bloqueo del receptor NMDA reduce la mielinización, como cuando la NRG1 no está presente. Además, sus resultados mostraron que la remielinización tras un daño en la materia blanca es del tipo dependiente de la actividad de NMDA.<sup>50</sup>

Enfoques orientados a imitar la fluidez de los dominios transmembranales podrían señalar que eventos están ligados a la maduración de la mielina: la adición de galactosilceramida (GalC) en liposomas, en un cultivo de oligodendrocitos interacciona con la membrana y provoca su redistribución dentro de la misma.<sup>51</sup> Esto acompañado del agrupamiento intracelular de dominios ricos en MBP, así como también la reorganización de la distribución de PLP y MOG, los cuales se agrupan con la GalC.<sup>52</sup> Adicionalmente, esto coincide con la relocalización del GalC a las balsas lipídicas, induciendo un mecanismo de señalización y sorprendentemente ocurre una despolimerización de MT y MF. Cuando se inhibe farmacológicamente la despolimerización de los MF, el agrupamiento de la membrana y la despolimerización de los MT también se inhibe, apuntando la importancia de los MF para mediar estos eventos.<sup>51,53,54</sup>

Aun se estudian los mecanismos exactos que regulan el contacto entre el axón y el oligodendrocito mielinizante, así como también se siguen buscando los

detalles de los eventos morfológicos y fisiológicos para la última fase de la mielinización, la compactación de la vaina de mielina.

Unas de las moléculas candidatas para esta fase, es la estamina, la cual incrementa la probabilidad de la catástrofe de los MT, también se ha visto que se expresa altamente en el SNC en desarrollo, está asociada a la migración celular y está regulada negativamente en oligodendrocitos no diferenciados (se atribuye a que se requiere cierta estabilidad de los MT en las prolongaciones citoplasmáticas).<sup>55-57</sup> Además, una estamina aberrante se ha encontrado en los cerebros desmielinizados de pacientes con esclerosis múltiple.<sup>58</sup>

Otra molécula implicada es la sirtruina-2 desacetilasa de tubulina, la SIRT2, la cual se ha reportado desacelera la diferenciación de los oligodendrocitos al incrementar el dinamismo de los MT, a diferencia de la estamina, la SIRT2 es exclusiva de los oligodendrocitos y podría regular la retracción de los MT en la compactación de la vaina de mielina.<sup>59</sup>

Por último, encontramos a Claudina II, la cual regula la proliferación y migración de los oligodendrocitos al interactuar con la fracción  $\beta_1$  de la integrina.<sup>60</sup> Además, se expresa también en oligodendrocitos maduros y se ha reportado una completa ausencia de conexiones estrechas “tight junctions” en el cerebro de un ratón knock out para Claudina-II. Más sorprendente, un ratón doble knock out para Claudina II y PLP muestra una compactación anormal de la mielina, indicando que ambas están implicadas en la compactación de la mielina.<sup>61,62</sup>

A lo largo del proceso de la mielinización los componentes del citoesqueleto nunca dejan de tener un papel de suma importancia, ya que son requeridos para el transporte de vesículas, proteínas y mRNAs hacia la vaina de mielina. En este trabajo se hace un énfasis en los MT, al ser éstos los que se observan alterados en el modelo *taiep*.

## Microtubúlos

Los microtúbulos son encontrados en todas las células eucariotas, estos poseen gran cantidad de funciones, tales como "riel" para proteínas cargo (que transportan vesículas), estructura del flagelo, segregación de cromosomas durante la división celular, entre las más importantes. Su estructura es similar en todas las células eucariotas, son largos, tubulares con un diámetro interno y externo de entre 25 y 15 nm, respectivamente. Estos difieren en largo, pero pueden tener hasta 100  $\mu\text{m}$  de longitud.<sup>63</sup>

Los microtúbulos están conformados por heterodímeros de subunidades proteicas formadas por  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina, las cuales conforman la estructura cilíndrica del microtúbulos. Generalmente estos se encuentran sujetos en un centro de organización microtubular (MTOC por sus siglas en inglés) cercano al núcleo celular y extendiéndose hasta la periferia de la célula<sup>14</sup>.

En células en interfase el MTOC es conocido como centrosoma y se localiza cerca del núcleo, produciendo un arreglo radial de los MT con sus extremos "más" (hacia donde se produce la polimerización del MT) orientado hacia la periferia celular. En los axones neuronales los organelos son transportados en dos direcciones a lo largo de los MT, estos pueden ser tan largos como 1 metro, no son continuos y se originan en el MTOC, aun así no todos tienen la misma polaridad, se sabe que los MT en la dendritas tienen polaridad mixta aunque aún se desconoce la funcionalidad de esta condición. Se sabe que el tiempo de vida de los MT es mayor en axones que en cilios o flagelos (también bastante ricos en MT), el tiempo de vida media es menor a 1 minuto en células mitóticas y de 5 a 10 minutos en células que no está en mitosis.<sup>64</sup>

Los MT son polímeros dinámicos que continuamente se están polimerizando y despolimerizando, estos incrementan y disminuyen su longitud con transiciones frecuentes entre cada proceso, de manera natural encontramos las siguientes fases: elongación, catástrofe, acortamiento, rescate y nueva

elongación. Durante la incorporación de dímeros de tubulina al MT, el GTP que une a la tubulina es rápidamente hidrolizado a GDP.<sup>63</sup>

Mitchison y Kirshner (1984) propusieron que la inestabilidad dinámica depende de la presencia de un capuchón de dímeros de tubulina con un GTP sin hidrolizar, que promueve la polimerización tanto como el capuchón este presente, ya que sí este se pierde y en su lugar se tiene GDP, el MT rápidamente se comienza a despolimerizar. Con lo cual sugieren que la prevención de la hidrólisis de GTP puede estabilizar los MT.<sup>65</sup>

### **Tubulina alfa ( $\alpha$ )**

Las tubulinas son una familia de proteínas globulares de 55 KDa. Esta se encuentra formada por las tubulinas alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) y gamma ( $\gamma$ ), que comparten una identidad entre sus cadenas de aminoácidos de 35-40%, aunque su similitud con cualquier otra proteína conocida es mínima. Las tubulinas  $\alpha$  y  $\beta$  son las subunidades esenciales de los microtúbulos, mientras que la tubulina- $\gamma$  es un componente fundamental del centrosoma. Existen asimismo otras variantes menores, que no están presentes en todos los organismos eucariotas, denominadas tubulina-delta ( $\delta$ ), -épsilon ( $\epsilon$ ) y -zeta ( $\zeta$ ).<sup>66</sup>

La concentración intracelular de tubulina oscila entre los 10 y 20  $\mu\text{M}$ , teniendo como concentración crítica 0.03  $\mu\text{M}$ , esto siempre favorecerá la polimerización.<sup>64</sup>

Se ha reportado que los oligodendrocitos expresan una forma específica de la  $\beta$ -tubulina, llamada  $\beta_{IV}$ -tubulina, que hasta la fecha no ha sido identificada en otro tipo celular en el cerebro. Esta proteína fue encontrada en las prolongaciones citoplasmáticas de los oligodendrocitos pre-mielinizantes, las referencias mostradas con anterioridad denotan la gran importancia del citoesqueleto durante los diferentes estadios de la mielinización.<sup>67</sup>

Los heterodímeros de tubulinas alfa y beta se ensamblan en los protofilamentos de tal manera que la tubulina- $\beta$  de un dímero contacta con la tubulina- $\alpha$  del dímero siguiente. Por ello, los microtúbulos son polares de forma

inherente, ya que presentan tubulina- $\alpha$  en un extremo del polímero (el extremo "menos") y tubulina- $\beta$  en el otro (el extremo "más"). Los 13 protofilamentos que forman un MT se disponen uno al lado de otro, de manera que sí uno sigue las subunidades  $\alpha$  o  $\beta$  lateralmente alrededor del MT, se observa que forman una hélice de tres subunidades. Esto significa que la hélice recorre 3 subunidades hasta completar una vuelta. Este tipo de hélice no es perfectamente simétrica, ya que se une a los MT en el lugar donde cada hélice completa una vuelta. Los protofilamentos interactúan entre ellos lateralmente sobre todo a través de enlaces  $\alpha$ - $\alpha$  y  $\beta$ - $\beta$ .<sup>68</sup>

A pesar de encontrarse una tubulina propia del oligodendrocito (la  $\beta_{IV}$ ), es vital comprender el papel de cada tubulina en el proceso de mielinización, ya que ésta proteína sufre modificaciones post-traduccionales, incluyendo acetilación y tirosinación solo en su subunidad alfa y fosforilación, poliglutamilación y poliglicilación en ambas subunidades. Todas las isoformas de la tubulinas poseen un residuo C-terminal de tirosina, y además se encuentran tirosinadas en su forma nativa.<sup>69</sup>

En la mayoría de los tipos de células eucariotas, la tirosinación de la  $\alpha$ -tubulina en su extremo C-terminal media la asociación de los microtúbulos con proteínas citoplasmáticas como las CLIP, se propone que ésta unión sirve como un puente entre microtúbulos y microfilamentos y por ende participa en la regulación de la formación de filopodios y lamelipodios; los cuales son necesarios para que el oligodendrocito cumpla su función mielinizante en los axones de las neuronas circundantes. Generalmente, se observa que los microtúbulos más viejos y estables se encuentran destirosinados, mientras que los más jóvenes y dinámicos se encuentran tirosinados.<sup>70</sup>

Se ha reportado que los oligodendrocitos contienen una  $\alpha$ -tubulina acetilada que está presente en el cuerpo celular y en prolongaciones primarias, mientras que la forma tirosinada está en mayor cantidad en los procesos distales. Además, se sabe que la acetilación de la  $\alpha$ -tubulina está relacionada con mayores niveles de estabilidad en los oligodendrocitos maduros.<sup>71</sup>

Aunque los microtúbulos acetilados y destirosinados parecen encontrarse en los microtúbulos más estables, toda la evidencia sugiere que estas modificaciones postraduccionales no son la causa de la estabilidad, pero sí un evento seguido de la estabilización por diversas proteínas.<sup>72</sup>

### **Proteínas asociadas a microtúbulos: MAP6**

Duncan y cols., dedujeron que la estabilización de los microtúbulos parece ser el resultado de la unión de factores accesorios seguidos a la formación de los microtúbulos. Estos factores se denominan proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP), las cuales se encuentran de manera abundante en las neuronas y células no neuronales, dicho factor es fundamental para el correcto ensamble y unión de los microtúbulos. La MAP1B es una proteína asociada a microtúbulos, en cultivo de oligodendrocitos esta proteína forma puentes cruzados entre los microtúbulos y los promotores de microtúbulos, el hecho que esta proteína se exprese predominantemente en el cerebro de neonatos podría estar alterado por una mutación en el gen que la codifica. Un incremento en la cantidad de microtúbulos puede ser resultado de la sobreexpresión de proteínas que estabilizan a los microtúbulos, tal como la familia de las MAP. Aunque hacen falta estudios más detallados sobre mutaciones en las MAPs de manera individual, se ha observado que la expresión ectópica de tau en células ováricas Sf9 causa un incremento en su contenido de microtúbulos.<sup>69</sup>

La rata *taiep* representa un modelo único para el estudio del papel del citoesqueleto en la mielinización, aunque la afección primaria resulta en la acumulación de los microtúbulos en los oligodendrocitos, estudiar las bases bioquímicas y moleculares de la regulación de los microtúbulos y las MAPs provee de muchas oportunidades para estudiar la función celular específica de cada proteína.<sup>2</sup>

Los miembros de la familia de fosfoproteínas asociadas a microtúbulos (MAP por sus siglas en inglés) facilitan la polimerización de la tubulina a

microtúbulos, unen y así mismo estabilizan los microtúbulos polimerizados y además influyen en su dinamismo.<sup>73</sup>

Las MAP's pueden dividirse en dos grupos: aquellos que poseen MT sensibles a la actividad ATPasa o GTPasa (kinesina, dineína y dinamina), y aquellos que no son sensibles a nucleótidos (p. e. MAP1, MAP2, MAP4, tau, etc.)<sup>74</sup>. Muchas de las MAP que no dependen de nucleótidos son responsables de estimular la polimerización de los MT y favorecer su estabilización, en pocas palabras su dinamismo depende de la acción de estas proteínas<sup>75,76</sup>.

La unión entre las MAP y la tubulina es iónica, las MAPs se unen predominantemente al carboxilo C terminal de la tubulina, aún se desconoce cómo es que estas proteínas ejercen su efecto en el MT, pero se cree que podría ser por una combinación de enlaces cruzados por múltiples uniones de las MAP a la tubulina.<sup>77</sup>

Adicionalmente, las MAPs están implicadas en procesos de señalización mediando la interacción de los microtúbulos con otros componentes del citoesqueleto y con la membrana plasmática. Finalmente, las MAPs son importantes en el anclaje de cinasas y fosfatasas en vesículas de transporte intracelulares.<sup>78</sup>

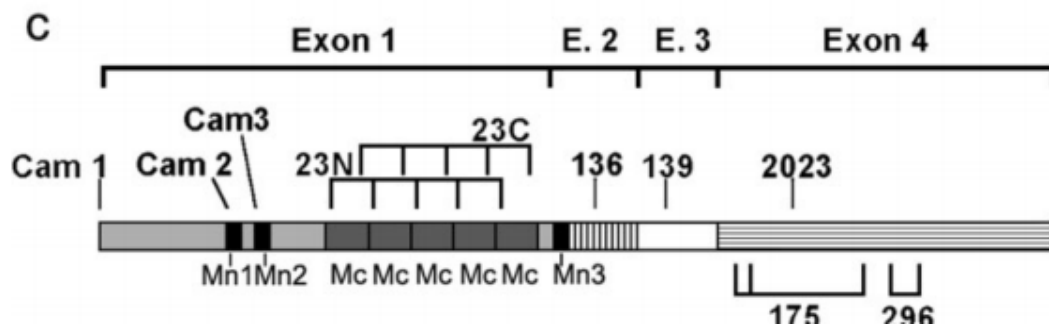
En los oligodendrocitos se expresan MAP de alto peso molecular como las MAP2C, MAP1B y MAP4, así también se encuentran las seis isoformas de menor peso molecular llamadas tau.<sup>79</sup>

En este trabajo se estudiará a la proteína MAP6, estudios hechos por Galiano y cols. en 2004 demostraron la existencia de una MAP6 exclusiva de los oligodendrocitos, diferente a la neuronal (120 kDa) y la hallada en fibroblastos (42 kDa), las MAP6 son también conocidas como Stable Tubule Only Polypeptides (STOP), en su estudio encontraron que los oligodendrocitos expresan una STOP/MAP6 de 89 kDa, a la cual llamaron O-STOP y dos variantes de 42 y 48 kDa en menor proporción. Al hacer el análisis de sus resultados encontraron por inmunoblot que la O-STOP parece carecer de un fragmento que es reconocido por

el anticuerpo Cam1, esta diferencia se encuentra en el exón 1 que codifica a esta proteína.<sup>80</sup>

Bonnet y cols. Encontraron que la afinidad de la proteína STOP por la tubulina es mayor comparado con MAPs de mayor peso molecular como MAP1A, MAP1B y MAP2, adicionalmente encontraron que la capacidad de unión de la MAP6 a la tubulina alfa es 40% mayor que sí se uniera a la tubulina beta, esto quiere decir que la proteína MAP6 es capaz de unirse a ambas regiones pero no de manera homóloga.<sup>81</sup>

Se ha demostrado, que la MAP6 es sensible a las bajas temperaturas siendo capaz de mantener la estabilidad de los microtúbulos a temperaturas ( $T^{\circ}$ ) de  $4^{\circ}\text{C}$ , sin la acción de esta proteína los microtúbulos son despolimerizados a  $T^{\circ}$  menores a los  $20^{\circ}\text{C}$ . Usando proteínas purificadas, Delphin y cols. encontraron que esta proteína se une a los microtúbulos a través de su módulo Mc (Fig. 1), segmento que es codificado por el exón 1, flanqueado por los fragmentos que codifican a los módulos Mn1, Mn2 y Mn3, estos últimos son los que otorgan la resistencia al nocodazol (fármaco antineoplásico que interfiere en la polimerización de los microtúbulos).<sup>80,82</sup>



**Fig. 2 Astrocitos y Oligodendrocitos expresan diferentes isoformas de la Proteína MAP6/STOP, Tomado de: Galiano y cols. (2004)**

La proteína MAP6 es fosforilada por la enzima multifuncional cinasa II dependiente de calcio/calmodulina (CaMKII). Las formas fosforiladas de esta proteína no se pueden unir a los MT pero si a actina en ensayos *in vitro*, lo cual sugiere que CaMKII promueve la translocación de MAP6 de los MT hacia los compartimentos sinápticos donde puede interactuar con la actina, lo cual podría ser un rol importante de MAP6 en regular la plasticidad sináptica. Adicionalmente se ha reportado que MAP6 se asocia con neurofilamentos esferoides de pacientes con Esclerosis Lateral Amiotrófica.<sup>83,84</sup>

Los primeros estudios que demostraron que una alta concentración de la proteína MAP6 provoca un estado de súper estabilidad en los MT fueron hechos por Job y cols. en 1987, estos encontraron que este fenómeno es provocado por altas concentraciones de esta misma proteína, *in vitro*. El estado de estabilidad ante el frío solo requiere unas pocas proteínas MAP6 por polímero para bloquear la despolimerización causada por las bajas T°. Los polímeros súper estables contienen abundantes cantidades de proteína MAP6 a pesar de no tener relación en la equivalencia molar con la tubulina en estos MT. También determinaron que estos polímeros súper estables son los que conectan los cinetocoros a los polos del huso mitótico y los encontrados en el cuerpo medio que separa a las células en división.<sup>85</sup>

Por otro lado Faivre y cols. (1985) sugirieron que durante el desarrollo temprano de un individuo existe una fuerte inhibición de la expresión de la proteína MAP6, la cual decrece con el tiempo y está relacionado con la aparición de MT estables al frío, esto al observar que durante el desarrollo dendrítico en las neuronas de Purkinje, sus MT son lábiles ante al frío, mientras que durante el periodo de crecimiento extenso de dendritas se relacionó con la aparición de MT estables al frío.<sup>86</sup>

## DEFINICION DEL PROBLEMA

### A. Planteamiento

La rata *taiep* presenta una acumulación de microtúbulos en los oligodendrocitos provocando alteraciones metabólicas que conllevan a la pérdida de la mielina en el SNC. Las MAP colaboran en el ensamblaje de los dímeros de tubulina para formar los microtúbulos, su estabilización e incluso la relación con otros componentes del citoesqueleto.

Se conocen varios tipos de MAP: MAP1, MAP2, MAP3, MAP4. Las MAP1 comprenden por lo menos 3 proteínas diferentes: A, B y C. La C es importante en el transporte retrógrado de vesículas y se denomina dineína citoplasmática. Las MAP2 están en las dendritas y el cuerpo de las neuronas, donde se asocian a otros filamentos. Las MAP4 se encuentran en la mayoría de las células y estabilizan los microtúbulos.

La MAP6 o también conocida como STOP, juega un papel importante en estabilizar los MT, por la unión de heterodímeros de tubulina, se sabe que estos enlaces son de tipo iónicos y preferentemente se unen al C-terminal de la tubulina, aún se desconoce exactamente cómo es que estas proteínas ejercen su efecto, pero se cree que puede ser una combinación de puentes cruzados con supresión del C-terminal de la tubulina. Hasta ahora se conoce que la MAP6 evita la desnaturalización de los MT a bajas temperaturas, a diferencia de los microtúbulos adaptados a las bajas temperaturas (observados en diversas especies de peces marinos), los llamados microtúbulos estables a bajas temperaturas adquieren esta "protección" por la unión aleatoria de esta proteína al MT, evitando su despolimerización, cosa que no sucede en ensayos *in vitro* con la presencia de ATP, conjuntamente se ha reportado que confiere resistencia al fármaco antineoplásico "Nocodazole", que tiene como función despolimerizar a los MT de células cancerosas. Existen muy pocos estudios sobre qué efecto tendría una alteración de los niveles de la proteína en condiciones

ambientales normales ( $>20^{\circ}\text{C}$ ), estudiar esta proteína en la rata *taiep* resulta interesante debido a lo poco se conoce de ella y que evita la despolimerización de los MT, pudiendo ser una de las causas de su acumulación en los oligodendrocitos en esta mutante de mielina.

### **B. Pregunta científica**

¿Existe alguna alteración en MAP-6 y  $\alpha$ -tubulina en la rata *taiep* que se relacione directamente con el incremento de microtúbulos en los oligodendrocitos?

## JUSTIFICACIÓN

Existen pocos modelos animales con mutaciones en las proteínas de mielina que tengan una vida larga y sean capaces de reproducirse como la rata normal. Además, este modelo nos permitirá conocer si la alteración de la o las proteínas que participan en el proceso de mielinización son unas de las causantes de la acumulación de MT en los oligodendrocitos de la rata *taiep* y posiblemente en un futuro extrapolar este conocimiento a enfermedades hipo y desmielinizantes humanas.

Se realizó un microarreglo que abarco 5000 genes de la rata *taiep* en el Instituto de Genómica de la UNAM mostró un incremento de la expresión de MAP6, por lo que es interesante estudiar si también la proteína se encuentra aumentada en zonas ricas en materia blanca como la médula espinal, tallo cerebral y cerebelo, ya que solo se conoce que se incrementa al descender la T°, evitando la despolimerización de los MT.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Estudiar si la proteína asociada a microtúbulos (MAP-6) y tubulina alfa se encuentran incrementadas en la rata *taiep*.

### Objetivos particulares

1. Determinar si existe un incremento de los niveles proteicos de proteína asociada a los microtúbulos (MAP6)
2. Determinar si existe un incremento de los niveles proteicos de tubulina alfa a diferentes edades en la rata *taiep*.
3. Evaluar los niveles proteicos de Olig1 en la rata *taiep*.
4. Evaluar la histología en el cerebelo y tallo cerebral de la rata *taiep* a diferentes edades.
5. Realizar una inmunofluorescencia para visualizar la tubulina- $\alpha$ , MAP6 y Olig1 en cerebelo, medula espinal y tallo cerebral de la rata *taiep*.

## HIPOTESIS

“La rata *taiep* presenta un incremento en los niveles de  $\alpha$ -tubulina y MAP6 que está relacionado con la patología de esta mutante de mielina”

## DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

### a) Tipo de estudio

Investigación aplicada, transversal, aleatoria y observacional

### b) Definición del universo

Ratas *taiep* y Sprague-Dawley obtenidas del bioterio de Fisiología y del CINVESTAV

### c) Tamaño de la muestra

Se analizarán a los 1 y 6 meses de edad con una  $n=3$  analizando las muestras por triplicado.

### d) Tipo de muestreo

Aleatorio: Todos los elementos de la población tienen la misma posibilidad de ser escogidos

### e) Criterios de selección de las unidades de muestreo

- Criterios de inclusión

Ratas de la cepa *taiep* y Sprague-Dawley

Ratas macho

Edad: 1 mes y 6 meses

- Criterios de exclusión

Ratas hembra

Ratas de otra cepa

Ratas de otras edades

- Criterios de eliminación

Ratas que muestren un cuadro clínico de enfermedad.

#### **f) Definición del grupo control**

Ratas de la cepa Sprague-Dawley

#### **Variables y definición de variables**

- Variable independiente

Edad de la rata

Regiones cerebrales

- Variable dependiente

Determinaciones inmunológicas

#### **g) Manejo estadístico de los datos y pruebas estadísticas**

Los valores serán la media  $\pm$  SEM de tres determinaciones realizadas por triplicado. Las pruebas estadísticas serán de tipo paramétricas, los datos serán analizados con una t de Student no apareada.

#### **h) Aspectos bioéticos**

Todos los procedimientos siguieron las normas de acuerdo a la “Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” de México y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales. Todos los esfuerzos fueron realizados para minimizar el sufrimiento de los animales.

**Riesgos de la investigación:** No existen riesgos en esta investigación.

## METODOLOGÍA

### 1. Manejo de animales

Las ratas *taiep* y las ratas Sprague-Dawley fueron obtenidas del Bioterio de Instituto de Fisiología, BUAP. Los animales se mantuvieron bajo un ciclo de luz-oscuridad (12-12 h), con encendido de la luz a las 0700 horas a una temperatura de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , con alimento y agua ad libitum. Los animales fueron sacrificados a diferentes edades (15 días, 1, 3, 6 y 8 meses). Lo animales siguieron la “Guía de cuidado y uso de animales de laboratorio” de México y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales, evitando el sufrimiento de los animales.

### 2. Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

Cinco  $\mu\text{g}$  del homogenizado de proteínas totales de las diferentes muestras se completaron a un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  con buffer de carbonato para sensibilizar las placas de ELISA, y se colocaron en cada pozo de la placa durante 16 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, los pozos se lavaron con PBS-Tween 0.1%; los sitios inespecíficos se bloquearon con albúmina de suero bovino 0.5% durante 20 min. Inmediatamente se lavó con PBS-Tween 0.1%, y se adicionó el primer anticuerpo para cada proteína durante dos horas a temperatura ambiente. Se lavó y se adicionó el segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa de rábano, se lava con PBS-Tween y se le agregó el sustrato ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbencil-tiazolina-6-sulfónico). Finalmente, la placa se leyó en un lector de ELISA (Bio-Rad Benchmark) a 415 nm [Harlow, 1990].

### **3. Procesamiento de tejido para inclusión en parafina**

Los cerebros se colocaron para su inclusión en parafina en el procesador de tejidos Leica ST5010 Autostainer XL. Los pasos de procesamiento de tejido fueron: Fijación (Formaldehído al 4%), deshidratación con alcoholes (80%, 96% y 100%), aclaramiento (Xilol absoluto) y parafina a 56 °C. Los tejidos fueron colocados en bloques utilizando casetes de plástico.

### **4. Procesamiento de cortes histológicos**

Los cortes histológicos se realizaron en un micrótopo rotatorio manual Leica RM2125 RTS, realizando el corte a 3 micras de grosor se prepararon los portaobjetos colocando poli-L-lisina y finalmente se fijaron en la plancha con termostato a una temperatura de 56-58 °C.

### **5. Tinción con hematoxilina y eosina**

Se colocaron los tejidos en una canastilla metálica por 30 minutos dentro de un horno a 60 °C, posteriormente, se dejaron enfriar un poco. Los pasos de la tinción fueron: Desparafinación (Xilol absoluto), rehidratación (alcoholes 100%, 96% y agua corriente), tinción con hematoxilina, alcohol ácido, viraje (Carbonato de litio), tinción con eosina, deshidratación (alcohol al 96% y 100%), aclaramiento (Xilol absoluto) y conservación con resina.

### **6. Inmunofluorescencia indirecta**

Las laminillas se colocaron a tratar en una canastilla metálica por 30 minutos como mínimo a 56-59°C para fundir la parafina; posteriormente ya

estando tibio se colocaron en Xilol para desparafinar. Después se realizó un proceso de rehidratación con diferentes concentraciones de alcoholes (100%, 96% y agua corriente), después se colocaron en un vaso coplin con una solución de Buffer de citratos y se lleva 5 minutos a 90°C. Seguido a esto se permeabiliza con PBS-Tween 0.1% y luego se bloquearon con suero animal al 5%, se realizaron lavados con PBS-Tween 0.1% y se incubó el anticuerpo primario, después se lavó otra vez con PBS-Tween 0.1% para poder incubar el anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína (a partir de aquí se debe trabajar en oscuridad).

Al terminar, a los cortes se les colocó un protector de fluorescencia VectaShield con DAPI (fluorometro que se une al ácido nucleico) y se observaron en un microscopio de fluorescencia.

## **7. Procesamiento de tejidos para corte en microtomo de congelación**

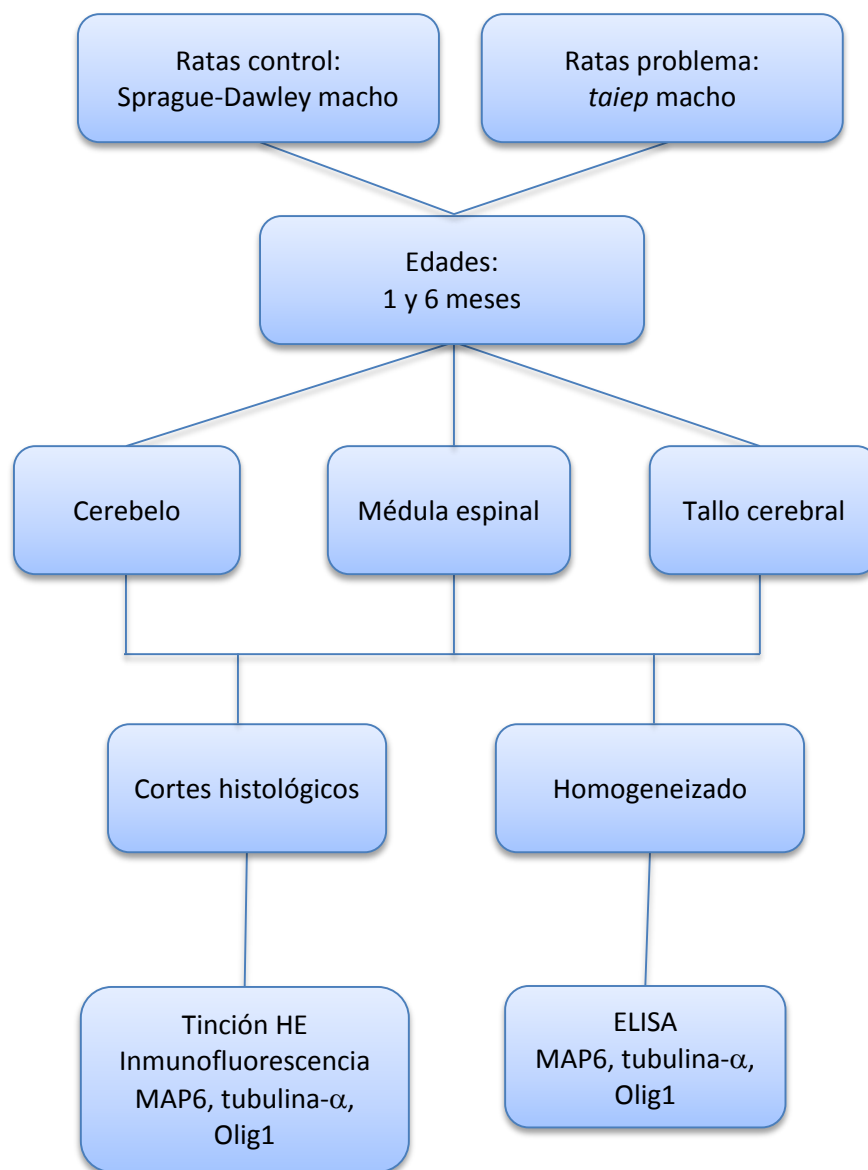
Se puso el tejido en un gradiente de sacarosa (mínimo 12 horas a 10% de sacarosa y posteriormente 2 horas en solución al 30% de sacarosa). Una vez tratado se colocó en el microtomo de deslizamiento Leica SM2010 R, al cual previamente se le puso la bandeja de congelación con adaptador y se le adicionó el hielo seco hasta que el metal cambie a un color blanco, una vez listo se colocaron unas gotas de PBS 1x para sujetar el tejido. Se esperó a que el tejido estuviera congelado para empezar a rebajar y obtener los cortes.

## **8. Análisis estadístico**

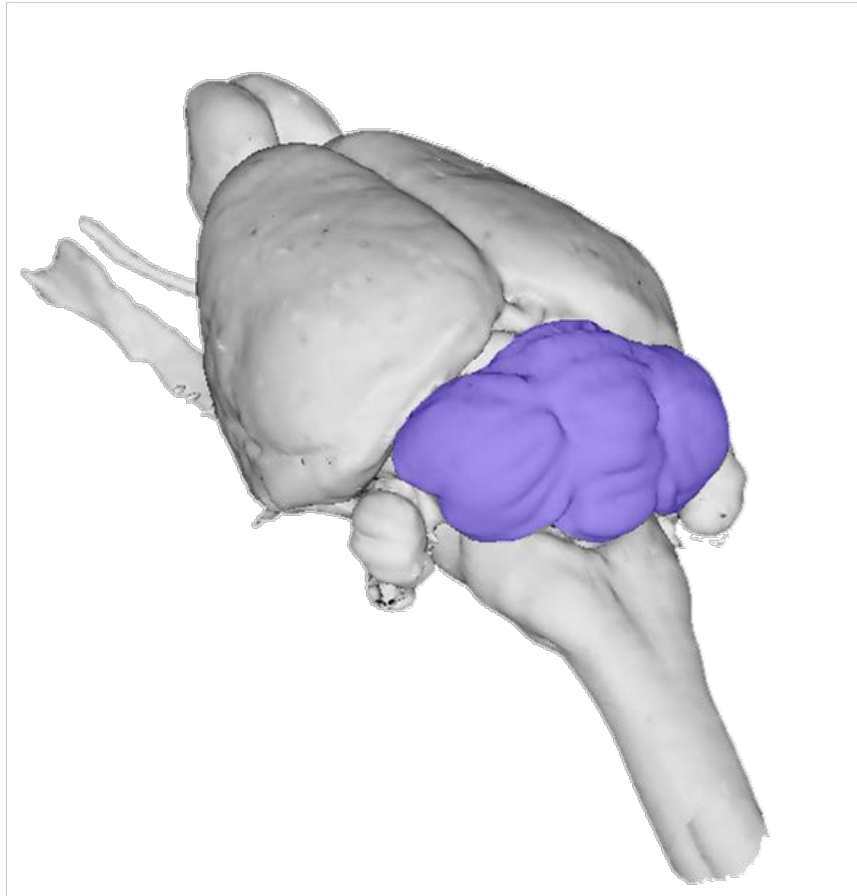
Los valores graficados representan la media  $\pm$  SEM de tres determinaciones realizadas por triplicado de una  $n = 5$  animales con un  $p < 0.05$ . Las pruebas

estadísticas fueron de tipo paramétrico, los datos fueron analizados con una t de Student no apareada. Las gráficas y análisis fueron realizados en el software Graphpad Prism 5.

## DIAGRAMA DE TRABAJO



## RESULTADOS

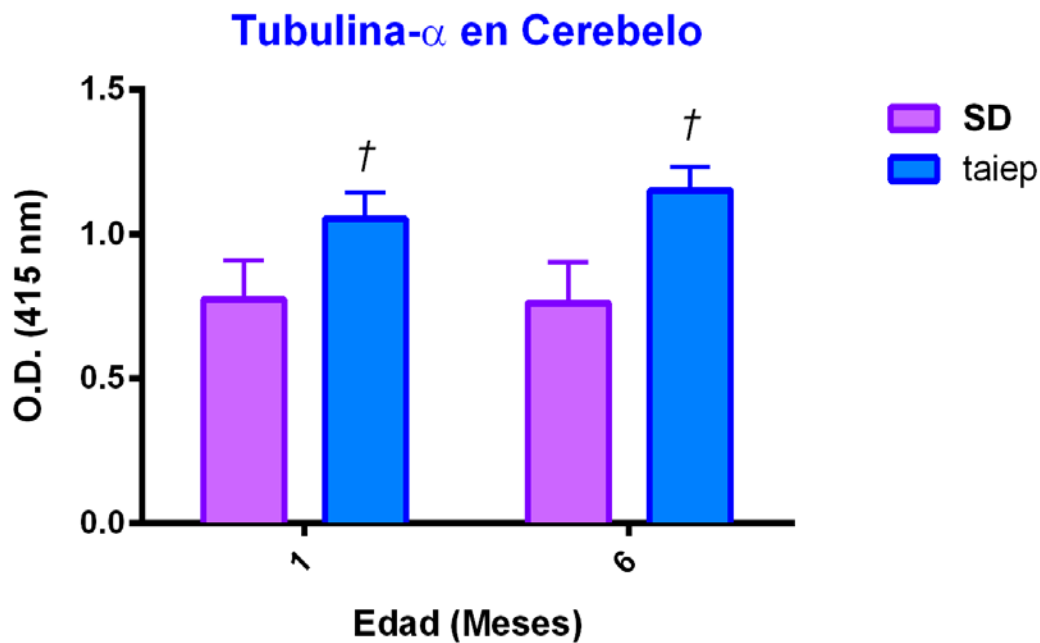


## CEREBELO

## Ensayo inmunoenzimático de ELISA

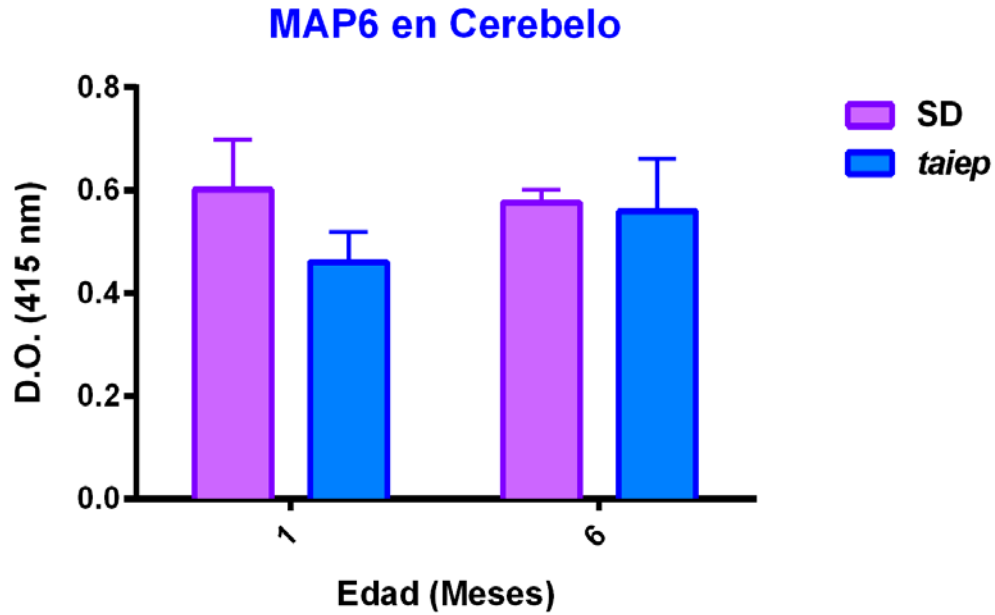
Los siguientes resultados corresponden al análisis semicuantitativo por el ensayo inmunoenzimático ELISA en el cerebelo, entre el control (rata Sprague-Dawley) y el problema (rata *taiep*), en las edades de 1 y 6 meses.

En la figura 3 se muestra los resultados para tubulina alfa, en cerebelo de la rata *taiep*, a los 6 meses de edad hubo un incremento de tubulina alfa del  $38.8\% \pm 0.05\%$  con respecto a su control. En la edad de 1 mes de edad no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la rata SD y *taiep*.



**Fig. 3 Incremento de Tubulina alfa en cerebelo de rata *taiep*.** La densidad óptica (O.D) de los niveles proteicos de tubulina alfa fue determinada por ELISA. Los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM de una  $n = 5$  animales. †,  $p < 0.05$ , t de Student. SD; Sprague-Dawley.

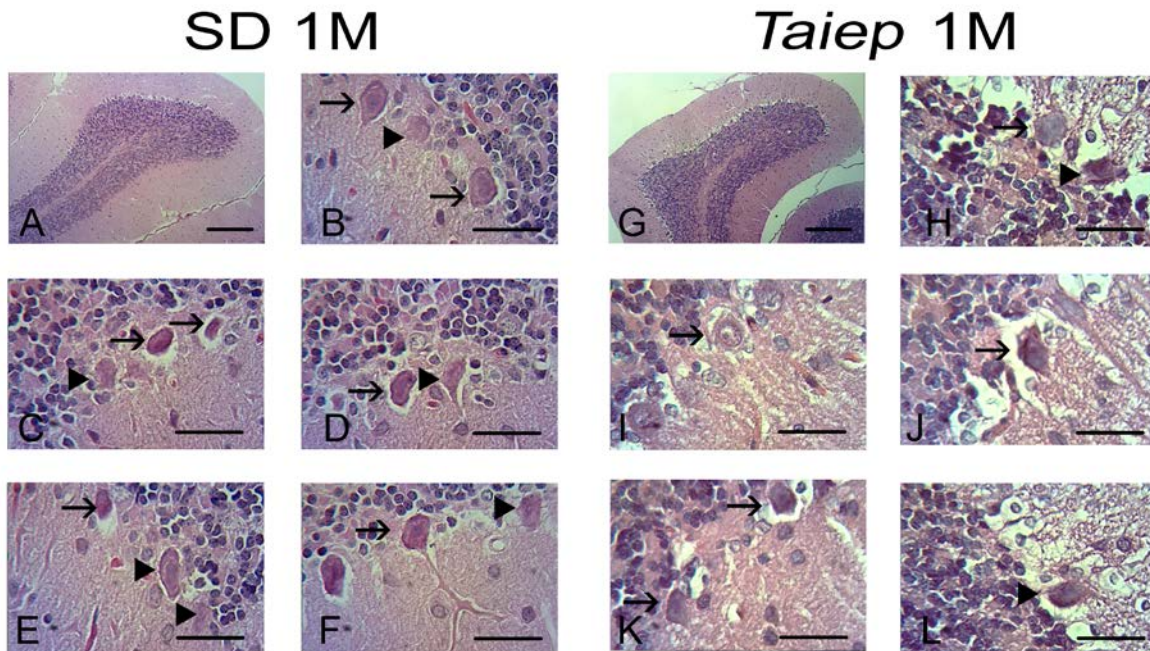
En la figura 4 se hace evidente que no existen diferencias estadísticamente significativas para los niveles de MAP6 en cerebelo de rata *taiep* con respecto al control, esto en ambas edades.



**Fig. 4 MAP6 en cerebelo de rata *taiep*.** La densidad óptica (O.D) de los niveles proteicos de MAP6 fue determinado por ELISA. Los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM de una n = 5 animales. †,  $p < 0.05$ , t de Student. SD; Sprague-Dawley.

### Estudio histológico con la tinción de Hematoxilina y Eosina

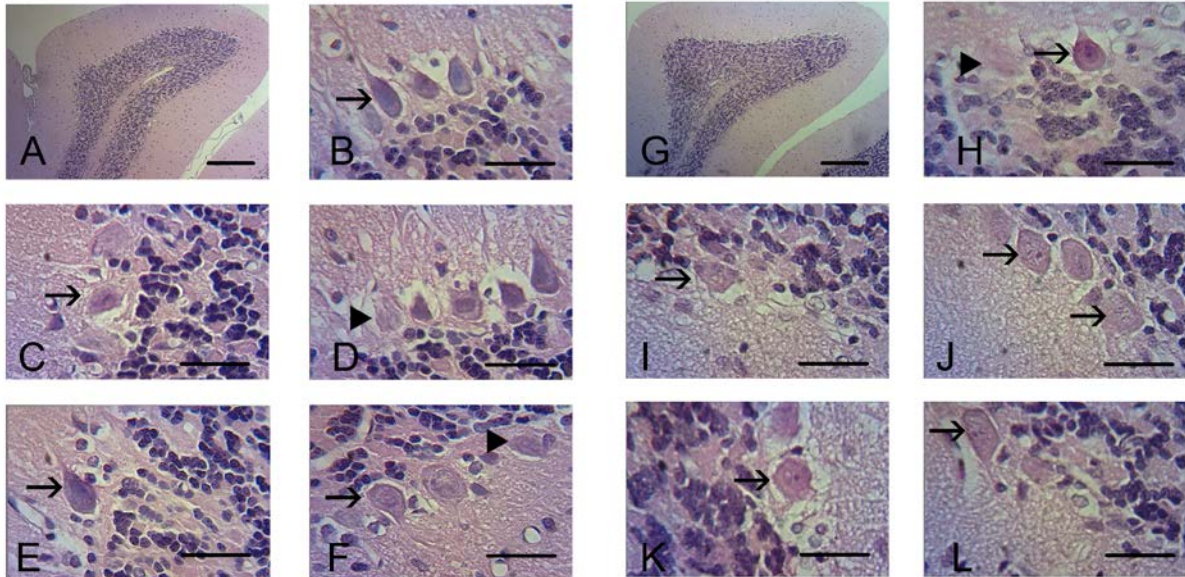
Las siguientes fotografías y gráficas corresponden a los resultados obtenidos de cortes de cerebelo de las ratas Sprague-Dawley y *taiep*, de 1 y 6 meses de edad. Los resultados muestran que en la rata *taiep* existe un mayor número de células picnóticas que en la rata SD de 1 mes de edad.



**Fig. 5 Estudio histológico en cerebelo de rata *taiep* al 1 mes de edad.** Para el control SD 1 mes se observa [A] Micrografía 10x del lóbulo Folium cerebelar. Las siguientes corresponden a micrografías a 40x: (B) Neuronas de purkinje sanas (Flechas) y en proceso necrótico (Punta de flecha), [C] Células picnóticas, probablemente apoptóticas (Flechas) y células necróticas (Punta de flecha), [D] Célula picnótica (Flecha), célula sana (Punta de flecha), [E] Célula picnótica (Flecha) y neuronas opacas, posible necrosis (Punta de flecha), [F] Célula sana (Flecha) y necrótica (Punta de flecha). Para la rata *taiep* se observa [G] Micrografía 10x del lóbulo cerebelar. Las siguientes corresponden a micrografías a 40x: [H] Necrosis (Flecha) y apoptosis (Punta de flecha), [I] Neuronas de purkinje sana (Flecha), [J y K] Células picnóticas (Flechas) indicando apoptosis, [L] Célula picnótica (Punta de flecha). Las micrografías corresponden a una tinción de Hematoxilina y Eosina. Las barras corresponden a una medida de 100  $\mu$ m.

## SD 6M

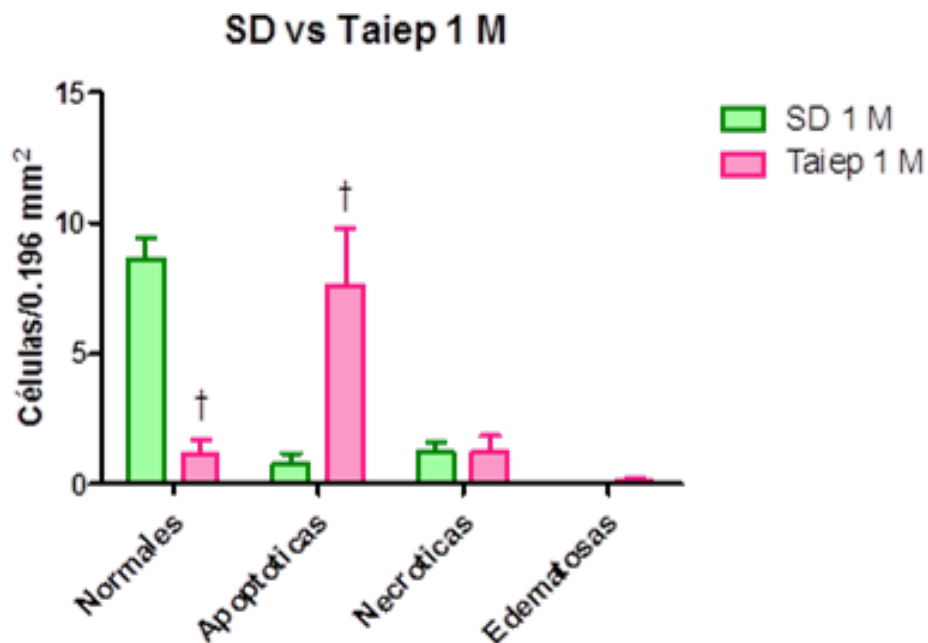
## *Taiep* 6M



**Fig. 6 Estudio histológico en cerebelo de rata *taiep* a los 6 meses de edad.** Para el control SD 6 meses se observa [A] Micrografía 10x del lóbulo Folium cerebelar. Las siguientes corresponden a micrografías a 40x: [B, E y F] Neuronas de purkinje sanas (Flechas), [C, D y F] Necrosis celular (Punta de flecha). Para la rata *taiep* se observa [G] Micrografía 10x del lóbulo Folium cerebelar. Las siguientes corresponden a micrografías a 40x: [H] Neurona de purkinje sana (Flecha) y célula necrótica (Punta de flecha), [I-L] Marcada muerte celular por necrosis (Flechas). Las micrografías corresponden a una tinción de Hematoxilina y Eosina. Las barras corresponden a una medida de 100  $\mu$ m.

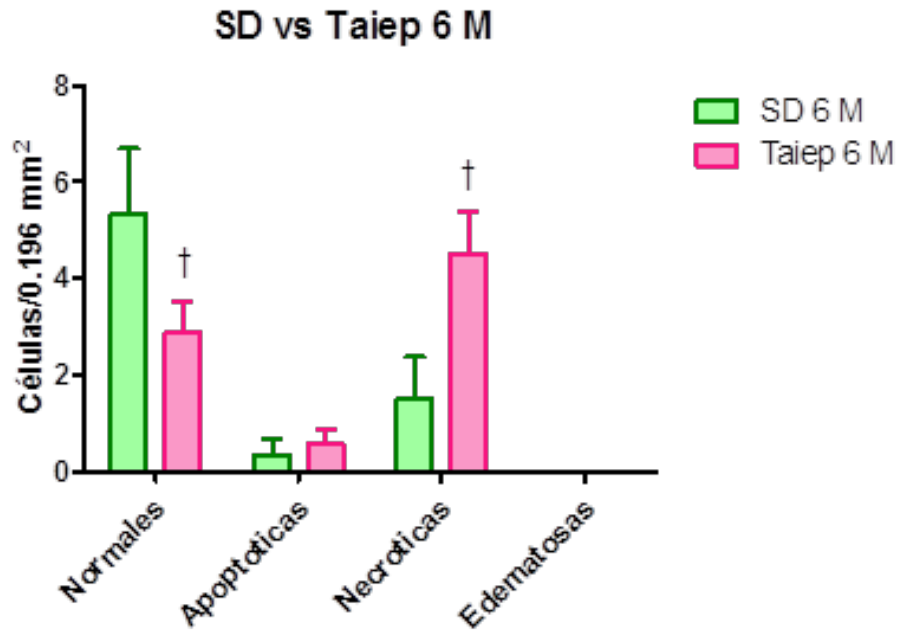
## Muerte neuronal en cerebello de rata *taiep*

La figura 7 muestra que al comparar el número de neuronas de Purkinje por campo en la rata *taiep* de 1 mes, ésta presenta una disminución del 748.9%  $\pm$  1.763% en las células sanas, mientras que se presenta un aumento del 680%  $\pm$  4.9% en la cantidad de apoptosis celular; todo esto comparando con la rata control Sprague-Dawley.



**Fig. 7 Niveles de muerte celular en neuronas de Purkinje de rata *taiep* de 1 mes de edad.** Los valores corresponde a la media  $\pm$  SEM de una n = 5 animales. †, p < 0.05, t de Student.

En la figura 8 se muestra que la rata *taiep* de 6 meses presenta una disminución del 260%  $\pm$  0.84% en las células sanas, mientras que se observa un aumento del 300%  $\pm$  1.7% en la cantidad de necrosis celular; todo esto comparando con la rata control Sprague-Dawley.



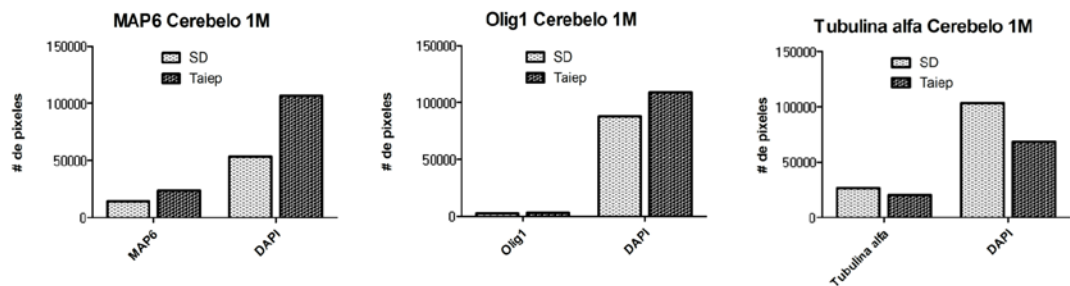
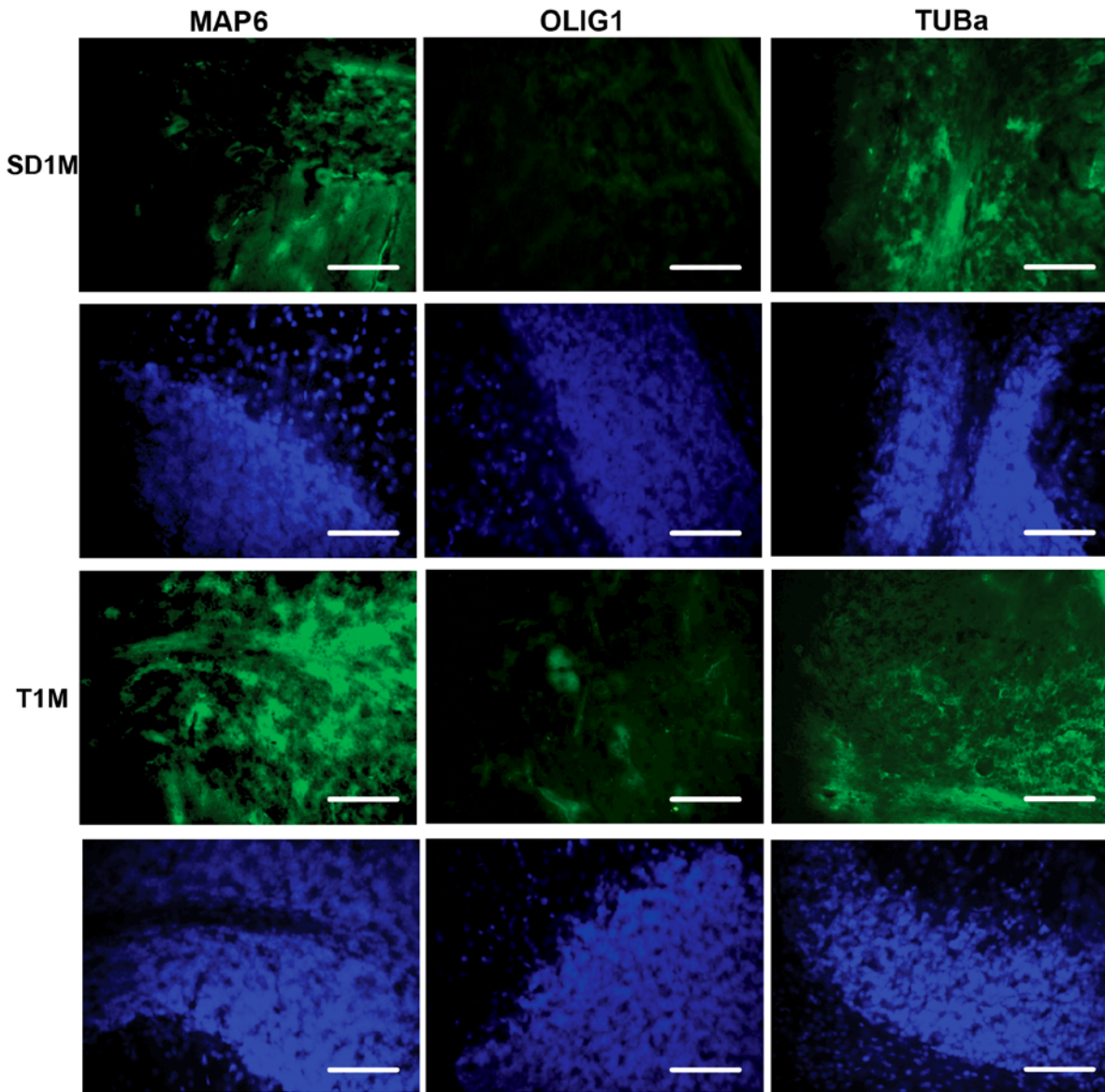
**Fig. 8 Niveles de muerte celular en neuronas de Purkinje de rata *taiep* de 6 meses de edad.** Los valores corresponde a la media  $\pm$  SEM de una n = 5 animales. †,  $p < 0.05$ , t de Student.

### Inmunofluorescencia indirecta

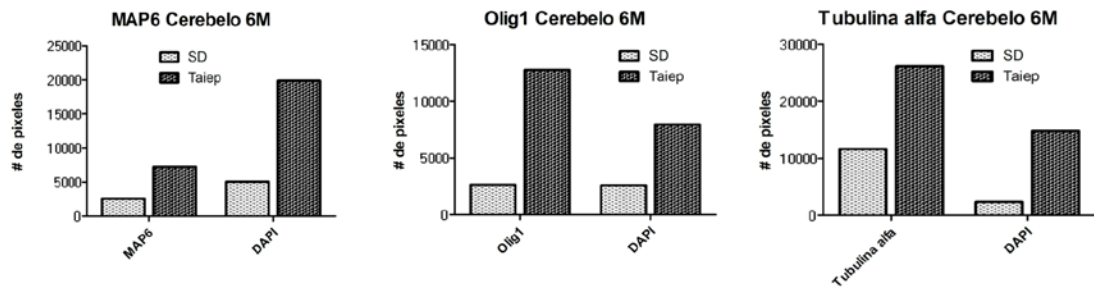
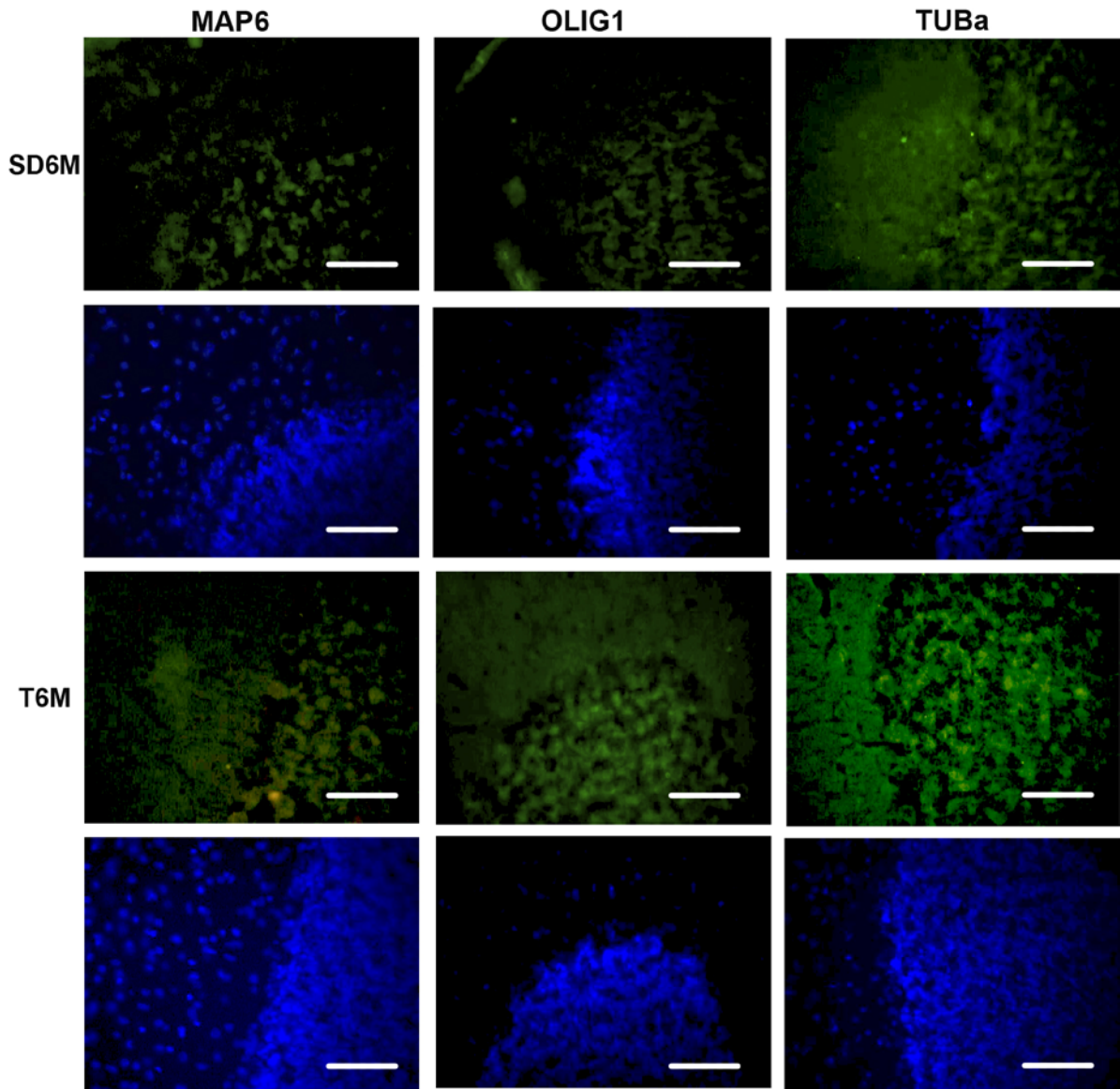
A continuación se muestran los resultados de la técnica de inmunofluorescencia indirecta contra MAP6, Olig1 y tubulina alfa en cortes sagitales de cerebelo de rata *taiep* y Sprague-Dawley de 1 y 6 meses de edad.

En cerebelo se encontró un incremento de la intensidad de fluorescencia para la MAP6 de 65.7%, para Olig1 fue de 20.5% al mes de edad y Para Tubulina alfa se encontró un decremento de 24% (Fig. 9). A los 6 meses de edad, para MAP6 del 182%, para Oli1 de 383% y para Tubulina alfa de 124% a los 6 meses de edad a los 6 meses de edad en la rata *taiep* cuando se compara con la rata SD (Fig. 10).

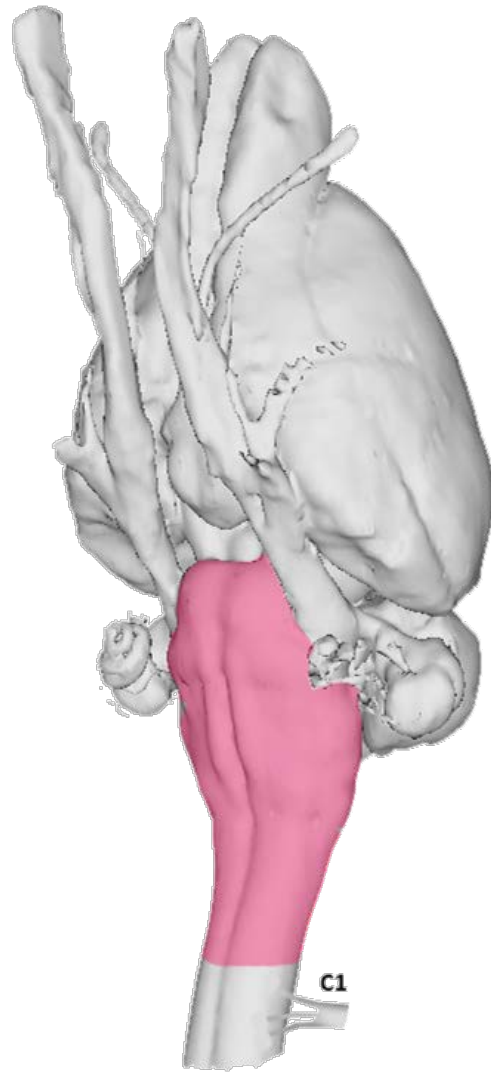
Mientras que en el tallo cerebral se encontró un incremento de 461% para MAP6, de 124% para Olig1 y del 92% para tubulina alfa al mes de edad (Fig. 14.), y de 706% para MAP6, de 448% para Olig1 para los 6 meses de edad (Fig. 16).



**Fig. 9. Inmunofluorescencia indirecta contra MAP6, Olig1 y tubulina alfa en cerebelo de rata *taiep* de 1 mes de edad.** En la imagen se observa en verde el marcaje para MAP6, Olig1 y tubulina alfa con fluoresceína y en azul, DAPI (núcleos). La barra corresponde a 200  $\mu$ m



**Fig. 10** Inmunofluorescencia indirecta contra MAP6, Olig1 y tubulina alfa en cerebelo de rata *taiep* de 6 meses de edad. En la imagen se observa en verde la fluoresceína (para cada anticuerpo) y en azul, DAPI (núcleos). La barra corresponde a 200  $\mu$ m

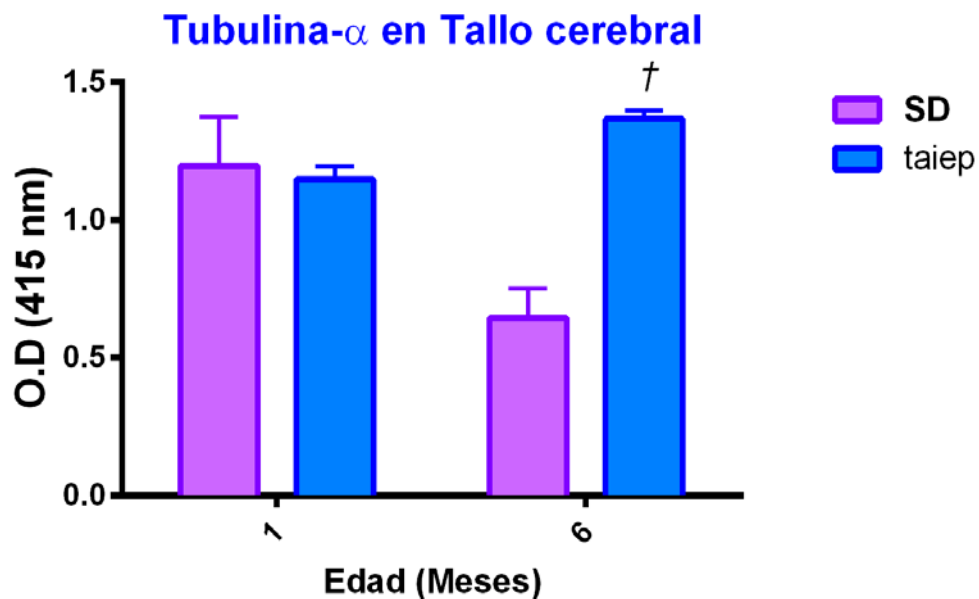


## TALLO CEREBRAL

## Ensayo inmunoenzimático de ELISA

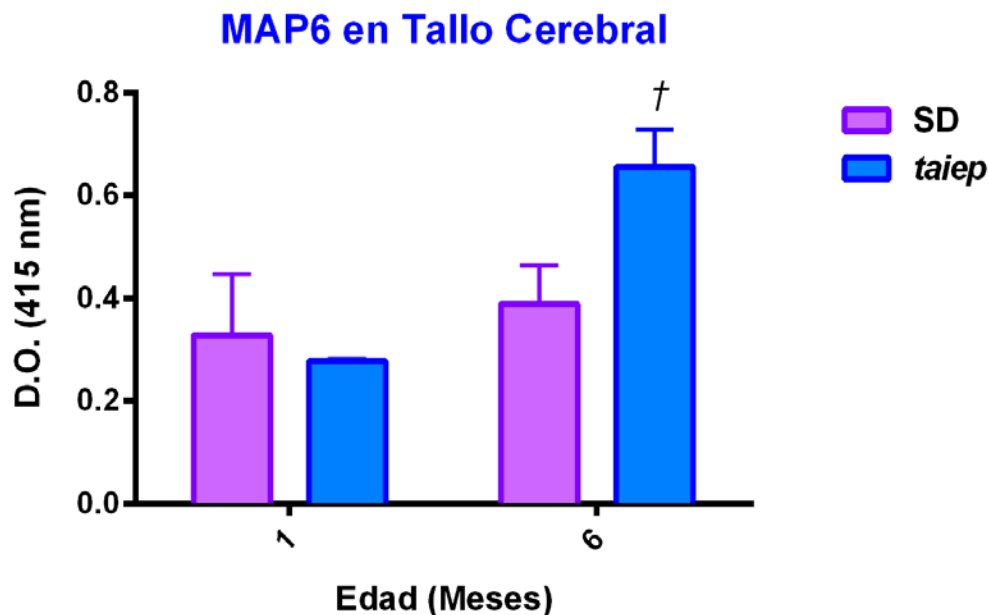
Los siguientes resultados corresponden al análisis semicuantitativo por el ensayo inmunoenzimático ELISA en tallo cerebral, entre el control (rata Sprague-Dawley) y el problema (rata *taiep*), en las edades de 1 y 6 meses.

En tallo cerebral de la rata *taiep* de 6 meses de edad (Figura 11) se observa un incremento de tubulina alfa del  $72.3\% \pm 0.015\%$  con respecto a su control. Para el mes de edad no hubo diferencias estadísticamente significativas entre control y problema.



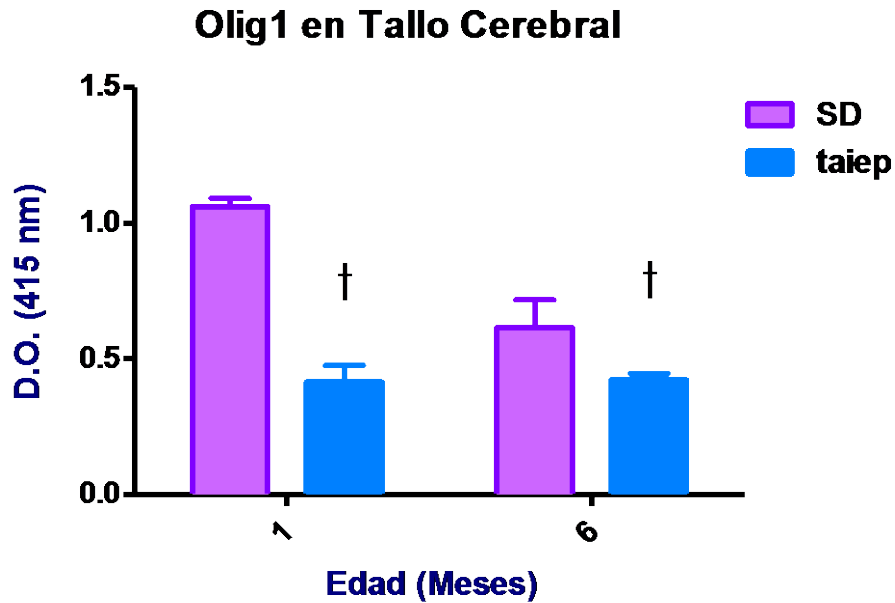
**Fig. 11 Incremento de Tubulina alfa en tallo cerebral de rata *taiep*. La densidad óptica (O.D) de los niveles proteicos de tubulina alfa fue determinada por ELISA. Los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM de una  $n = 5$  animales. †,  $p < 0.05$ , t de Student. SD; Sprague-Dawley.**

La figura 12 muestra el incremento de MAP6 en tallo cerebral en la rata *taiep* de 6 meses de edad con respecto a su control, este incremento fue de  $26.68\% \pm 0.07\%$ . Mientras que el grupo de un mes de edad no hubo diferencias estadísticamente significativas.



**Fig. 12 Incremento de MAP6 en tallo cerebral de rata *taiep*.** La densidad óptica (O.D) de los niveles proteicos de MAP6 fue determinado por ELISA. Los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM de una  $n = 5$  animales. †,  $p < 0.05$ , t de Student. SD; Sprague-Dawley.

En la figura 13 se muestra la disminución de los niveles proteicos de Olig1 en tallo cerebral de rata *taiep*, para la edad de un mes se observa una disminución del  $-64.60\% \pm 0.19\%$ , mientras que para la edad de 6 meses de edad se encontró una disminución del  $19.23\% \pm 0.147$ .

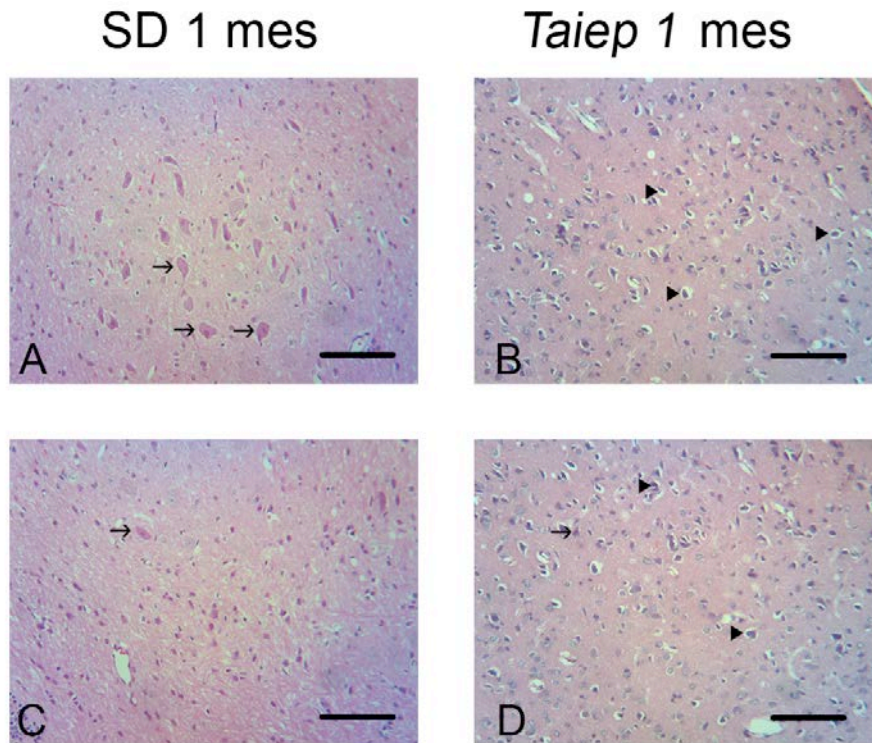


**Fig. 13** Disminución de Olig1 en tallo cerebral de rata *taiep*. La densidad óptica (O.D) de los niveles proteicos de olig1 fue determinado por ELISA. Los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM de una n = 5 animales. †,  $p < 0.05$ , t de Student. SD; Sprague-Dawley.

### Estudio histológico con la tinción de Hematoxilina y Eosina

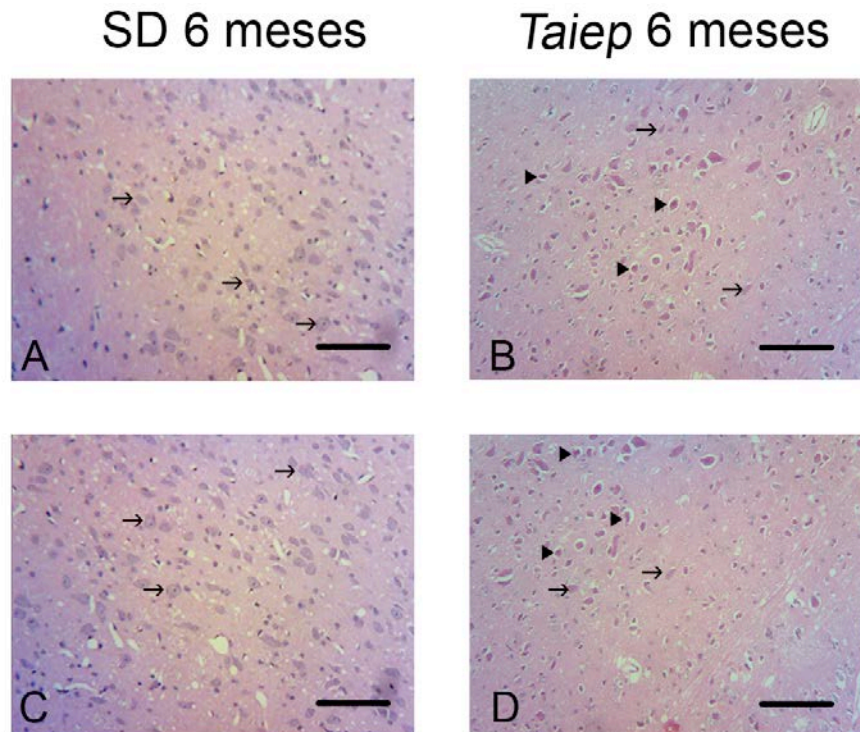
Las siguientes fotografías corresponden a los resultados obtenidos de cortes de tallo cerebral de las ratas Sprague-Dawley y *taiep*, de 1 y 6 meses de edad.

En las figuras 14 y 15 se observan células de gran tamaño, que podrían corresponder a neuronas gigantocelulares de la formación reticular o de los núcleos pontocerebelosos.



**Fig. 14 Estudio histológico en tallo cerebral de rata *taiep* al 1 mes de edad. [A y C]**

Se observa que en el control existe gran número de neuronas funcionales (Flechas), mientras que en la rata *taiep* [B y D] se muestran una gran cantidad células picnóticas (Puntas de flecha) que sugieren muerte celular por apoptosis y escasas células sanas (Flechas). Las micrografías corresponden a una amplificación de 10x. Las barras corresponden a una medida de 100  $\mu\text{m}$ .



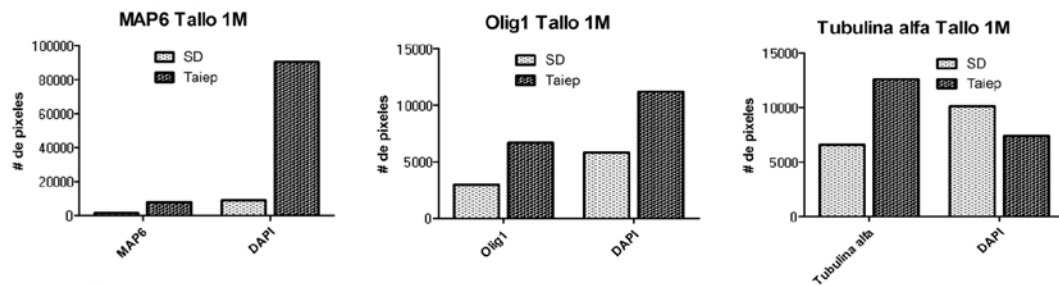
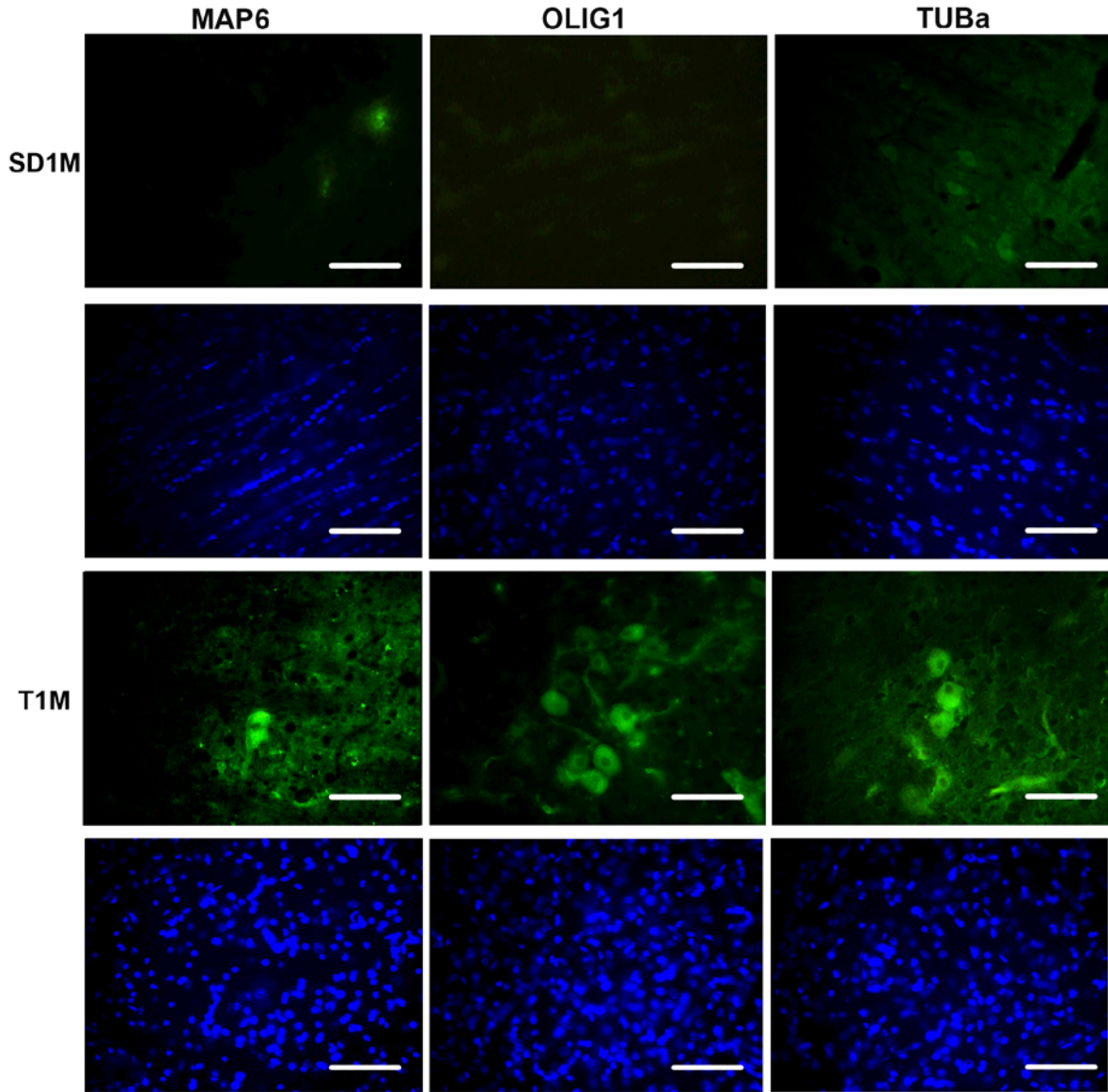
**Fig. 15 Estudio histológico en tallo cerebral de rata taiep a los 6 meses de edad. [A y**

**C]** Se muestra que en el control se encuentran gran número de neuronas funcionales (Flechas), mientras que en la rata *taiep* [B y D] se observa una población heterogénea de células sanas (Flechas) y de picnóticas que podrían indicar muerte celular por apoptosis (Puntas de flecha). Las micrografías corresponden a una amplificación de 10x. Las barras corresponden a una medida de 100  $\mu\text{m}$ .

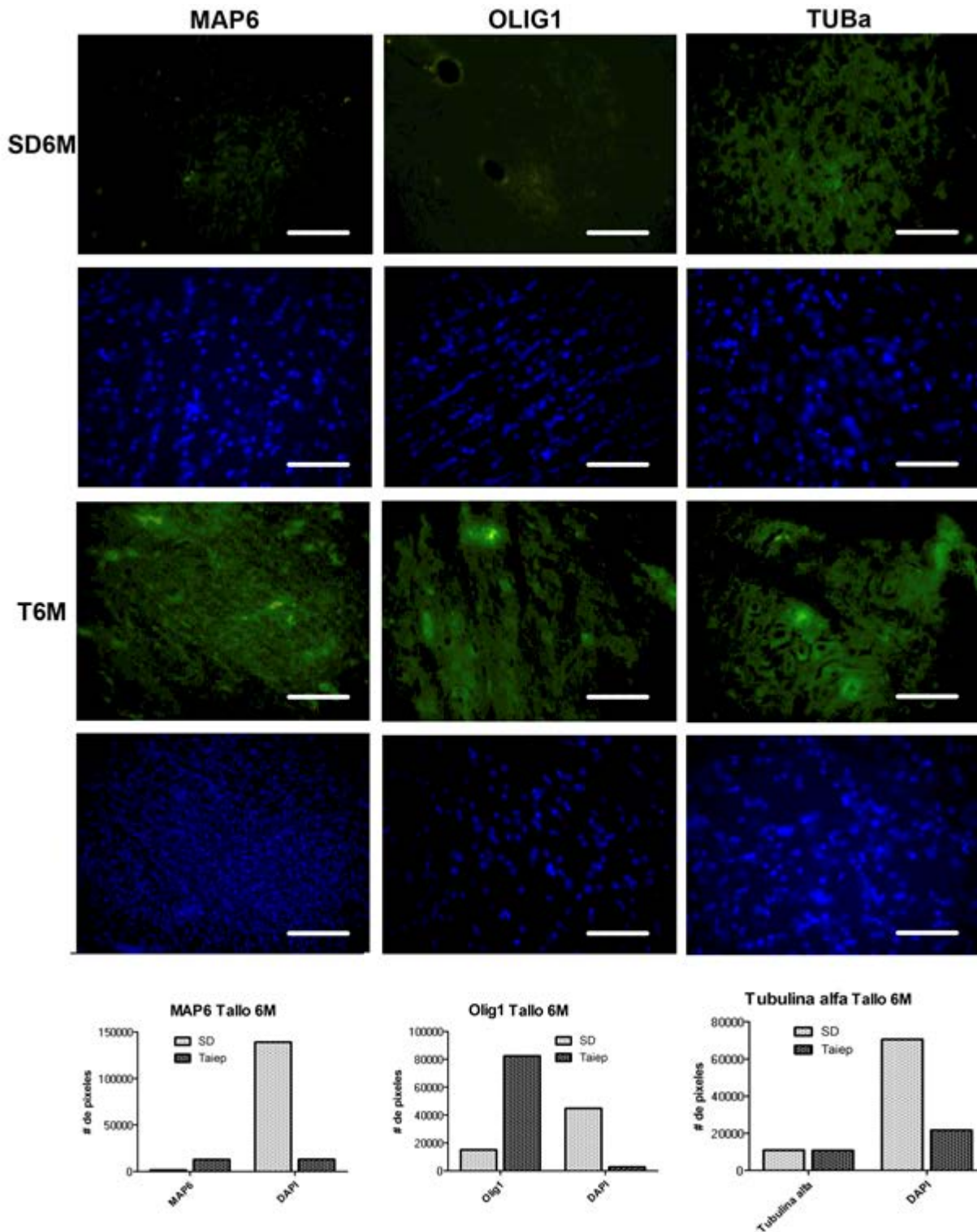
### Inmunofluorescencia indirecta

A continuación se muestran los resultados de la técnica de inmunofluorescencia indirecta contra MAP6, Olig1 y tubulina alfa en cortes sagitales de tallo cerebral de rata *taiep* y Sprague-Dawley de 1 y 6 meses de edad.

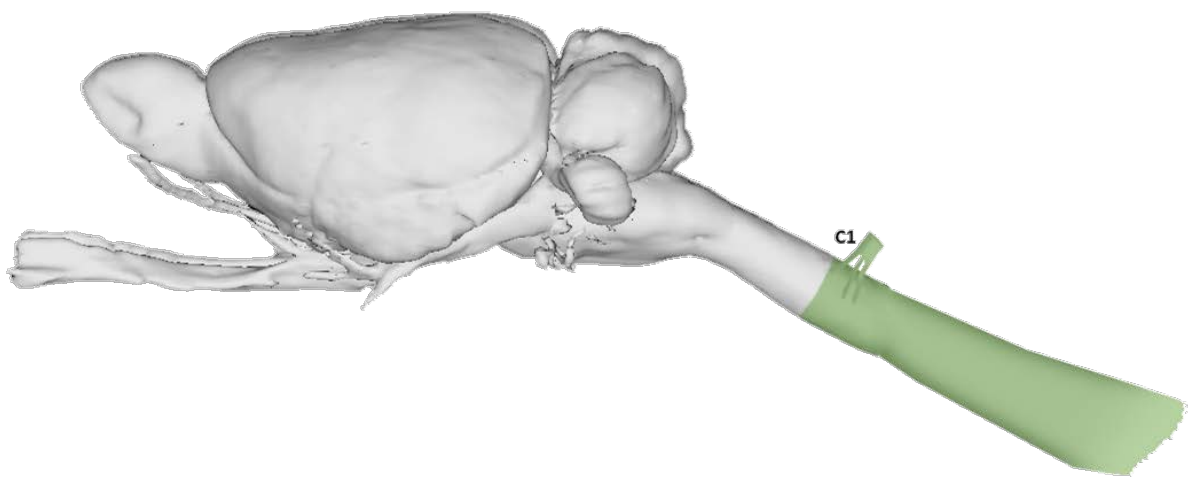
En el tallo cerebral se encontró un incremento de 461% para MAP6, de 124% para Olig1 y del 92% para tubulina alfa al mes de edad (Fig. 16.), y de 706% para MAP6, de 448% para Olig1 para los 6 meses de edad (Fig. 17).



**Fig. 16** Inmunofluorescencia indirecta contra MAP6, Olig1 y tubulina alfa en tallo cerebral de rata *taiep* de 1 mes de edad. En la imagen se observa en verde la fluoresceina (para cada anticuerpo) y en azul, DAPI (nucleos). Se puede apreciar la presencia de cuerpos celulares que exhiben las tres marcas, presumiblemente OPCs. La barra corresponde a 200  $\mu$ m



**Fig. 17** Inmunofluorescencia indirecta contra MAP6, Olig1 y tubulina alfa en tallo cerebral de rata *taiep* de 6 meses de edad. En la imagen se observa en verde la fluoresceína (para cada anticuerpo) y en azul, DAPI (núcleos). La barra corresponde a 200  $\mu$ m

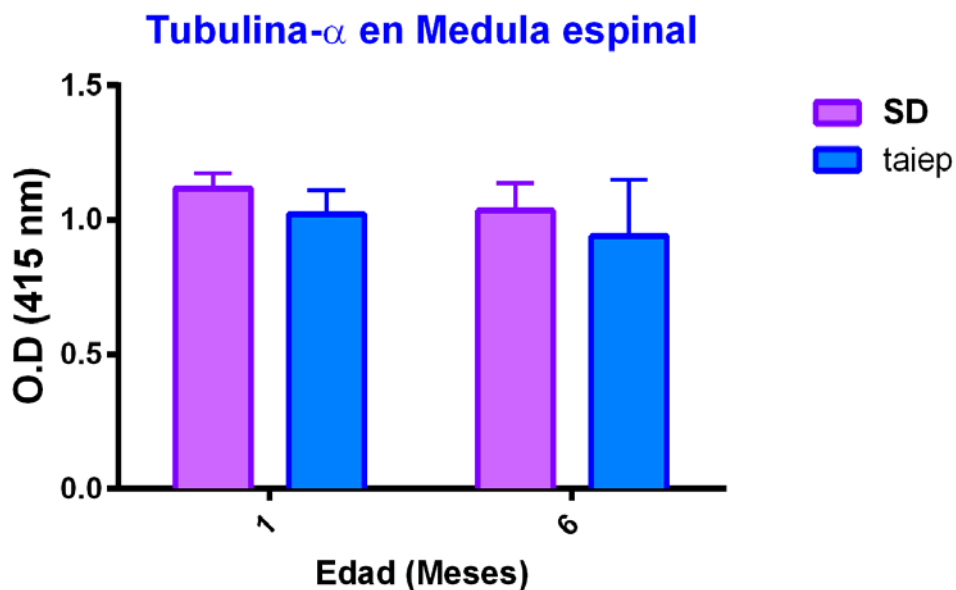


## MÉDULA ESPINAL

## Ensayo inmunoenzimático de ELISA

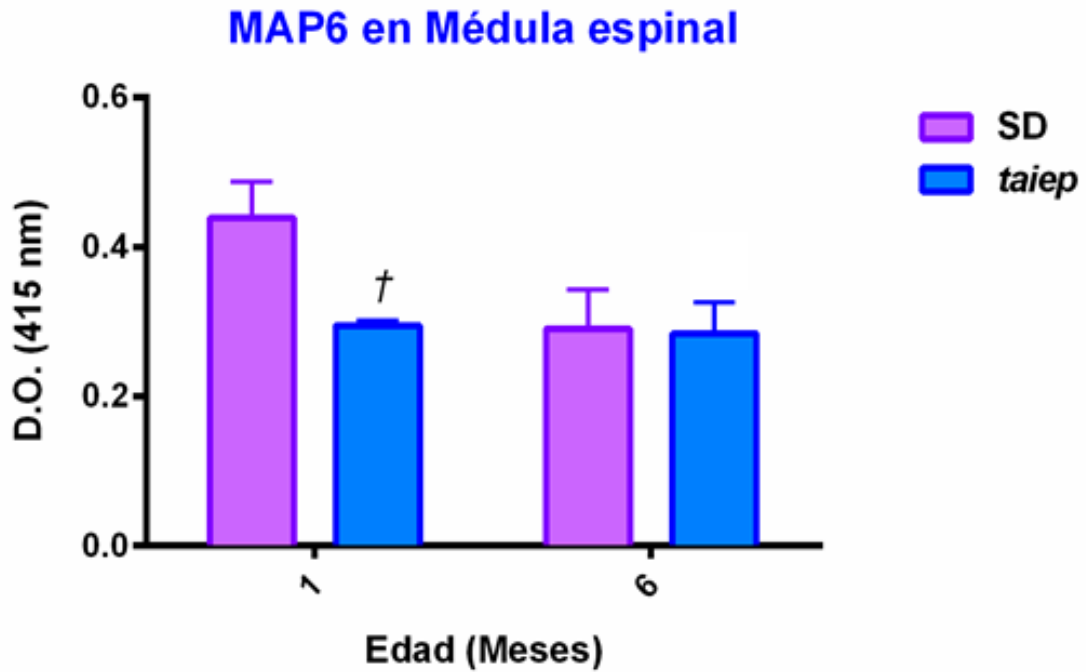
Los siguientes resultados corresponden al análisis semicuantitativo por el ensayo inmunoenzimático ELISA en médula espinal en rata SD y *taiep* de 1 y 6 meses de edad.

En la figura 18 se muestran los resultados de las determinaciones de los niveles de tubulina alfa en médula espinal de rata *taiep* de 1 y 6 meses de edad, con sus respectivos controles, donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.



**Fig. 18 Tubulina alfa en médula espinal de rata *taiep*. La densidad óptica (O.D) de los niveles proteicos de tubulina alfa fue determinada por ELISA. Los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM de una  $n = 5$  animales. †,  $p < 0.05$ , t de Student. SD; Sprague-Dawley.**

En la figura 19 se observa la disminución de MAP6 en médula espinal de la rata *taiep* de 1 mes de edad, este decremento corresponde al  $-14.33\% \pm 0.004\%$ . Los niveles de MAP6 en médula espinal de rata *taiep* de 6 meses de edad no mostraron diferencias estadísticamente significativas.



**Fig. 19** Disminución de MAP6 en médula espinal de rata *taiep*. La densidad óptica (O.D) de los niveles proteicos de MAP6 fue determinado por ELISA. Los valores corresponden a la media  $\pm$  SEM de una n = 5 animales. †,  $p < 0.05$ , t de Student. SD; Sprague-Dawley.

## DISCUSIÓN

La rata *taiep* mostró el incremento de los niveles proteicos de tubulina alfa y de MAP6 en cerebelo y tallo cerebral a los 6 meses de edad, además muestra un decremento de los oligodendrocitos premielinizantes en el tallo cerebral desde un mes de edad, asociado con la presencia de muerte celular por apoptosis y necrosis desde el mes de edad.

La rata *taiep* se diferencia de otras mutantes de mielina por tener un periodo de vida prolongado y la capacidad de reproducirse a pesar de la pérdida continua de mielina. El defecto afecta mayormente al cerebro que a la médula espinal y para las edades de 1 y 2 meses no se observa gran diferencia contra los controles, mientras que a los 12 meses sufre una pérdida casi total de mielina.<sup>2</sup>

En la rata *taiep* a los 6 meses de edad se encontró un incremento de tubulina alfa, el cual puede estar asociado con la acumulación de microtúbulos reportado que incrementa con la edad. La acumulación de microtúbulos forman estructuras tubovesiculares cercanas a la región cis-Golgi, esto es una extensión del retículo endoplásmico liso en un sentido secretor. Entonces se sugiere que no hay un correcto transporte de proteínas para la síntesis de mielina.<sup>5</sup>

En la rata *taiep* los hemisferios se encuentran más afectados que la medula espinal, esto podría ser porque la mielinización inicia en dirección caudo-rostral, siendo la medula espinal una de las primeras zonas mielinizadas antes que los hemisferios. Además de que se observa que la pérdida de mielina es más severa en los axones de menor calibre que en los de mayor calibre encontrados en la medula espinal. Además, la rata *taiep* presenta una disminución en los niveles de proteínas de mielina como PLP, MBP, CNP y MAG.<sup>87</sup>

Los resultados presentados muestran que la rata *taiep* presenta un aumento de tubulina  $\alpha$  en cerebelo y tallo a los 6 meses de edad, mientras que en 1 mes de edad no se observan diferencias. Song y cols., encontraron que había un incremento de la tubulina beta y la proteína asociada al microtúbulo tau en el soma y prolongaciones de oligodendrocitos de rata *taiep* en cultivos celulares y en

Velo medular anterior (cerebelo), lo cual concuerda con la acumulación de microtúbulos observado en las micrografías.<sup>1,73</sup>

La rata *taiep* presenta una acumulación de los microtúbulos, sugiriendo que el proceso de despolimerización está afectado en la rata. Una proteína que participa en la estabilización de los microtúbulos es la MAP6, que fue encontrada incrementada a los 6 meses de edad en el tallo cerebral. La isoforma MAP6d1 se ha demostrado que está asociada con el aparato de Golgi a través de palmitoilación de su dominio N-terminal y ha sido demostrado su unión a actina. Además, se ha encontrado en la mitocondria en el espacio intermembranal, y puede multimerizar al microtúbulo vía segmento de unión, siendo propiedades tanto de MAP6d1 como MAP6-N.<sup>88</sup> Otras funciones de la MAP6 es en la conectividad entre las fibras y el desarrollo del fornix (parte del sistema límbico), regulando la elongación axonal por Semaforina 3E, sugiriendo que MAP6 es crítico para la guía de las moléculas con el efecto de señalización intracelular durante el desarrollo de los tractos axonales cerebrales.<sup>89</sup> Existe evidencia que una sobreexpresión neuronal del gen de MAP6 en conjunto con la disminución de la expresión de proteínas como TMEM106B incrementa el trafico retrogrado de lisosomas en las dendritas, inhibiendo su extensión y favoreciendo la neurodegeneración.<sup>19</sup><sup>90</sup> La desregulación de la expresión de MAP6 también se ha asociado con la alteración de la integración sináptica en enfermedades como la esquizofrenia, tanto en modelos animales como en estudios postmortem de cerebros humanos.<sup>88,91,92</sup> Estos resultados muestran que pudiera estar afectando otras funciones como son la sinaptogénesis y en la extensión de neuritas.

El decremento de Olig1 se ha visto que resulta en una hipomielinización como lo han descrito en ratones null, con déficit de la mielinización temprana en la medula espinal, sugiriendo que Olig1 tiene un papel único en promover el compromiso de la célula progenitora de oligodendrocito, diferenciación y subsecuente mielinización primaria en el cerebro, pero no en la medula espinal.<sup>11</sup>

## CONCLUSIÓN

El incremento de la proteína MAP6 pudiera estar involucrada en la estabilización y acumulación de microtúbulos en la rata *taiep*, y con un déficit del factor de transcripción Olig1 y con ello la disminución de la presencia de células precursoras de oligodendrocitos, contribuyendo al proceso hipomielinizante.

## **APÉNDICE**

### **1. Manejo de animales**

#### **Extracción en fresco**

La rata es anestesiada con una administración de hidrato de cloral a una dosis de 350 mg/Kg vía intraperitoneal a cada rata. Una vez anestesiada se coloca a la rata decúbito supino, se realiza una incisión por debajo de las costillas hasta visualizar el diafragma y se corta, una vez hecho esto se cortan las costillas lateralmente para levantar la caja torácica y se sostiene con unas pinzas kellys.

Se extrae sangre (con la jeringa de 3-5 mL) directamente del ventrículo izquierdo del corazón de la rata, se deposita en tubos de vidrio y se centrifuga a 3500 rpm para después separar el suero. Se extraen los órganos de interés y se se almacenan a -80 °C.

#### **Perfusión y fijación de tejidos**

Se realiza lo mismo que en la extracción en fresco, pero en lugar de extraer sangre, se perfunde con PBS 1x para blanquear los tejidos y después con paraformaldehído 4% para fijar y poder extraer los órganos de interés. Estos se almacenan en paraformaldehido 4% a 8-12 °C.

#### **Determinación de proteínas por el método de Coomasie**

En esta reacción el colorante de Coomasie se une de manera principal a los extremos  $\text{NH}_3^+$  de las proteínas, así como a los residuos de aminoácidos básico y aromáticos, especialmente orgánicos, generando un cambio en la absorción del colorante de 465-620 nm. La intensidad del color es proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra, comparado siempre con una curva estándar.

Reactivos: Solución de albumina 1 mg/mL y reactivo de Coomasie.

Curva estándar			
Tubo	Concentración (μM)	Concentración de albumina	Agua destilada (μL)
Blanco	Blanco	0	500
1	0.25	0.25	499.75
2	0.5	0.5	499.5
3	1	1	499
4	2	2	498
5	5	5	495
6	7.5	7.5	492.5
7	10	10	490

Una vez obtenida la curva estándar se cuantifican las muestras.

## 2. Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmoadsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un substrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro.

Los pasos utilizados en este trabajo son los siguientes:

1. Cuantificación de proteínas totales en las muestras
2. Normalizar los valores de las muestras con la fórmula:

$$V_2 = \frac{C_2 V_1}{\alpha}$$

$$V_1 = 1 \mu\text{L}$$

$V_2$ = Volumen de muestra que se necesita para tener 5 $\mu$ g de proteína

$C_2$ = 5 $\mu$ g

$\alpha$ = Concentración de proteína por muestra

3. Colocar la mitad del volumen del buffer de carbonatos en cada pozo
4. Colocar el volumen de cada muestra de acuerdo a la normalización
5. Colocar el buffer de carbonatos restante y homogeneizar
6. Incubar a 37 °C por dos horas o 4°C durante toda la noche
7. Lavar 3 veces con PBS-Tween 0.1%, un minuto por lavado
8. Bloquear con albumina al 5%, 200  $\mu$ L en cada pozo
9. Lavar 2 veces con PBS-Tween 0.1%, un minuto por lavado
10. Depositar 100  $\mu$ L de Anticuerpo primario en cada pozo, incubar 2 horas a TA
11. Lavar 3 veces con PBS-Tween 0.1%, un minuto por lavado
12. Depositar 100  $\mu$ L de anticuerpo secundario en cada pozo, incubar 2 horas a TA
13. Lavar 3 veces con PBS-Tween 0.1%, un minuto por lavado
14. Agregar 150  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por cada 10 mL de ABTS
15. Colocar 100  $\mu$ L de ABTS-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en cada pozo, incubar 15 minutos a TA
16. Leer a 415 nm.

### **3. Procesamiento de tejido para inclusión en parafina**

Una vez que el tejido es fijado, es necesario procesarlo para poder ser cortado en secciones 3  $\mu$ m de grueso. El tejido es previamente fijado (esto evita autolisis y putrefacción), deshidratado (para esto se utilizan alcoholes en

concentraciones crecientes hasta llegar al alcohol puro), aclarado (Se utiliza xilol ya que además de aclarar el tejido es medio soluble para la parafina) y por ultimo incluido en parafina.

Los pasos utilizados son los siguientes:

- Fijación (Formaldehido al 4%)
- Deshidratación con alcoholes (80%, 96% y 100%)
- Aclaramiento (Xilol absoluto)
- Inclusión (Parafina a 56 °C)

Los tejidos son colocados en bloques utilizando casetes de plástico.

#### **4. Procesamiento de cortes histológicos**

##### **Para muestras incluidas en parafina**

Previamente se preparan los portaobjetos necesarios colocando poli-L-lisina que se une a moléculas de lisina a través del grupo amino épsilon y por el grupo carboxilo. Esto hace que funcione como un pegamento para el tejido. Los bloques son colocados en una plancha a 4 °C para garantizar un corte preciso.

Se coloca el casete de plástico en un micrótopo, se va cortando la parafina (cortes de 10 micras o más, para rebajar el casete) y una vez retirado el exceso de parafina se realizan los cortes a 3 y 5 micras de grosor (depende del tipo de tejido). Colocación del corte y extensión con un pincel en el baño de flotación

Finalmente fijados en la plancha con termostato a una temperatura de 56-58 °C y guardados a temperatura ambiente en cajas para evitar la exposición a polvo y otros contaminantes.

### **Corte en microtomo de congelación**

Se coloca el tejido en un gradiente de sacarosa (mínimo 12 a 10% de sacarosa y posteriormente 2 h en solución al 30% de sacarosa). Una vez tratado se coloca en el microtomo de deslizamiento Leica SM2010 R, al cual previamente se le coloca la bandeja de congelación con adaptador y se le adiciona el hielo seco hasta que el metal cambie a un color blanco, una vez listo se colocan unas gotas de PBS 1x para sujetar el tejido. Este se debe colocar con cuidado y esperar a que se congele para empezar a rebajar y obtener los cortes.

Los cortes son finalmente fijados en la plancha con termostato a una temperatura de 56-58 °C y utilizados inmediatamente para proceder con el protocolo de inmunofluorescencia.

### **3. Tinción con hematoxilina y eosina**

Este método consta de una fase inicial, en la que se van a colorear los núcleos celulares con la hematoxilina y una fase interior de contraste citoplasmático y de los componentes extra celulares con la eosina.

El agente químico activo de la Hematoxilina es la Hemateína, que se forma por la oxidación de la hematoxilina, este proceso de oxidación o maduración ocurre cuando la Hematoxilina se deja en reposo por algunos días o semanas después de añadir el oxidante (yodato de sodio).

La Eosina es un colorante que se emplea para teñir estructuras citoplasmáticas, este colorante se puede utilizar en base acuosa o alcohólica para darles contraste al teñido nuclear de la hematoxilina.

Los pasos utilizados son los siguientes:

1. Desparafinación: Colocar los tejidos 30 min. a 60 °C, dejar enfriar

2. Cambio de medio:

- Xilol 1, 20 minutos
- Xilol 2, 5 minutos
- Alcohol:Xilol, 10 baños

3. Hidratación:

- Alcohol absoluto 1, 10 baños
- Alcohol absoluto 2, 10 baños
- Alcohol 96% 1, 10 baños
- Alcohol 96% 2, 10 baños
- Agua corriente, 10 baños

4. Fase inicial:

- Hematoxilina, 10 minutos
- Lavado
- Reposo en agua corriente 1:00-1:30 minutos
- Alcohol acido, 1 baño

5. Viraje

- Lavado

- Carbonato de litio, 10 baños
- Lavado

#### 6. Fase interior

- Alcohol 96%, 1 baño
- Eosina, 15 baños

#### 7. Deshidratación

- Alcohol 96% 1, 10 baños
- Alcohol 96% 2, 10 baños
- Alcohol absoluto 1, 10 baños
- Alcohol absoluto 2, 10 baños

#### 8. Cambio de medio y aclaramiento

- Alcohol:xilol, 10 baños
- Xilol 1, 5 minutos
- Xilol 2, 20 minutos mínimo

#### 9. Montaje

El propósito del montaje es preservar el tejido teñido para su siguiente manejo examinación al microscopio. El cubre se une al corte por medio de un agente llamado medio de montaje el cual puede ser bálsamo de Canadá o resina Entellan de Merck

#### 4. Inmunofluorescencia indirecta

El procedimiento tiene como fin exponer los antígenos del tejido, el bloqueo de sitios específicos con suero animal esto tiene como propósito saturar las uniones de los anticuerpos (más que nada IgG) con proteínas para posteriormente incubar los anticuerpos primario y secundario. El anticuerpo primario reconocerá al Ag del tejido mientras que el secundario reconocerá al primer anticuerpo colocado y este además está marcado con un fluorocromo. Dependiendo el tipo de fluorocromo es el filtro que se deberá utilizar al observar en un microscopio confocal para visualizar diferentes colores.

Los pasos utilizados son los siguientes:

##### 1. Desparafinación:

- Colocar los tejidos 30 min. a 56-59°C, dejar enfriar
- Xilol, 5 min.

##### 2. Hidratación:

- Alcohol absoluto 1, 10 baños
- Alcohol absoluto 2, 10 baños
- Alcohol 96% 1, 10 baños
- Alcohol 96% 2, 10 baños
- Agua corriente, 1 baño

##### 3. Desenmascaramiento:

- Colocar en un coplin con Buffer de citratos
- Llevar a 90°C por 5 minutos

##### 4. Permeabilización:

3 lavados con PBS-Tween (10 min. c/u)

5. Bloqueo de sitios específicos:

- PBS-Tween 0.1%, 5-10 % de suero animal y albumina 3%
- Incubar 1 hora a temperatura ambiente (TA)
- 3 lavados con PBS-Tween (10 min. c/u)

6. Incubación con el anticuerpo primario

- Ac. 1°, 1.5 % de suero de animal, PBS-Tween 0.1%
- Incubar 2 horas a TA o toda la noche a 8-12°C
- 3 lavados con PBS-Tween (10 min. c/u)

7. Incubación con el anticuerpo secundario

- Ac. 2°, 1.5 % de suero de animal, PBS-Tween 0.1%
- Incubar 2 horas a TA
- 3 lavados con PBS-Tween (10 min. c/u)

## BIBLIOGRAFIA

1. Song, J., Goetz, B.D., Kirvell, S.L., Butt, A.M. & Duncan, I.D. Selective myelin defects in the anterior medullary velum of the taiep mutant rat. *Glia* **33**, 1-11 (2001).
2. Duncan, I.D., Lunn, K.F., Holmgren, B., Urba-Holmgren, R. & Brignolo-Holmes, L. The taiep rat: a myelin mutant with an associated oligodendrocyte microtubular defect. *Journal of neurocytology* **21**, 870-884 (1992).
3. Cortes Mdel, C., Gavito, B., Ita, M.L., Valencia, J. & Eguibar, J.R. Characterization of the spontaneous and gripping-induced immobility episodes on taiep rats. *Synapse* **58**, 95-101 (2005).
4. Lunn, K.F., Clayton, M.K. & Duncan, I.D. The temporal progression of the myelination defect in the taiep rat. *Journal of neurocytology* **26**, 267-281 (1997).
5. Couve, E., Cabello, J.F., Krsulovic, J. & Roncagliolo, M. Binding of microtubules to transitional elements in oligodendrocytes of the myelin mutant taiep rat. *Journal of neuroscience research* **47**, 573-581 (1997).
6. Ross, J.L., Ali, M.Y. & Warshaw, D.M. Cargo transport: molecular motors navigate a complex cytoskeleton. *Current opinion in cell biology* **20**, 41-47 (2008).
7. Kirby, B.B., *et al.* In vivo time-lapse imaging shows dynamic oligodendrocyte progenitor behavior during zebrafish development. *Nature neuroscience* **9**, 1506-1511 (2006).
8. Miron, V.E., Kuhlmann, T. & Antel, J.P. Cells of the oligodendroglial lineage, myelination, and remyelination. *Biochimica et biophysica acta* **1812**, 184-193 (2011).
9. Wegener, A., *et al.* Gain of Olig2 function in oligodendrocyte progenitors promotes remyelination. *Brain : a journal of neurology* **138**, 120-135 (2015).
10. Paes de Faria, J., Kessar, N., Andrew, P., Richardson, W.D. & Li, H. New Olig1 null mice confirm a non-essential role for Olig1 in oligodendrocyte development. *BMC neuroscience* **15**, 12 (2014).
11. Dai, J., Bercury, K.K., Ahrends, J.T. & Macklin, W.B. Olig1 function is required for oligodendrocyte differentiation in the mouse brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **35**, 4386-4402 (2015).
12. Armstrong, R.C., Le, T.Q., Flint, N.C., Vana, A.C. & Zhou, Y.X. Endogenous cell repair of chronic demyelination. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **65**, 245-256 (2006).
13. Le Clainche, C. & Carlier, M.F. Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiological reviews* **88**, 489-513 (2008).
14. Simpson, P.B. & Armstrong, R.C. Intracellular signals and cytoskeletal elements involved in oligodendrocyte progenitor migration. *Glia* **26**, 22-35 (1999).
15. Yan, H. & Rivkees, S.A. Hepatocyte growth factor stimulates the proliferation and migration of oligodendrocyte precursor cells. *Journal of neuroscience research* **69**, 597-606 (2002).
16. Canoll, P.D., Kraemer, R., Teng, K.K., Marchionni, M.A. & Salzer, J.L. GGF/neuregulin induces a phenotypic reversion of oligodendrocytes. *Molecular and cellular neurosciences* **13**, 79-94 (1999).
17. Siskova, Z., Baron, W., de Vries, H. & Hoekstra, D. Fibronectin impedes "myelin" sheet-directed flow in oligodendrocytes: a role for a beta 1 integrin-mediated PKC signaling pathway in vesicular trafficking. *Molecular and cellular neurosciences* **33**, 150-159 (2006).

18. Baron, W., Shattil, S.J. & ffrench-Constant, C. The oligodendrocyte precursor mitogen PDGF stimulates proliferation by activation of alpha(v)beta3 integrins. *The EMBO journal* **21**, 1957-1966 (2002).
19. Colognato, H., *et al.* CNS integrins switch growth factor signalling to promote target-dependent survival. *Nature cell biology* **4**, 833-841 (2002).
20. Attwell, S., Mills, J., Troussard, A., Wu, C. & Dedhar, S. Integration of cell attachment, cytoskeletal localization, and signaling by integrin-linked kinase (ILK), CH-ILKBP, and the tumor suppressor PTEN. *Molecular biology of the cell* **14**, 4813-4825 (2003).
21. Zhang, W., Wu, Y., Wu, C. & Gunst, S.J. Integrin-linked kinase regulates N-WASp-mediated actin polymerization and tension development in tracheal smooth muscle. *The Journal of biological chemistry* **282**, 34568-34580 (2007).
22. Chun, S.J., Rasband, M.N., Sidman, R.L., Habib, A.A. & Vartanian, T. Integrin-linked kinase is required for laminin-2-induced oligodendrocyte cell spreading and CNS myelination. *The Journal of cell biology* **163**, 397-408 (2003).
23. Liang, X., Draghi, N.A. & Resh, M.D. Signaling from integrins to Fyn to Rho family GTPases regulates morphologic differentiation of oligodendrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**, 7140-7149 (2004).
24. Nobes, C.D. & Hall, A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**, 53-62 (1995).
25. Wolf, R.M., Wilkes, J.J., Chao, M.V. & Resh, M.D. Tyrosine phosphorylation of p190 RhoGAP by Fyn regulates oligodendrocyte differentiation. *Journal of neurobiology* **49**, 62-78 (2001).
26. Kramer-Albers, E.M. & White, R. From axon-glia signalling to myelination: the integrating role of oligodendroglial Fyn kinase. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **68**, 2003-2012 (2011).
27. Feltri, M.L. & Wrabetz, L. Laminins and their receptors in Schwann cells and hereditary neuropathies. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS* **10**, 128-143 (2005).
28. Colognato, H., *et al.* Identification of dystroglycan as a second laminin receptor in oligodendrocytes, with a role in myelination. *Development* **134**, 1723-1736 (2007).
29. Benninger, Y., *et al.* Beta1-integrin signaling mediates premyelinating oligodendrocyte survival but is not required for CNS myelination and remyelination. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**, 7665-7673 (2006).
30. Fitzner, D., *et al.* Myelin basic protein-dependent plasma membrane reorganization in the formation of myelin. *The EMBO journal* **25**, 5037-5048 (2006).
31. Gielen, E., *et al.* Rafts in oligodendrocytes: evidence and structure-function relationship. *Glia* **54**, 499-512 (2006).
32. Decker, L. & ffrench-Constant, C. Lipid rafts and integrin activation regulate oligodendrocyte survival. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**, 3816-3825 (2004).
33. Bryant, M.R., Marta, C.B., Kim, F.S. & Bansal, R. Phosphorylation and lipid raft association of fibroblast growth factor receptor-2 in oligodendrocytes. *Glia* **57**, 935-946 (2009).
34. Bansal, R., Kumar, M., Murray, K., Morrison, R.S. & Pfeiffer, S.E. Regulation of FGF receptors in the oligodendrocyte lineage. *Molecular and cellular neurosciences* **7**, 263-275 (1996).
35. Oh, L.Y., *et al.* Fibroblast growth factor receptor 3 signaling regulates the onset of oligodendrocyte terminal differentiation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**, 883-894 (2003).

36. Wilkins, A., Majed, H., Layfield, R., Compston, A. & Chandran, S. Oligodendrocytes promote neuronal survival and axonal length by distinct intracellular mechanisms: a novel role for oligodendrocyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**, 4967-4974 (2003).
37. Arvanitis, D.N., Min, W., Gong, Y., Heng, Y.M. & Boggs, J.M. Two types of detergent-insoluble, glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains from isolated myelin. *Journal of neurochemistry* **94**, 1696-1710 (2005).
38. Marta, C.B., *et al.* Myelin associated glycoprotein cross-linking triggers its partitioning into lipid rafts, specific signaling events and cytoskeletal rearrangements in oligodendrocytes. *Neuron glia biology* **1**, 35-46 (2004).
39. Kramer, E.M., Klein, C., Koch, T., Boytinck, M. & Trotter, J. Compartmentation of Fyn kinase with glycosylphosphatidylinositol-anchored molecules in oligodendrocytes facilitates kinase activation during myelination. *The Journal of biological chemistry* **274**, 29042-29049 (1999).
40. Sperber, B.R., *et al.* A unique role for Fyn in CNS myelination. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**, 2039-2047 (2001).
41. Klein, C., *et al.* Process outgrowth of oligodendrocytes is promoted by interaction of fyn kinase with the cytoskeletal protein tau. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**, 698-707 (2002).
42. Elder, G.A., Friedrich, V.L., Jr. & Lazzarini, R.A. Schwann cells and oligodendrocytes read distinct signals in establishing myelin sheath thickness. *Journal of neuroscience research* **65**, 493-499 (2001).
43. Michailov, G.V., *et al.* Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* **304**, 700-703 (2004).
44. Taveggia, C., *et al.* Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* **47**, 681-694 (2005).
45. Kim, J.Y., Sun, Q., Oglesbee, M. & Yoon, S.O. The role of ErbB2 signaling in the onset of terminal differentiation of oligodendrocytes in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**, 5561-5571 (2003).
46. Roy, K., *et al.* Loss of erbB signaling in oligodendrocytes alters myelin and dopaminergic function, a potential mechanism for neuropsychiatric disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 8131-8136 (2007).
47. Taveggia, C., *et al.* Type III neuregulin-1 promotes oligodendrocyte myelination. *Glia* **56**, 284-293 (2008).
48. Wang, Z., Colognato, H. & Ffrench-Constant, C. Contrasting effects of mitogenic growth factors on myelination in neuron-oligodendrocyte co-cultures. *Glia* **55**, 537-545 (2007).
49. Brinkmann, B.G., *et al.* Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system. *Neuron* **59**, 581-595 (2008).
50. Lundgaard, I., *et al.* Neuregulin and BDNF induce a switch to NMDA receptor-dependent myelination by oligodendrocytes. *PLoS biology* **11**, e1001743 (2013).
51. Boggs, J.M. & Wang, H. Co-clustering of galactosylceramide and membrane proteins in oligodendrocyte membranes on interaction with polyvalent carbohydrate and prevention by an intact cytoskeleton. *Journal of neuroscience research* **76**, 342-355 (2004).
52. Boggs, J.M., Gao, W. & Hirahara, Y. Myelin glycosphingolipids, galactosylceramide and sulfatide, participate in carbohydrate-carbohydrate interactions between apposed membranes and may form glycosynapses between oligodendrocyte and/or myelin membranes. *Biochimica et biophysica acta* **1780**, 445-455 (2008).
53. Boggs, J.M., *et al.* A glycosynapse in myelin? *Glycoconjugate journal* **21**, 97-110 (2004).

54. Boggs, J.M., Gao, W. & Hirahara, Y. Signal transduction pathways involved in interaction of galactosylceramide/sulfatide-containing liposomes with cultured oligodendrocytes and requirement for myelin basic protein and glycosphingolipids. *Journal of neuroscience research* **86**, 1448-1458 (2008).
55. Ozon, S., Guichet, A., Gavet, O., Roth, S. & Sobel, A. Drosophila stathmin: a microtubule-destabilizing factor involved in nervous system formation. *Molecular biology of the cell* **13**, 698-710 (2002).
56. Fletcher, G. & Rorth, P. Drosophila stathmin is required to maintain tubulin pools. *Current biology : CB* **17**, 1067-1071 (2007).
57. Liu, A., Muggirone, M., Marin-Husstege, M. & Casaccia-Bonnel, P. Oligodendrocyte process outgrowth in vitro is modulated by epigenetic regulation of cytoskeletal severing proteins. *Glia* **44**, 264-274 (2003).
58. Liu, A., et al. Expression of stathmin, a developmentally controlled cytoskeleton-regulating molecule, in demyelinating disorders. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**, 737-747 (2005).
59. Li, W., et al. Sirtuin 2, a mammalian homolog of yeast silent information regulator-2 longevity regulator, is an oligodendroglial protein that decelerates cell differentiation through deacetylating alpha-tubulin. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**, 2606-2616 (2007).
60. Tiwari-Woodruff, S.K., et al. OSP/claudin-11 forms a complex with a novel member of the tetraspanin super family and beta1 integrin and regulates proliferation and migration of oligodendrocytes. *The Journal of cell biology* **153**, 295-305 (2001).
61. Gow, A., et al. CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in Osp/claudin-11 null mice. *Cell* **99**, 649-659 (1999).
62. Chow, E., et al. Disrupted compaction of CNS myelin in an OSP/Claudin-11 and PLP/DM20 double knockout mouse. *Molecular and cellular neurosciences* **29**, 405-413 (2005).
63. Wallin, M. & Stromberg, E. Cold-stable and cold-adapted microtubules. *International review of cytology* **157**, 1-31 (1995).
64. Lodish, H.B., A.; Kaiser C. A.; Krieger, M.; Scott, M. P.; Bretscher, A.; Ploegh, H.; Matsudaira, P. *Molecular Cell Biology*, (2008).
65. Mitchison, T.K., M. W. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**, 237-242 (1984).
66. Oakley, B.R. An abundance of tubulins. *Trends in cell biology* **10**, 537-542 (2000).
67. Terada, N., et al. Beta IV tubulin is selectively expressed by oligodendrocytes in the central nervous system. *Glia* **50**, 212-222 (2005).
68. Nogales, E. Structural insight into microtubule function. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **30**, 397-420 (2001).
69. Idriss, H.T. Man to trypanosome: the tubulin tyrosination/detyrosination cycle revisited. *Cell motility and the cytoskeleton* **45**, 173-184 (2000).
70. Peris, L., et al. Tubulin tyrosination is a major factor affecting the recruitment of CAP-Gly proteins at microtubule plus ends. *The Journal of cell biology* **174**, 839-849 (2006).
71. Song, J., Goetz, B.D., Baas, P.W. & Duncan, I.D. Cytoskeletal reorganization during the formation of oligodendrocyte processes and branches. *Molecular and cellular neurosciences* **17**, 624-636 (2001).
72. Bulinski, J.C.G., G.G. Stabilization and posttranslational modification of microtubules during cellular morphogenesis. *BioEssays* **13**, 284-293 (1991).

73. Song, J., O'Connor L, T., Yu, W., Baas, P.W. & Duncan, I.D. Microtubule alterations in cultured taiep rat oligodendrocytes lead to deficits in myelin membrane formation. *Journal of neurocytology* **28**, 671-683 (1999).
74. Chapin, S.J. & Bulinski, J.C. Microtubule stabilization by assembly-promoting microtubule-associated proteins: a repeat performance. *Cell motility and the cytoskeleton* **23**, 236-243 (1992).
75. Horio, T. & Hotani, H. Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark-field microscopy. *Nature* **321**, 605-607 (1986).
76. Kowalski, R.J. & Williams, R.C., Jr. Microtubule-associated protein 2 alters the dynamic properties of microtubule assembly and disassembly. *The Journal of biological chemistry* **268**, 9847-9855 (1993).
77. Padilla, R., Lopez Otin, C., Serrano, L. & Avila, J. Role of the carboxy terminal region of beta tubulin on microtubule dynamics through its interaction with the GTP phosphate binding region. *FEBS letters* **325**, 173-176 (1993).
78. Ebnet, A., *et al.* Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease. *The Journal of cell biology* **143**, 777-794 (1998).
79. Richter-Landsberg, C. & Gorath, M. Developmental regulation of alternatively spliced isoforms of mRNA encoding MAP2 and tau in rat brain oligodendrocytes during culture maturation. *Journal of neuroscience research* **56**, 259-270 (1999).
80. Galiano, M.R., *et al.* Astrocytes and oligodendrocytes express different STOP protein isoforms. *Journal of neuroscience research* **78**, 329-337 (2004).
81. Bonnet, C., *et al.* Interaction of STOP with neuronal tubulin is independent of polyglutamylation. *Biochemical and biophysical research communications* **297**, 787-793 (2002).
82. Delphin, C., *et al.* MAP6-F is a temperature sensor that directly binds to and protects microtubules from cold-induced depolymerization. *The Journal of biological chemistry* **287**, 35127-35138 (2012).
83. Baratier, J., *et al.* Phosphorylation of microtubule-associated protein STOP by calmodulin kinase II. *The Journal of biological chemistry* **281**, 19561-19569 (2006).
84. Letournel, F., Bocquet, A., Dubas, F., Barthelaix, A. & Eyer, J. Stable tubule only polypeptides (STOP) proteins co-aggregate with spheroid neurofilaments in amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **62**, 1211-1219 (2003).
85. Job, D., Rauch, C.T. & Margolis, R.L. High concentrations of STOP protein induce a microtubule super-stable state. *Biochemical and biophysical research communications* **148**, 429-434 (1987).
86. Faivre, C., Legrand, C. & Rabie, A. The microtubular apparatus of cerebellar purkinje cell dendrites during postnatal development of the rat: The density and cold-stability of microtubules increase with age and are sensitive to thyroid hormone deficiency. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* **3**, 559-565 (1985).
87. Moller, J.R., Durr, P.G., Quarles, R.H. & Duncan, I.D. Biochemical analysis of myelin proteins in a novel neurological mutant: the taiep rat. *Journal of neurochemistry* **69**, 773-779 (1997).
88. Gory-Faure, S., *et al.* Non-microtubular localizations of microtubule-associated protein 6 (MAP6). *PLoS one* **9**, e114905 (2014).

89. Deloulme, J.C., *et al.* Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3E-dependent signalling for axonal growth. *Nature communications* **6**, 7246 (2015).
90. Schwenk, B.M., *et al.* The FTLD risk factor TMEM106B and MAP6 control dendritic trafficking of lysosomes. *The EMBO journal* **33**, 450-467 (2014).
91. Daoust, A., *et al.* Neuronal transport defects of the MAP6 KO mouse - a model of schizophrenia - and alleviation by Epothilone D treatment, as observed using MEMRI. *NeuroImage* **96**, 133-142 (2014).
92. Gozes, I. Microtubules, schizophrenia and cognitive behavior: preclinical development of davunetide (NAP) as a peptide-drug candidate. *Peptides* **32**, 428-431 (2011).