

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
LICENCIATURA MÉDICO CIRUJANO

DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN PROFESIONAL



CARACTERIZACIÓN DE C-JUN DURANTE LA DEGENERACIÓN WALLERIANA  
EN EL NERVIÓ CIÁTICO DE LA RATA

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
MÉDICO CIRUJANO

PRESENTA  
M.P.S.S. DIANA LAURA ARIZMENDI NIETO

DIRECTOR(A)  
DRA. MYRNA ALEXANDRA ROBERTA DENT

TOLUCA, ESTADO DE MÉXICO, DICIEMBRE DE 2023

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMex), bajo la dirección de la Dra. Myrna Alexandra Roberta Dent y la Dra. Edith Segura Anaya, con recursos derivados del proyecto COMECYT titulado "Estudio de la distribución y localización de c-jun en células de reparación durante la degeneración y regeneración del nervio ciático de rata" con clave FICDTEM-2023-05.

A ANTONIETA Y RAFAEL, MIS PADRES,  
POR SU AMOR INCONDICIONAL



## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>7</b>
<b>I. ANTECEDENTES</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1 Sistema Nervioso Periférico</b> .....	<b>8</b>
1.1.1 Estructura del nervio periférico.....	9
1.1.2 Células de Schwann.....	10
1.1.3 Desarrollo de la célula de Schwann.....	10
1.1.4 Características de la mielina en el SNP.....	12
1.1.5 Polaridad de las CS.....	13
<b>1.1 Degeneración Walleriana</b> .....	<b>16</b>
1.2.1 Tipos de lesiones.....	18
1.2.2 Eventos de la Degeneración Walleriana.....	18
1.2.3 Plasticidad de las CS.....	19
1.2.4 Factor de transcripción c-Jun.....	20
<b>II. HIPÓTESIS</b> .....	<b>22</b>
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1 Objetivo general</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2 Objetivos particulares</b> .....	<b>22</b>
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
<b>4.1 Diseño del estudio</b> .....	<b>23</b>
<b>4.2 Operacionalización de variables</b> .....	<b>23</b>
<b>4.3 Estrategia experimental</b> .....	<b>23</b>
4.3.1 Animales experimentales.....	23
4.3.2 Muestra.....	23
4.3.3 Lesión de nervio por aplastamiento.....	24
4.3.4 Extracción de nervio ciático.....	24
4.3.5 Preparación de laminillas y extensión de tejido.....	24
4.3.6 Inmunofluorescencia.....	24
4.3.7 Doble Inmunofluorescencia.....	25
4.3.8 Obtención y análisis de microfotografías.....	25
4.3.9 Soluciones.....	26
<b>4.5 Implicaciones éticas</b> .....	<b>26</b>
<b>4.6 Presupuesto y financiamiento</b> .....	<b>26</b>
<b>V. RESULTADOS</b> .....	<b>27</b>
<b>5.1 Localización de c-Jun en el nervio ciático normal</b> .....	<b>27</b>
<b>5.2 Localización de c-Jun en el nervio ciático durante la degeneración Walleriana</b> .....	<b>28</b>
<b>VI. DISCUSIÓN</b> .....	<b>37</b>

<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>39</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>40</b>

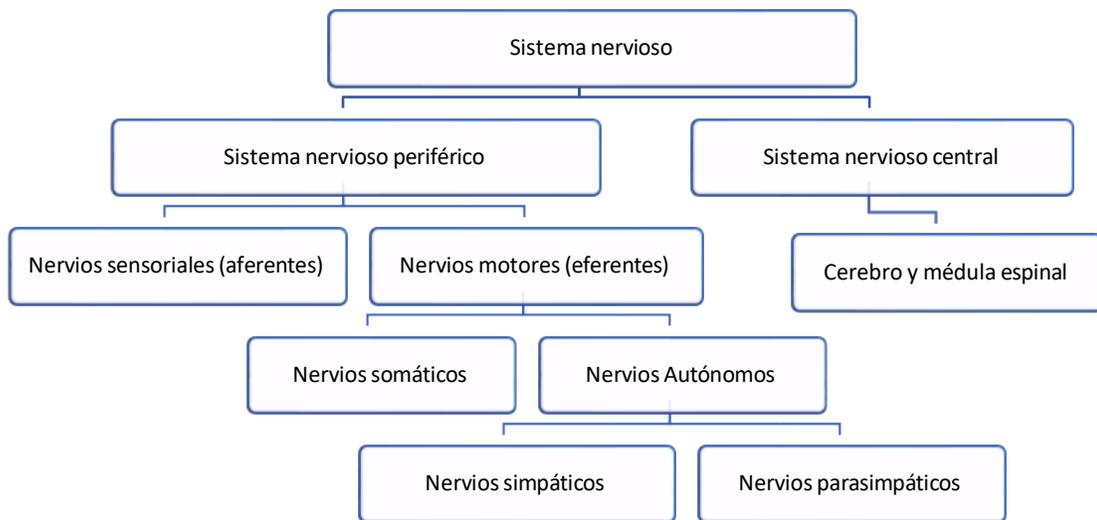
## RESUMEN

Las células de Schwann (CS) son células gliales del sistema nervioso periférico, se pueden distinguir dos tipos, las CS que forman mielina y las CS que no forman mielina también conocidas como células Remak. Ambos fenotipos maduros tienen gran plasticidad, ya que, después de una lesión, durante el proceso de la degeneración Walleriana adoptan el fenotipo de reparación, el cual tiene características genotípicas y fenotípicas que lo diferencian de las CS maduras y de los precursores de las CS. Las células de reparación adoptan una morfología bipolar elongada y expresan factores de transcripción importantes como c-Jun, el cual es considerado un regulador maestro para que las CS maduras adquieran el fenotipo de reparación y se lleve a cabo una reparación nerviosa exitosa. En este trabajo, se describen cambios en el marcaje de c-Jun durante la degeneración Walleriana mediante doble-inmunofluorescencias. Los resultados muestran que la expresión de c-Jun se observa en los núcleos de las células de reparación a partir de los 3 días, con un pico máximo entre 5 y 7 días, en donde los núcleos se organizan en bandas de Büngner. También se observa que, contrario a lo sugerido en la bibliografía, la expresión de c-Jun es independiente del proceso de remielinización, y que la presencia de c-Jun en las células de reparación no es un marcador para determinar qué célula adoptará el fenotipo mielinizante o no mielinizante durante el proceso de regeneración.

# I. ANTECEDENTES

## 1.1 Sistema Nervioso Periférico

El sistema nervioso incluye el encéfalo, la médula espinal y una compleja red de nervios. Este sistema se encarga de enviar información de una región del cuerpo a otra. Anatómicamente se divide en sistema nervioso central (SNC) compuesto por el encéfalo y la médula espinal, mientras que el sistema nervioso periférico (SNP) comprende todo el tejido nervioso fuera del sistema nervioso central. El SNP se subdivide en nervios sensoriales (aférentes) y nervios motores (eferentes), éstos últimos pueden clasificarse en nervios somáticos y nervios autónomos, de los cuáles se desprende el sistema nervioso simpático y el sistema nervioso parasimpático (Fig. 1); recientemente se ha agregado una subdivisión llamada sistema nervioso entérico, el cual es el sistema nervioso intrínseco del tracto gastrointestinal (Farley et al., 2014). Además de las neuronas que conforman los nervios, el sistema nervioso incluye células de sostén, llamadas glía o neuroglia, y tejido conectivo (Geneser et al, 2014).



**Figura 1. Esquema del sistema nervioso.** Se muestran las subdivisiones del sistema nervioso.

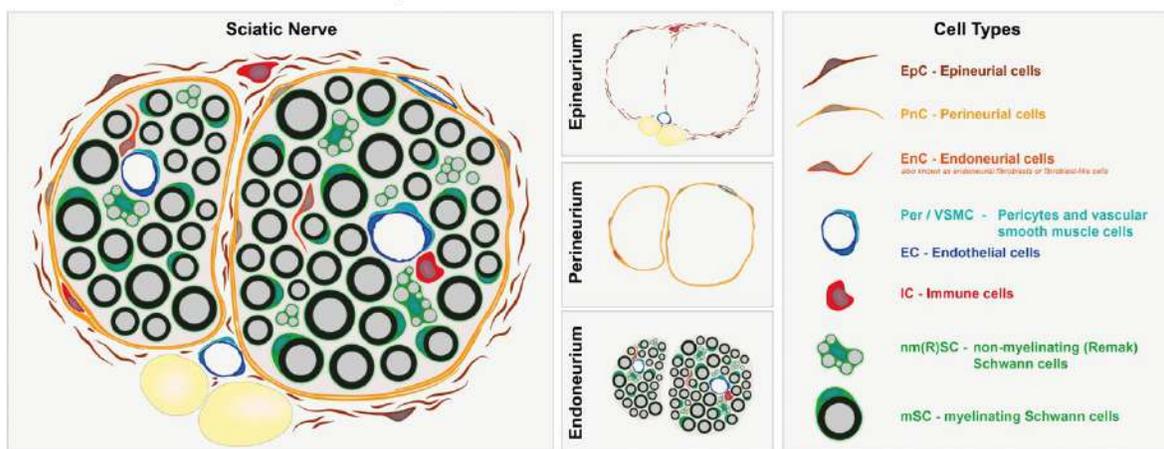
La neurona es la unidad estructural y funcional del sistema nervioso, se encuentran conectadas entre sí mediante sinapsis y tienen la propiedad de generar y propagar el impulso nervioso. Está compuesta por el soma, que contiene el núcleo y varias evaginaciones de longitud variables (axones y dendritas) (Pawlina y Ross, 2020). Un axón con sus correspondientes vainas nerviosas forma una fibra nerviosa.

Las células gliales desempeñan una función de soporte y protección de las neuronas. Según su ubicación dentro del SN ya sea central o periférico, encontramos a las astrocitos, oligodendrocitos, células ependimarias y microglía. Las células que constituyen la glía periférica son las células de Schwann (CS), las

células satélite y otras células relacionadas con órganos o tejidos específicos como la teloglía, asociada con la placa terminal motora, la neuroglía entérica asociada con los ganglios ubicados en la pared del tubo digestivo y las células de Müller en la retina (Pawlina y Ross, 2020). Las fibras nerviosas se agrupan formando fascículos que constituyen la unidad anatomofuncional del nervio (Muñoz et al., 2022). Los nervios se pueden clasificar en motores y sensoriales. Las neuronas eferentes que forman parte de los nervios motores reciben señales del SNC y las envían a través de sus dendritas hacia la periferia, mientras que las neuronas aferentes, ya sean sensoriales o viscerales, conducen impulsos relacionados con el dolor, temperatura, tacto y presión desde la periferia hacia el SNC.

### 1.1.1 Estructura del nervio periférico

Los nervios periféricos son estructuras que unen centros nerviosos con distintos tejidos u órganos, permitiendo la transmisión de señales a través del impulso nervioso. Estos están formados por axones mielinizados y no mielinizados que forman parte de las fibras nerviosas que a su vez se agrupan en fascículos (Muñoz et al., 2022), glía y tejido conectivo, éste último recubre a los fascículos y se compone de epineuro, perineuro y endoneuro (Fig. 2.), siendo la capa más externa el epineuro, el cual es de una cubierta gruesa que recubre un conjunto de fascículos, que pueden variar en cantidad de 1 hasta 100, contiene tejido adiposo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y bandas de colágeno y elastina ordenadas longitudinalmente. Cada fascículo está delimitado por el perineuro, el cual es una lámina de tejido conectivo circular, a su vez, dentro del perineuro los espacios entre fibras nerviosas están ocupados por el endoneuro, el cual es una capa de tejido conectivo laxo que rodea a las CS y los axones, contiene fibroblastos, mastocitos, fibras colágenas y capilares (Bruehl et al., 2014; Muñoz et al., 2022).



**Figura 2. Esquema de un nervio y sus diferentes capas.** La capa más externa es el epineuro, el cuál envuelve a varios fascículos, cada uno de éstos ésta cubierto a su vez por el perineuro, mientras que cada fibra nerviosa se encuentra rodeada por el endoneuro el cual además contiene fibroblastos, mastocitos y células endoteliales (Muñoz et al., 2022) (Imagen adaptada de Gerber et al, 2021).

### 1.1.2 Células de Schwann

En el SNP residen varios tipos de células gliales, derivados de las células de la cresta neural, que incluye a las células de Schwann (CS), células satelitales, células de recubrimiento olfatorio o las células de la glía entérica (Reed et al., 2022). Estas células presentan una morfología heterogénea que refleja las diversas funciones que desempeñan en el sistema nervioso, entre las que destacan proveer a las neuronas de soporte metabólico y trófico (Feltri et al., 2021). Las CS son la glía más estudiada, se pueden distinguir dos tipos, las células de Schwann que forman mielina (CSFM) y las células de Schwann que no forman mielina también conocidas como células Remak (Jessen et al., 2015), que tienen características que las hacen diferenciarse entre ellas y de otras células. Las CSFM tienen la capacidad de extender su membrana aproximadamente 2000 veces para envolver segmentos del axón con un calibre mayor o igual a 1  $\mu\text{m}$ , formando una vaina de mielina a diferencia de las células Remak que envuelven múltiples axones normalmente con un diámetro menor o igual a 1  $\mu\text{m}$ .

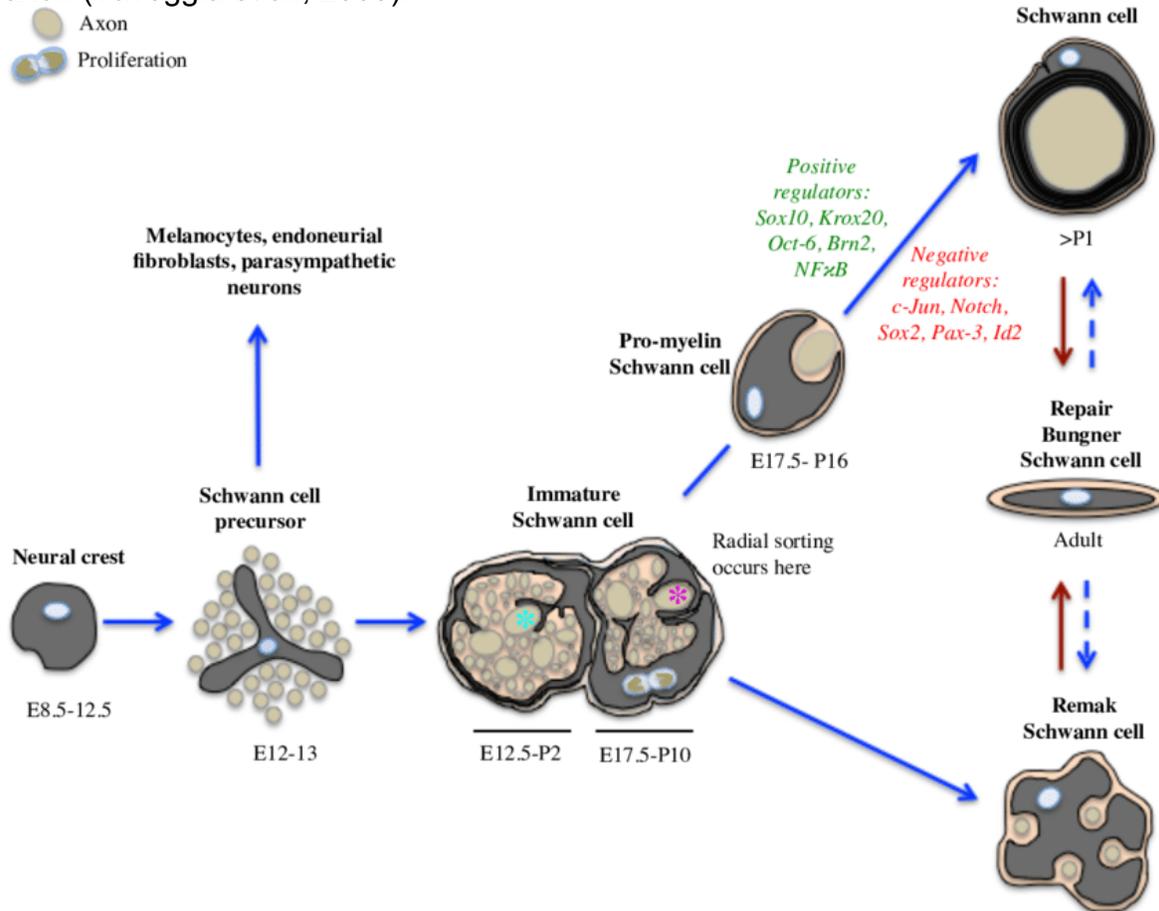
En cuanto a marcadores de proteínas ambos tipos de CS comparten la proteína S100, sin embargo, también tienen perfiles característicos de cada una, las CSFM expresa factores promielinizantes como Egr2 (Krox20), moléculas como la proteína cero de mielina (MPZ) y la proteína básica de mielina (MBP). Mientras que las células Remak poseen marcadores celulares que pueden encontrarse en CS en desarrollo como la molécula de adhesión a células neurales (NCAM), receptor de neurotropinas p75 (p75NTR), la proteína fibrilar ácida glial (GFAP) y molécula de adhesión a células neurales L1 (L1NCAM) (Jessen y Mirsky, 2019).

### 1.1.3 Desarrollo de la célula de Schwann

En el desarrollo embrionario, a medida que las células de la cresta neural migran y proliferan junto con los axones en crecimiento, se diferencian primero en precursores de las células de Schwann (PCS), los cuales son células multipotentes con la capacidad de generar varios tipos celulares como melanocitos, fibroblastos endoneurales y neuronas parasimpáticas; posteriormente los precursores se diferencian en células de Schwann inmaduras (CSI). Durante este proceso se activan factores de transcripción que permiten la transición de células de la cresta neural a PCS y posteriormente a CSI, entre estos factores destacan Sox10, Neuroregulina 1, principalmente el tipo III, (NGR1 tipo III) y Notch (Jessen et al., 2015).

Las CSI se pueden diferenciar a CSFM o a células Remak, dependiendo del diámetro del axón con el que se asocian, aquellas que adquieren un fenotipo promielinizante, para finalmente convertirse en células mielinizadas. Estas presentan un aumento de factores de transcripción mielinizantes como el factor nuclear kB (NF-kB), Sox10 y Egr2/Krox20 (Salzer, 2015) y existe una disminución de factores de transcripción que inhiben la mielinización como c-Jun, PAX3 y Sox2

(Jessen y Mirsky, 2005). La mielinización comienza en el periodo embrionario con un proceso denominado selección radial en donde los axones >1µm se mielinizan (Peters et al., 1991) estableciéndose una relación 1:1, para ello se activan una serie de cascadas moleculares, donde uno de los principales reguladores es NGR1 tipo III, el grueso de la vaina de mielina se relaciona directamente con el diámetro del axón (Taveggia et al., 2005).



**Figura 3. Desarrollo de las CS en las ratas.** El diagrama muestra las transiciones de las células de Schwann en el desarrollo y después de una lesión. En el desarrollo (flechas negras continuas) ocurre: la formación de los precursores de las células de Schwann a partir de células de la cresta neural, la transición precursor-célula de Schwann y la formación de células de Schwann que forman y no forman mielina madura. Esta transición puede adoptar un fenotipo de reparación cuando se pierde el contacto axonal (flechas rojas) y se restablece en los nervios en regeneración (flechas punteadas) (Fazal, S., 2017).

Es importante mencionar que las CS tienen gran plasticidad, ya que, después de una lesión tanto las CSFM como las células Remak pueden adoptar un fenotipo de reparación, el cual tiene características genóticas y fenotípicas que lo diferencian de las CS maduras y de los PCS. El fenotipo de reparación adopta una morfología bipolar elongada (Jessen et al., 2015) y expresa factores de transcripción, importantes como c-Jun, cuya activación es imprescindible para que las CS

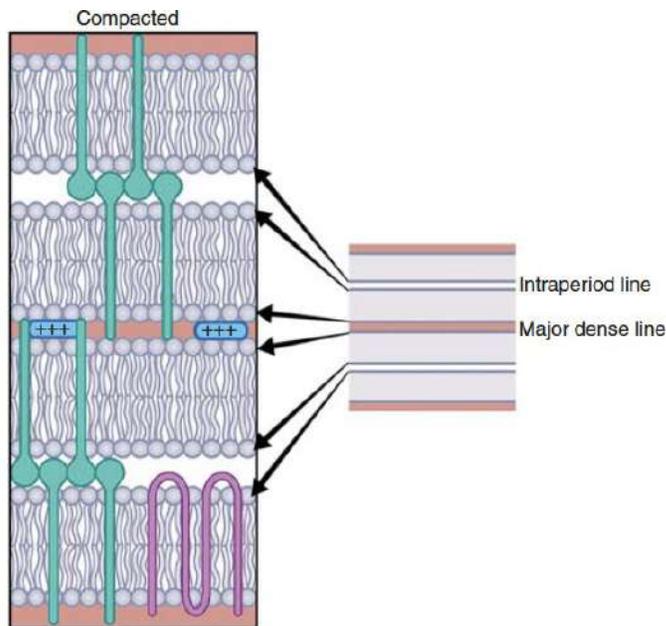
maduras adquieran un fenotipo de reparación y se lleve a cabo una reparación nerviosa exitosa (Jessen y Arthur-Farraj, 2019; Jessen y Mirsky, 2016, 2022). Otras moléculas involucradas en el fenotipo de reparación son Merlin, Ngr 1, neurotrofinas como el factor de crecimiento nervioso (NGF), neurotrofina 4 (NT4) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Jessen y Mirsky, 2022).

#### 1.1.4 Características de la mielina en el SNP

La mielina es una extensión de la membrana glial de las CSFM (Nave y Werner, 2014), actúa como un elemento esencial para la propagación del impulso nervioso saltatorio (Cisterna et al., 2019).

La mielina se puede catalogar en dos tipos: mielina compacta, la cual favorece la conducción eléctrica, y mielina no compacta que concentra los organelos necesarios para las operaciones celulares (Cisterna et al., 2019). En la mielina compacta, que actúa como aislamiento, se encuentran las proteínas P0 que solo se encuentra en el SNP, la proteína MBP y la proteína de mielina periférica 22 (PMP22). En micrografías electrónicas la mielina compacta se observa como una línea densa mayor alternando con líneas intraperiódicas (Fig. 4) (Salzer, 2015). La mielina no compacta se encuentra conformada por citoplasma, se localiza en las asas paranodales (extensiones citoplasmáticas localizadas en los márgenes laterales de las SC, cercanos a los nodos de Ranvier), en los compartimentos citoplasmáticos interno y externo y en las incisuras de Schmidt-Lanterman (ISL) (Cisterna et al., 2019).

Las ISL son porciones de citoplasma orientadas tanto longitudinalmente como transversalmente, que interrumpen la apariencia densa de la mielina compacta (Cisterna et al., 2019). Estas fueron descritas por Ramón y Cajal (1928) como segmentos cónicos infundibulares de longitud variable que se extienden desde el citoplasma de las CS al axón proveen comunicación entre los axones y los compartimentos citoplasmáticos internos y externos. Cada ISL tiene tres características estructurales específicas, forma de resorte debido a su continuidad citoplasmática en la vaina de mielina, adhesión de membranas con otras membranas adyacentes y abultamiento del citoplasma, el cual difiere de las uniones estrechas que se encuentran en la mielina compacta. Entre las principales proteínas que se encuentran en las ISL destacan la actina, anexina II, AQP1,  $\beta$ -catenina, molécula de adhesión celular-4 (CADM4), conexina 29 y conexina 32, E-caderina, entre otras. Estructuralmente su función se relaciona como amortiguadores de fuerzas mecánicas (Terada N et al., 2019); se ha sugerido que estas regiones de mielina no-compacta actúan como canales para el transporte de sustancias metabólicas (Martini, 2005); permiten el mantenimiento y metabolismo de la mielina, así como el crecimiento longitudinal de la vaina de mielina (Arroyo y Scherer, 2007), y en condiciones de daño nervioso se han relacionado con ser los sitios clave para la fragmentación de la vaina de mielina durante la DW (Jung et al., 2011).



**Figura 4. Organización esquemática de la vaina de mielina compacta.**

En la mielina compacta se visualizan líneas interperiódicas, las cuáles representan aposiciones celulares de la parte extracelular de la membrana, formada por interacciones de tetrámeros de proteína P0 en ambos lados de la membrana (en la imagen solo se representan interacciones dímero/dímero por simplicidad), alternando con líneas densas mayores, formados por las interacciones electroestáticas de MBP con la membrana lipídica y la porción terminal citoplasmática de P0, que representan las aposiciones estrechas del citoplasma. Tomada de (Salzer, 2015).

#### 1.1.5 Polaridad de las CS

Las CS mielinizadas tienen una polaridad longitudinal y otra radial. La primera de ellas se evidencia por la organización de la SC en las siguientes regiones: nodal, paranodal, juxtapanodal e internodal; mientras que la polaridad radial está representada por la membrana interna (adaxonal) y la membrana externa (abaxonal), entre las cuáles se encuentran las vainas de mielina (Fig. 5) (Salzer, 2015).

#### Polaridad longitudinal

El dominio más grande, el internodo, que corresponde a la porción del axón localizada debajo de la mielina entre los nodos de Ranvier; a lo largo del internodo, la membrana interna de la CS se encuentra uniformemente separada del axón por

el espacio periaxonal de 15 nm; los internodos pueden llegar a medir 1mm o mas en el SNP (Salzer et. al., 2008). A lo largo de esta región se encuentra un conjunto de moléculas de adhesión característico que median las interacciones axón-CS, como son las moléculas de adhesión celular similar a la nectina (Nect) también llamadas moléculas de adhesión celular (Cadm), moléculas de adhesión sináptica (SynCAM5), las proteínas similares TSLC1, glicoproteínas asociadas a mielina (MAG), entre otras (Salzer et. al., 2008).

Los nodos de Ranvier (región nodal) son espacios que se encuentran entre las CSFM o internodos (Fig. 5), miden alrededor de 1  $\mu\text{m}$ , representan los sitios donde el axón se comunica con el medio extracelular; los nodos están cubiertos de microvellosidades que son proyecciones de la membrana de las CS, las cuáles se encuentran enriquecidas en ezrina, radixina y moesina (ERMs), proteínas que se asocian a la actina (Hansen y Kwiatkowski, 2013). Los nodos se encuentran enriquecidos en canales de  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje, esenciales para la regeneración del potencial de acción (Salzer, 2003; Salzer et. al., 2008).

La región paranodal es la zona adyacente a los nodos (Fig. 5), donde se encuentran uniones axo-gliales especializadas las cuáles son el sitio de aposición más estrecho entre las CSFM y la membrana axonal. Se visualizan como una serie de asas intimamente asociadas que invaginan en el axolema. Estas uniones promueven la adhesión entre la CS y el axón, además de que proveen una barrera parcial a la difusión de iones entre el nodo y el internodo durante el potencial de acción (Salzer et. al., 2008). En el axolema de la región nodal se localiza contactina (Cntn) y las proteínas asociadas a contactina (Caspr), dos moléculas de reconocimiento celular que se unen mediante sus dominios extracelulares a proteínas como la neurofascina de 155 kDa (NF155) que se expresan en las asas paranodales de las CSFM (Scherer y Arroyo, 2002; Salzer et al., 2008).

Continúa a la región paranodal se encuentra la región juxtapanodal (Fig. 5), la cual se localiza inmediatamente debajo de la vaina de mielina compacta y se encuentra enriquecida en canales de potasio tipo Shaker como Kv1.1 y Kv1.2 (Salzer et. al., 2008). Dichos canales de  $\text{K}^+$  actúan como un amortiguador de la reentrada del potencial de acción, al mantener el potencial de reposo del internodo y actuando activamente en el establecimiento del potencial de membrana después de la conducción del impulso nervioso (Poliak y Peles, 2003).

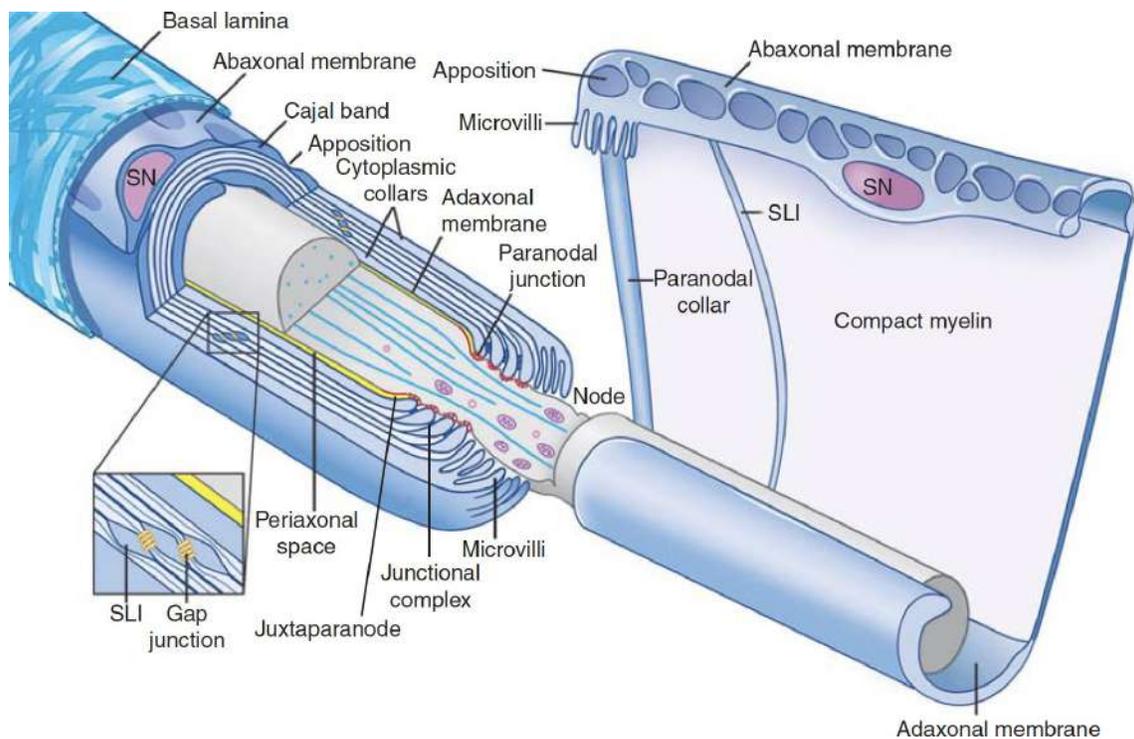
### Polaridad radial

La polaridad radial se observa cuando se realiza un corte transversal a un nervio, se describe de interno a externo la membrana adaxonal, las vainas de mielina, la membrana abaxonal y la lámina basal (Fig. 5) (Salzer, 2015) .

La membrana adaxonal está separada del axolema (membrana celular axonal) por un espacio de aproximadamente 15nm, conocido como el espacio periaxonal; esta membrana se encuentra enriquecida en moléculas de adhesión y receptores que median las interacciones con los ligandos relacionados con el axón. Entre estas

moléculas de adhesión glial se encuentran la glioproteína MAG y proteína tipo nectina como Necl-2 (CADM1) y Necl-4 (CADM4) (Salzer, 2015).

La membrana abaxonal media interacciones con la laminina en la lámina basal, especialmente las integrinas  $\alpha 6 \beta 1$ ,  $\alpha 6 \beta 4$  y distroglicano  $\beta$ , los cuales son regulados al alza durante la mielinización. El espacio citoplasmático externo no se encuentra uniformemente arreglado a diferencia del espacio citoplasmático interno, sino que tiene aposiciones periódicas entre la membrana abaxonal y la parte exterior de la mielina compacta. Dichas aposiciones están enriquecidas en complejos de distroglicanos vía proteína 2 relacionada al distroglicano (Drp2) unido a periaxina. Estas aposiciones delimitan una red de canales citoplásmico anastomosados conocidos como bandas de Cajal, las cuales se encuentran en la parte exterior de la SC facilitando un conducto para el transporte centrifugal de RNA y proteínas originadas en el soma de las células hacia la región paranodal. Las membranas externas de estas bandas interactúan con la lámina basal a través de la  $\beta 1$  integrina y un segundo complejo distroglicano. Las bandas de Cajal están enriquecidas en proteínas del citoesqueleto. Entre las dos membranas descritas anteriormente se encuentra la vaina de mielina compacta y multilamelar que resulta del enrollamiento circunferencial de la membrana plasmática de la CS (Salzer, 2015).



**Figura 5. Organización de las células de Schwann formadoras de mielina.** En la imagen se muestra a las SC (azul) rodeando un axón (gris); la célula de la izquierda es mostrada en un corte longitudinal, mientras que la célula derecha se muestra desenrollada. Las SCFM se encuentran rodeadas por la lámina basal (azul claro a la izquierda), la cual está en contacto directo con la membrana abaxonal. El compartimento abaxonal contiene el núcleo de la SC (SN), se divide en bandas de Cajal y aposiciones periódicas que se forman entre la membrana abaxonal y la porción externa de la mielina compacta. La membrana adaxonal es separada de la membrana axonal por el espacio periaxonal (en amarillo). La mielina compacta es interrumpida por la SLI, las cuáles retienen citoplasma y se encuentran enriquecidas en uniones tipo GAP entre otras. También se muestran las asas paranodales y uniones (rojo) y las microvellosidades de las CS en contacto con el axón en el nodo, cuyo diámetro se encuentra reducido en la región nodal y paranodal. (Tomado de Salzer, 2015).

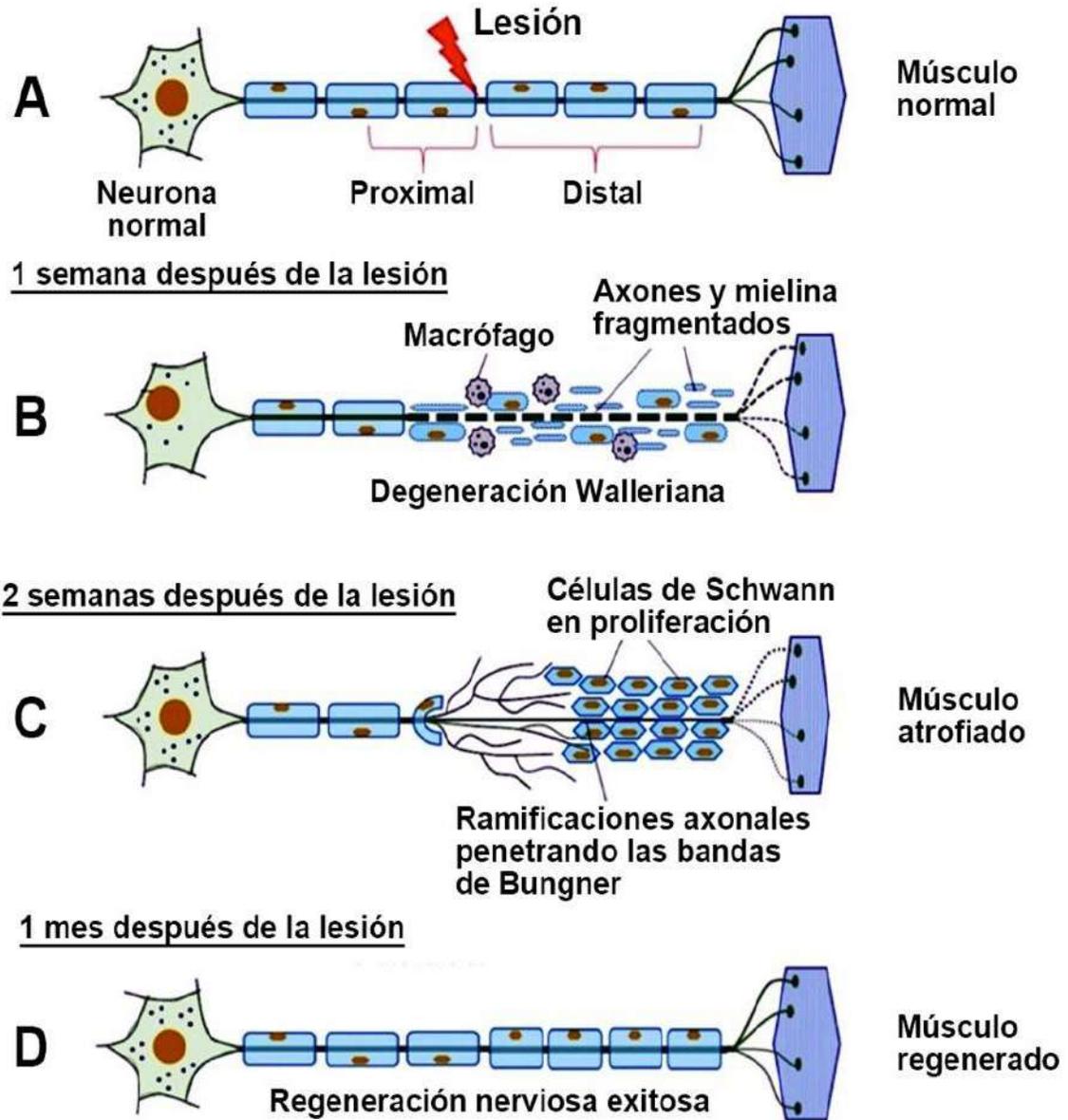
## 1.1 Degeneración Walleriana

La degeneración Walleriana (DW), originalmente descrita por Augustus Waller (1850), es la rápida degeneración de la región distal de un axón lesionado (Jessen y Mirsky, 2019). Es un proceso que ocurre en la región distal de un nervio tras una lesión que interrumpe la continuidad del nervio. A diferencia del SNC, donde no existe una recuperación nerviosa, el SNP tiene la capacidad de regenerarse; para lograrlo requiere la participación de otras células no neuronales: CS, macrófagos, fibroblastos, células del sistema inmune, las cuales influyen fuertemente el patrón de degeneración y regeneración del axón (Jessen y Mirsky, 2019). Para alcanzar una recuperación completa el nervio debe pasar por tres procesos principales: la DW, la regeneración axonal y la reinervación del órgano blanco (Jessen et al., 2015; Menorca et al., 2013).

La DW es un proceso anterógrado y asincrónico. Dentro de la DW se distinguen dos componentes principales, el primero la regresión de la diferenciación del fenotipo mielinizante y el segundo la activación de características dedicadas a promover la reparación, adquiriendo las CS tanto CSFM como células Remak, un fenotipo de reparación; por otra parte, los componentes del citoesqueleto axonal son desensamblados y el axón es fragmentado, lo que propicia la rotura de las vainas de mielina. Tanto las CS como los macrófagos infiltrados actúan removiendo el debris de axones y de mielina. Adicionalmente, las células de Schwann proliferan, se alinean alrededor de la lámina externa y realizan cambios morfológicos que incluyen la elongación de las CS para formar guías, denominadas bandas de Büngner que guían a los axones en regeneración originados de la parte proximal del nervio dañado. Estos nuevos axones pasan por un proceso de remielinización hasta alcanzar su blanco y recuperar su función (Fig. 6) (Arslantunali et al, 2014; Jessen y Mirsky, 2019).

# Regeneración del nervio

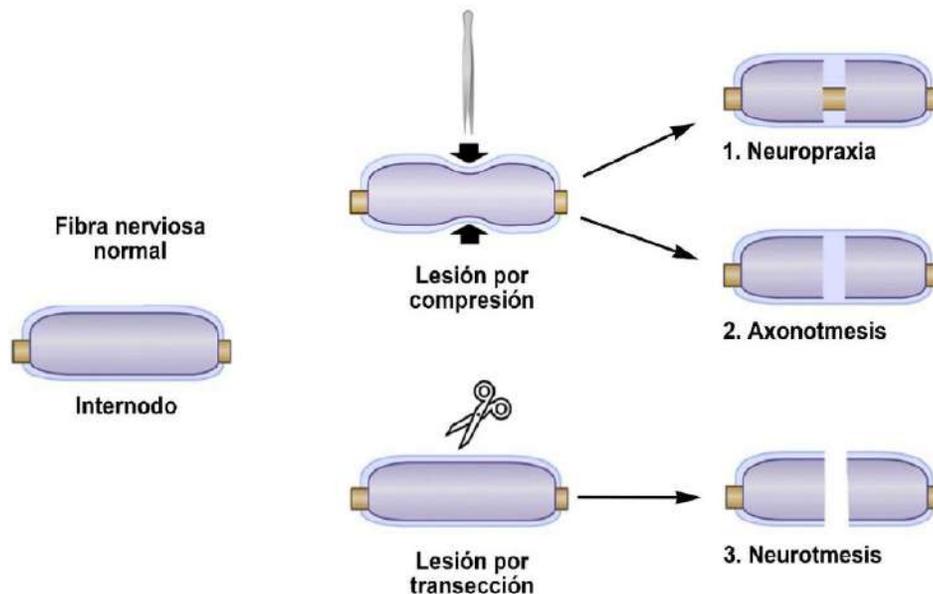
## Degeneración Walleriana



**Figura 6. Fases de la degeneración Walleriana** (A) Axón mielinizado no lesionado. (B) En respuesta a una lesión, el axón y su envoltura de mielina se degeneran en la parte distal con respecto a la lesión. Los macrófagos invaden la región distal, penetran la lámina basal, y fagocitan la mielina en degeneración. (C) En la parte proximal, se forma el cono de crecimiento, el axón comienza a regenerarse dentro de las bandas de Büngner que corresponden a CS en proliferación, las cuales contribuyen a la regeneración axonal y la eventual remielinización. (D) Nervio periférico reparado y remielinizado, los internodos regenerados son más pequeños (Adaptado de Arslantunali et al., 2014)

### 1.2.1 Tipos de lesiones

Las lesiones que pueden ocurrir en el SNP se pueden clasificar de acuerdo al sistema propuesto por Seddon en 1943, el cual contempla tres categorías basadas en el grado de desmielinización y la extensión de daño a los axones y el tejido conectivo de los nervios (Figura 7). La neuropraxia es la forma menos severa de lesión, se define como una desmielinización focalizada sin daño a los axones o el tejido conectivo. Es seguida en nivel de severidad por la axonotmesis, en la cual hay daño directo al axón y desmielinización focal con preservación de la continuidad del tejido conectivo, suele ser causada por lesiones por compresión o aplastamiento (crush). La lesión más grave se denomina neurotmesis, en la cual hay una transección total de los axones y el tejido conectivo y el nervio pierde completamente su continuidad (Menorca et al., 2013).



**Figura 7. Clasificación de Seddon para las lesiones del nervio periférico.** Diagrama que muestra los tres tipos de daño que puede sufrir un nervio después de una lesión por transección o compresión. 1) Neuropraxia, que solo altera la vaina de mielina; 2) Axonotmesis, que altera al axón y la vaina de mielina, pero mantiene la estructura de la lámina basal; 3) Neurotmesis en la que se altera toda la fibra mielinizada incluida la lámina basal (Adaptada de Belin et al., 2017, tomada de Segura-Anaya 2022).

### 1.2.2 Eventos de la Degeneración Walleriana

Las CS que pierden el contacto axonal adquieren un fenotipo de reparación, este consiste en la activación de factores de transcripción como c-Jun el cual se propone que actúa como regulador negativo de la mielinización, además se activan vías de señalización que hacen posible la desintegración de la mielina a través de autofagia de las CS y los macrófagos que realizan mielinofagia, también se lleva a cabo la

proliferación de CS que formarán las bandas de Büngner que servirán de guía para los axones en regeneración y son regulados al alza factores que promueven la supervivencia de las neuronas y la elongación axonal (Jessen y Mirsky, 2019).

Lo descrito anteriormente comienza con la pérdida del contacto axonal, tras lo cual empieza la desestructuración de la mielina de las CSFM. Minutos después de la axonotmesis, se puede observar un ensanchamiento de las ISL en la región más proximal a la lesión, y a las 24-36h se puede observar este fenómeno en las partes más distales del nervio dañado. Mientras continúa el ensanchamiento de las ISL, las CSFM comienzan a edematizarse, a la par que empieza la desintegración de la mielina a través de un proceso de autofagia realizado por los lisosomas que la convierte en pequeños segmentos en forma de ovoides los cuales también contienen citoplasma de las CS y fragmentos de axoplasma (Carroll y Worley, 2016; Dubový, 2011; Jessen y Mirsky, 2019).

Por otra parte, se activa una reacción inmune en respuesta al daño nervioso, los mastocitos se acumulan y degranulan dentro del endoneuro del nervio periférico lesionado, liberándose en cuestión de horas mediadores como histamina y otras quimiocinas que contribuyen al reclutamiento de neutrófilos y macrófagos (Dubový, 2011). Además las CS en la región distal al sitio de lesión, las cuales ya han comenzado la transición al fenotipo de reparación, regulan al alza la expresión de citoquinas como factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), las interleucinas (II) II-1 $\alpha$  e II 1- $\beta$ , el factor inhibidor de leucemia (LIF), la proteína quimiotáctica monocítica -1 (MCP-1) y receptores tipo Toll, los cuales reclutan macrófagos que se encuentran en el endoneuro (Jessen y Mirsky, 2019).

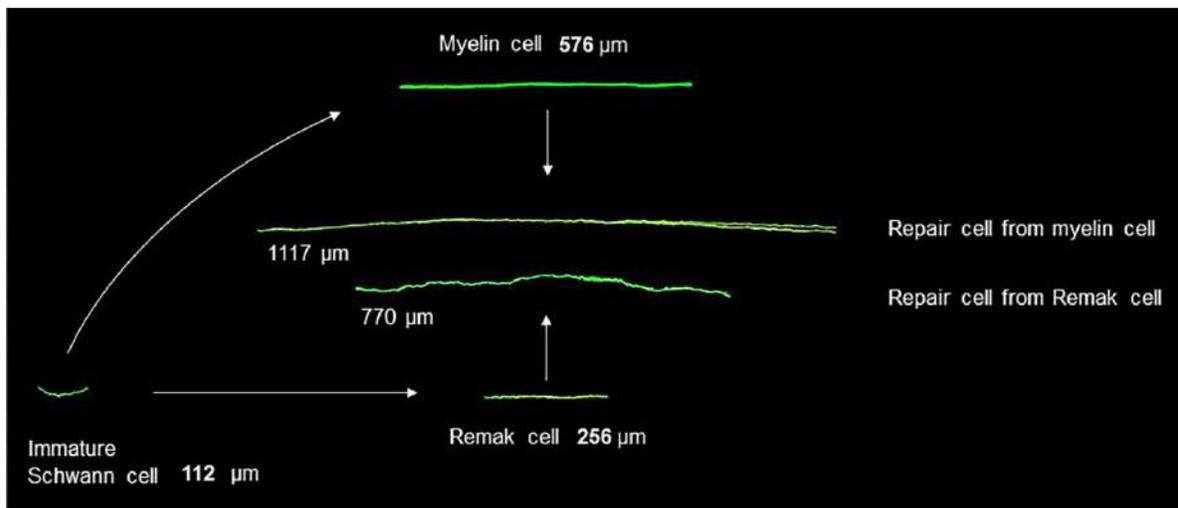
Los macrófagos ayudan a eliminar el debris de mielina en la región distal a la lesión, convirtiéndose en los principales fagocitadores de mielina después de la degradación inicial propiciada por las propias CS. Los macrófagos además contribuyen a la producción de factores mitógenos para las CS y los fibroblastos, ayudan también a la vascularización del puente de la lesión (Carroll y Worley, 2016; Dubový, 2011; Jessen y Mirsky, 2019).

### 1.2.3 Plasticidad de las CS

Los nervios periféricos deben su gran potencial de reparación debido a la plasticidad de las CS y potencial de adaptación neuronas del SNP, ya que ambos tipos de células son capaces de presentar un estado transitorio de reparación tras una lesión. La respuesta de las neuronas al daño se centra en un cambio de función de sinapsis entre neuronas a la de formar un nuevo axón. Mientras que las CS, tanto células Remak como CSFM, adoptan un fenotipo de reparación a través de un proceso denominado reprogramación celular adaptativa. Éste consiste en una pérdida de la mielina y en la activación de una serie de señales moleculares que propician la regeneración (Jessen y Mirsky, 2016, 2019).

Las CS de reparación tienen características moleculares y morfológicas que permiten distinguirlas de las CS maduras y de los estadios embrionarios. Dentro de su perfil molecular destacan los genes *Olig1* y *Shh* los cuáles se expresan de novo después de una lesión y son regulados al alza por el factor de transcripción *c-Jun*, el cual es uno de los principales reguladores del proceso de desmielinización y la activación del programa de reparación, ya que interactúa con al menos 172 de los 4000 genes involucrados en el cambio de las CS tras una lesión (Jessen y Mirsky, 2019).

Morfológicamente la principal característica de las CS de reparación es su estructura elongada (Fig. 8), las células de reparación derivadas de las CSFM pueden llegar a duplicar su longitud original, mientras que las derivadas de células Remak pueden triplicar su longitud, dicho cambio morfológico de ambos tipos de CS maduras a CS de reparación se asocia a la función que tienen de servir de guía a los axones en proceso de regeneración al superponerse entre ellas para formar las bandas de Büngner (Jessen y Mirsky, 2019).



**Figura 8. Cambios morfológicos de las CS de reparación.** Se muestra la diferencia morfológica entre las CS inmaduras, las CSFM y las células Remak en comparación con las CS de reparación derivadas de los fenotipos maduros, utilizando marcaje genético in vivo (Tomado de Jessen y Mirsky, 2022).

#### 1.2.4 Factor de transcripción *c-Jun*

Los factores de transcripción son proteínas de unión específica al DNA que median la tasa de transcripción de genes positiva o negativamente (actuando como represores o activadores) (Alisson A., 2012). Existen diversos tipos de factores de transcripción de acuerdo a las características de sus dominios de unión a DNA, entre los que se encuentran los de tipo cremallera de leucina (*bZIP*) de los cuales uno de los más estudiados es *c-Jun*, el cual actúa como un homo o heterodímero

(Meng y Xia, 2011), formando parte del factor de transcripción AP-1 en conjunto con Fos (Mechta-Grigoriou F., 2001).

Durante el desarrollo de las CS, c-Jun es fácilmente detectable en las CS inmaduras de los nervios perinatales aunque sus niveles son regulados a la baja con el inicio de la mielinización durante las primeras 2 semanas después del nacimiento, (Parkinson et al., 2008, Balakrishnan A. et al., 2021). En nervios maduros no lesionados, el mRNA y la proteína de c-Jun son detectables, aunque a niveles muy por debajo de los observados en una lesión. Se puede encontrar c-Jun en núcleos de células Remak y en algunos núcleos de CSFM (Jessen y Mirsky, 2022).

Durante la DW, c-Jun es considerado un regulador maestro para que las CS maduras adopten un fenotipo de reparación (Jessen y Mirsky, 2022); por lo que tras una lesión el mRNA de c-Jun es rápidamente regulado al alza en cuestión de horas (Shy et al., 1996), aunque los niveles de proteína de c-Jun continúan aumentando días después de la lesión (Jessen y Arthur-Farraj P, 2018), actuando como un inhibidor esencial de la mielinización e inductor de la diferenciación de CS a un fenotipo reparador al suprimir genes mielinizantes como Egr2, MPZ, Egr2, MPX, MBP, periaxina y E-caderina; además regula al alza genes relacionados con el crecimiento y regeneración neuronal tales como N-caderina, p75NRT y NCAM, y las moléculas de señalización GDNF, artemina, SHH y BDNF, entre otros 172 genes, por otra parte a través de la activación de la mielinofagia también contribuye a la eliminación del debris de mielina tras la lesión, lo cual es crucial para una regeneración nerviosa exitosa (Balakrishnan, A. et al., 2021; Tricaud y Park, 2017; Jessen, K. y Arthur-Farraj P, 2018, Jessen y Mirsky, 2019).

La importancia de c-Jun durante la DW es respaldada por estudios llevados a cabo en ratones knock out de c-Jun, en los cuales tras una lesión se encuentra alterada la regulación a la baja de genes relacionados con la mielina y la activación de la mielinofagia es suprimida; además en modelos murinos viejos y en condiciones de denervación crónica la disminución de la expresión de c-Jun está ligada a fallas en la regeneración axonal (Jessen y Mirsky, 2022).

## II. HIPÓTESIS

Dado que c-Jun es un factor de transcripción ampliamente utilizado para identificar las células de Schwann de reparación y se considera un inhibidor de la mielinización, éste debe dejar de expresarse en los núcleos celulares una vez que comienza la remielinización.

## III. OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo general

Identificar cambios en el marcaje de c-Jun durante la remielinización de los axones en la degeneración Walleriana.

### 3.2 Objetivos particulares

- Localizar el marcaje de c-Jun basal en células de Schwann formadoras de mielina y Remak.
- Identificar el marcaje de c-Jun durante el proceso de conversión al fenotipo de reparación.
- Identificar el marcaje de c-Jun en la fragmentación de la mielina en las CSFM durante la degeneración Walleriana.
- Identificar el marcaje de c-Jun en la regeneración axonal.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Diseño del estudio

Se realizó un estudio de tipo descriptivo morfológico a nivel celular y molecular en el Laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias de la Universidad Autónoma del Estado de México.

### 4.2 Operacionalización de variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Indicador	Escala de medición
<b>Expresión de c-Jun en nervio ciático</b>	Presencia del factor de transcripción c-Jun en el nervio ciático de rata	Determinar c-Jun en nervio ciático de la rata por medio de doble inmunofluorescencia	1. Presente 2. Ausente	Cualitativa
<b>Expresión de c-Jun durante la degeneración Walleriana</b>	Comparación de la expresión de c-Jun en nervio ciático de rata normal y lesionado de la rata.	Determinar diferencias entre la expresión de c-Jun en nervio ciático normal y lesionado por compresión.	1. Presente 2. Ausente	Cualitativa

### 4.3 Estrategia experimental

#### 4.3.1 Animales experimentales

Se utilizaron ratas adultas de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*) macho de 6-8 semanas de edad con un peso de 250 a 350g alimentadas *ad libitum*, los cuales fueron manejados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

#### 4.3.2 Muestra

Nervio ciático de rata normal y lesionado por aplastamiento obtenido quirúrgicamente mediante acceso y disección dorsal.

#### 4.3.3 Lesión de nervio por aplastamiento

Para llevar a cabo la lesión se realizó abordaje quirúrgico de las ratas, previamente anestesiadas con una mezcla de xilazina (10mg/kg) y ketamina (90mg/kg), para lo cual se realizó retiro del tejido tegumentario con tijeras hasta exponer músculo, disecando posteriormente la parte dorsal del muslo posterior hasta lograr la exposición del nervio ciático. El nervio fue aplastado por 30s con pinzas curvas del no. 5, posteriormente se cerró plano muscular con Catgut crómico 4-0 y finalmente se afrontó herida quirúrgica con Nylon 4-0. Los nervios lesionados fueron extraídos en diferentes tiempos del proceso de degeneración y regeneración del nervio ciático a 24h, 3, 5, 7 y 41 días e inmediatamente procesados. El nervio ciático normal se usó como tejido control.

#### 4.3.4 Extracción de nervio ciático

Se llevó a cabo eutanasia de los animales experimentales utilizando CO<sub>2</sub> inhalado. De forma quirúrgica, retirando el tejido tegumentario del muslo posterior, así como la masa muscular para exponer el nervio ciático, el cuál se disecó con pinzas evitando el corte de tejido vascular en el área y se extrajo 1 cm de nervio normal o lesionado por aplastamiento incluyendo la zona proximal y distal a la lesión. A continuación el tejido extraído fue colocado en una caja Petri con solución salina buffer de fosfatos (PBS, 2.7mM KCl, 1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 137mM NaCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, libre de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>, pH 7.4).

#### 4.3.5 Preparación de laminillas y extensión de tejido

Para realizar los estudios de inmunofluorescencia, los nervios se colocaron sobre portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina (Sigma, P8920). Mediante un microscopio estereoscópico, se retira el epineuro, y se separan las fibras nerviosas lo mejor posible.

#### 4.3.6 Inmunofluorescencia

Para llevar a cabo la inmunofluorescencia los nervios separados se colocaron en vasos Coplin con paraformaldehído al 4% pH 7.4 durante 20 minutos a 4°C para fijar el tejido. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS y se fijaron con metanol durante 15 minutos a 4°C. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS. Al término del paso anterior se colocaron las laminillas en solución de leche al 10% en PBS (Tritón 0.5%-Tween 0.2%) durante 60 minutos para bloqueo y permeabilización. A continuación, se procedió con la colocación del anticuerpo primario anti-c-Jun rabbit mAb [1:300] (Cell-signaling, Cat. 60A8). Se dejó el anticuerpo incubando durante aproximadamente 16 horas en cámara húmeda a 4°C. Posteriormente se realizaron tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS y se colocó el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 598 anti- conejo [1:300, Jackson ImmunoResearch] el cual se dejó incubando por 1:30 horas y nuevamente

se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS, al final de los cuales se procedió al montaje de las laminillas colocando 1 gota de Vectashield con DAPI (Vector) y se colocó el cubreobjetos.

#### 4.3.7 Doble Inmunofluorescencia

Para estudiar la localización de la expresión de c-Jun en los nervios se llevaron a cabo dobles inmunofluorescencias utilizando anticuerpos contra c-Jun, la proteína básica de de mielina o MBP (marcador de mielina, Calbiochem), la proteína fibrilar ácida glial o GFAP (marcador de células Remak, Sigma-Aldrich), NF200 (marca neurofilamentos, Abcam) y faloidina, marcador molecular para actina (marca ISL y la región paranodal, Sigma-Aldrich). Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con PBS 1X en un vaso de Coplin diferente. Al término del paso anterior se colocaron las laminillas en solución de leche al 10% en PBS (Tritón 0.5%-Tween 0.2%) durante 60 minutos para bloqueo y permeabilización. A continuación, se procedió con la colocación del anticuerpo primario de acuerdo a lo siguiente:

<b>Anticuerpo</b>	<b>Concentración (µl)</b>
<b>Anti-Faloidina(Sigma-Aldrich)</b>	[3.75:100]
<b>Anti-Neurofilamento 200 (Abcam)</b>	[1:500]
<b>Anti-MBP (Calbiochem)</b>	[1:300]
<b>Anti-GFAP (Sigma-Aldrich)</b>	[1:100]

Se dejó el anticuerpo incubando durante aproximadamente 16 horas en cámara húmeda a 4°C. Posteriormente se realizaron tres lavados de 5 minutos cada con PBS. En el caso de los anticuerpos Anti-NF200, Anti-MBP se colocó el anticuerpo Alexa Fluor® 598 anti-ratón [1:300] el cual se dejó incubando por 1:30 horas y nuevamente se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS. Se continuó con la colocación del segundo anticuerpo anti-c-Jun [1:300] y se dejó incubando durante aproximadamente 16 horas en cámara húmeda a 4°C. Al día siguiente se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS. Se procedió a colocar el anticuerpo Alexa Fluor® 586 anti-conejo [1:300] con anticuerpos primarios Anti-NF 200, Anti-MBP y Anti-GFAP, y Alexa Fluor® 598 anti-conejo [1:300] en el caso del anticuerpo primario Anti-Faloidina. Se dejaron incubando los fluorocromos por 1:30 horas. Al finalizar la incubación se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS. Se procedió al montaje de las laminillas colocando 1 gota de Vectashield con DAPI (Vector).

#### 4.3.8 Obtención y análisis de microfotografías

Las laminillas se analizaron mediante microscopía de campo claro y de fluorescencia con microscopio óptico de epifluorescencia OLYMPUS modelo BX60,

utilizando una cámara Jenoptik Progres Gryphax, posteriormente se analizaron las imágenes con los programas Jenoptik e Image J para Mac.

#### 4.3.9 Soluciones

Paraformaldehído (PF) al 4% en PBS, pH 7.4: Solución para fijación de muestras histológicas. Se prepara con 4 g de paraformaldehído disueltos en 100 ml de PBS y se ajusta el pH.

Solución Buffer de Fosfatos (PBS): Solución buffer empleada en investigación biológica cuya osmolaridad, pH y concentración de iones es semejante a la del líquido extracelular. Se prepara disolviendo 8 g de Cloruro de Sodio (NaCl), 0.2 g de Cloruro de potasio (KCl), 1.41 g de bifosfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 0.24 g de bifosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), aforado a 1L de agua ultrapura, ajustando el pH a 7.4 con ácido clorhídrico (HCl).

Leche al 10% en PBS (Tritón 0.5%-Tween 0.2%): Se prepara disolviendo 5 g de leche light en polvo (Svelty Light), 100  $\mu\text{l}$  de Tween, 250  $\mu\text{l}$  Tritón aforados a 50 ml de PBS.

#### 4.4 Desarrollo del proyecto

Este proyecto se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias de la Facultad de Medicina de la UAEMex bajo la dirección de la Dra. Myrna Alexandra Roberta Dent que dispone de todo el equipo necesario para su ejecución: sistema desionizador de agua EASY modelo D8611, microscopio de epifluorescencia (OLYMPUS Mod. BX60), campana de flujo laminar ALDER, microscopio estereoscópico (OLYMPUS). Y demás equipo de uso corriente en un laboratorio de biología molecular, reactivos. Una cámara *Jenoptik Progres Gryphax*. Los programas para captura, procesamiento y análisis de imagen Jenoptik e Image J.

#### 4.5 Implicaciones éticas

Los animales fueron manejados de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

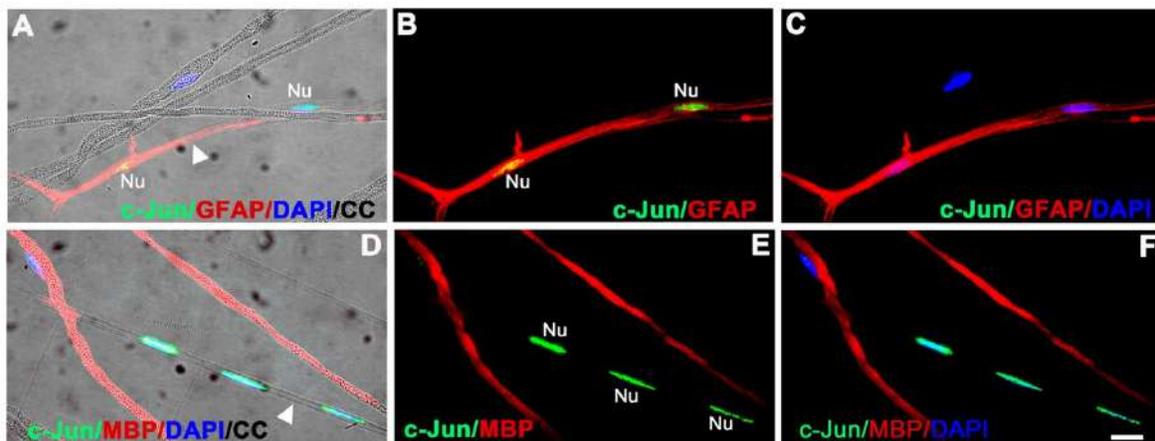
#### 4.6 Presupuesto y financiamiento

Los costos derivados del uso de reactivos y material de laboratorio serán absorbidos por el Laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México.

## V. RESULTADOS

### 5.1 Localización de c-Jun en el nervio ciático normal

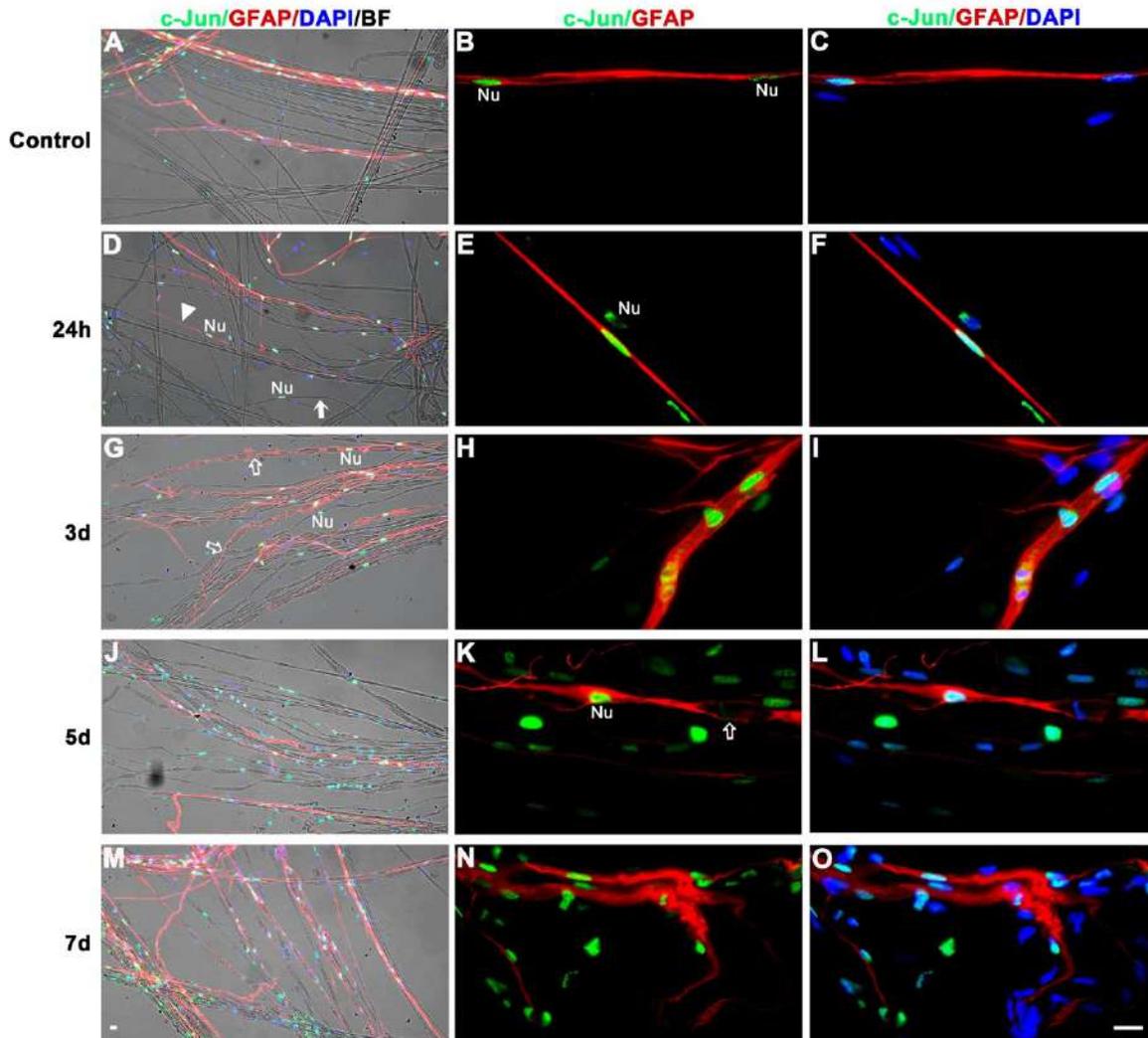
Se ha reportado que el factor de transcripción c-Jun se expresa en las células Remak en el nervio ciático (NC) en condiciones normales (Jessen y Mirsky, 2022), sin embargo no hay estudios que comparen la localización precisa de c-Jun en el NC normal con la degeneración Walleriana. Para identificar la localización de c-Jun en el NC en condiciones normales se realizaron inmunofluorescencias empleando los marcadores contra c-Jun, anti- GFAP (marca células Remak), anti-MBP (marca CSFM) y DAPI (marca núcleos) (Fig. 9). Los resultados muestran que c-Jun se localizan en los núcleos de las células Remak marcadas con GFAP (Fig. 9 A-C). En cambio, los núcleos de las CSFM marcadas con MBP no presentan marcaje de c-Jun (Fig. 9 D-F).



**Figura 9. Localización de c-Jun en el nervio ciático de la rata.** (A) Se muestra marcaje de c-Jun en los núcleos de las células Remak marcadas con GFAP (triángulo) en contraste de fase. (B) Se muestra marcaje fluorescente de c-Jun en los núcleos de las fibras marcadas con GFAP, (C) La imagen compuesta de los tres marcadores fluorescentes muestra colocalización de los núcleos marcados con c-Jun y DAPI en las células Remak; (D) En la imagen con fluorescencia y contraste de fase se muestra que las CSFM marcadas con MBP no tienen marcaje de c-Jun. (E) En fluorescencia se muestra que los c-Jun<sup>+</sup> no se expresa en las células MBP<sup>+</sup> (F) La imagen compuesta de los tres marcadores fluorescentes muestra que los núcleos de las CSFM no colocalizan con los núcleos c-Jun<sup>+</sup>. Barra=15  $\mu$ m

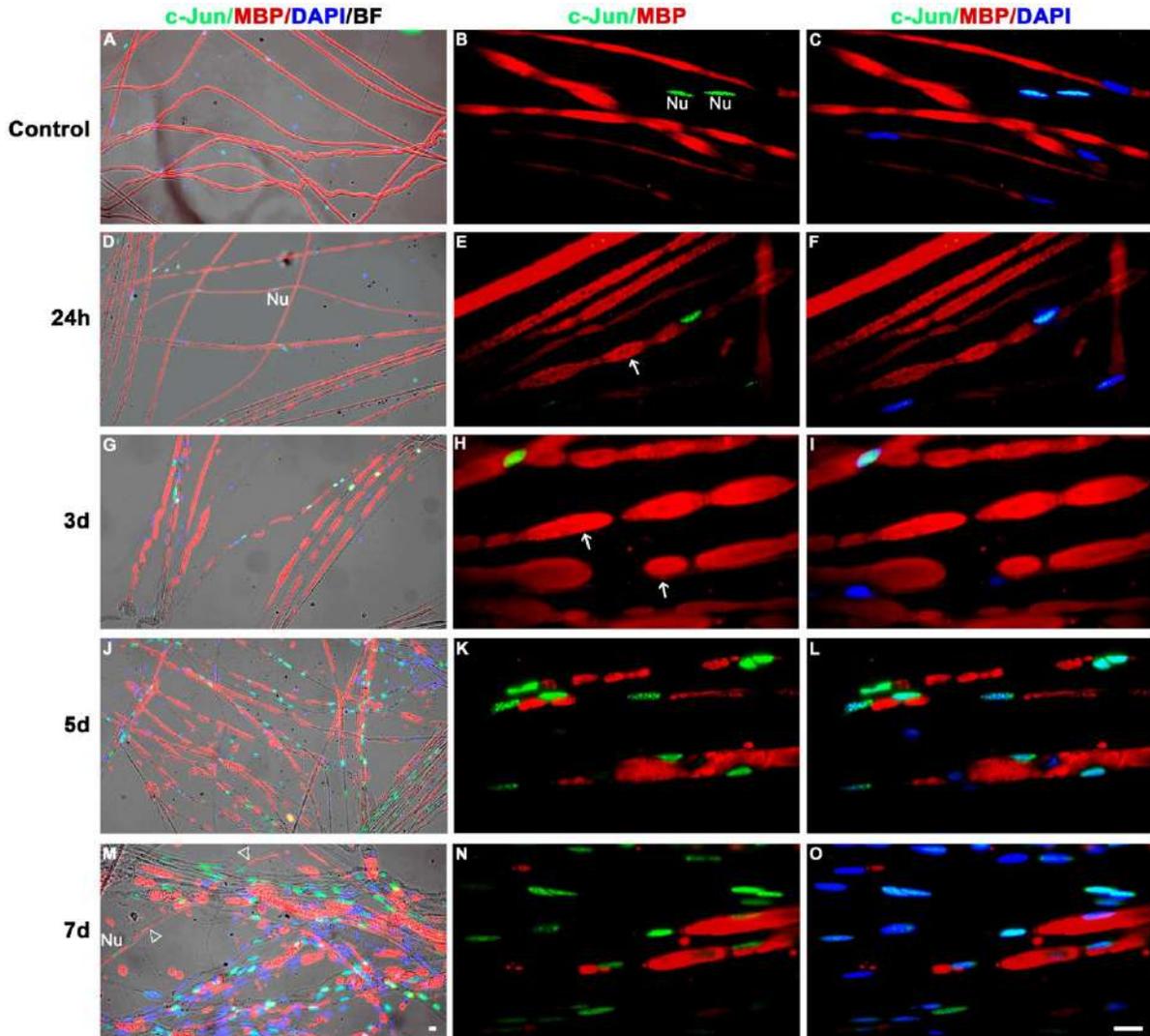
## **5.2 Localización de c-Jun en el nervio ciático durante la degeneración Walleriana**

Una vez establecida la localización de c-Jun en el NC en condiciones normales, se estudiaron los cambios de c-Jun durante la degeneración Walleriana a las 24h, 3d, 5d y 7d posteriores a la lesión, que corresponden a los eventos iniciales de la degeneración, incluyendo ensanchamiento o edema en la membrana axonal así como inicio de la degeneración axonal a las 24h, formación de ovoides de mielina y desdiferenciación a fenotipo de reparación de las CS a los 3d e inicio de la regeneración axonal (Lim et al., 2017; Rigoni y Negro, 2020; Segura, 2022). Para lograr lo anterior se realizaron inmunofluorescencias con anticuerpos contra c-Jun, GFAP y DAPI para observar los cambios en el marcaje de c-Jun durante la degeneración Walleriana, los resultados mostraron que con GFAP (Fig. 10), en el control se observa la expresión basal de c-Jun en algunos núcleos de células Remak marcadas con GFAP (Fig. 10 A-C). A las 24h después de la lesión las fibras presentan una estructura similar a la del control, sin embargo, la localización de c-Jun se observa tanto en algunos núcleos de las células Remak como en algunos núcleos de las CSFM (Fig. 10 D-F). A los 3d posteriores a la lesión, se ha reportado degeneración de las CS así como la formación de ovoides de mielina (Lim et al., 2017), nuestros resultados muestran que en la región distal hay mayor marcaje de GFAP, el cual se observa entre los ovoides de mielina, y un aumento en la cantidad de núcleos con el marcaje de c-Jun (Fig. 10 G-I). A los 5d y 7d se mantiene un fuerte marcaje de GFAP en la región distal el cual se aprecia en el citoplasma de las fibras degeneradas que pueden presentar ovoides de mielina; con respecto a los núcleos se observa un aumento en la cantidad de éstos, la mayoría con marcaje de c-Jun (Fig. 10 J-O), en concordancia con lo ya reportado por Lim et al. (2017) que describe un incremento de la proliferación de las CS de reparación en este periodo. En conjunto estos resultados nos muestran que durante la degeneración Wallerian se incrementa el número de núcleos c-Jun+, dicha alza en el marcaje de c-Jun es especialmente importante entre los 5d y 7d después de la lesión.



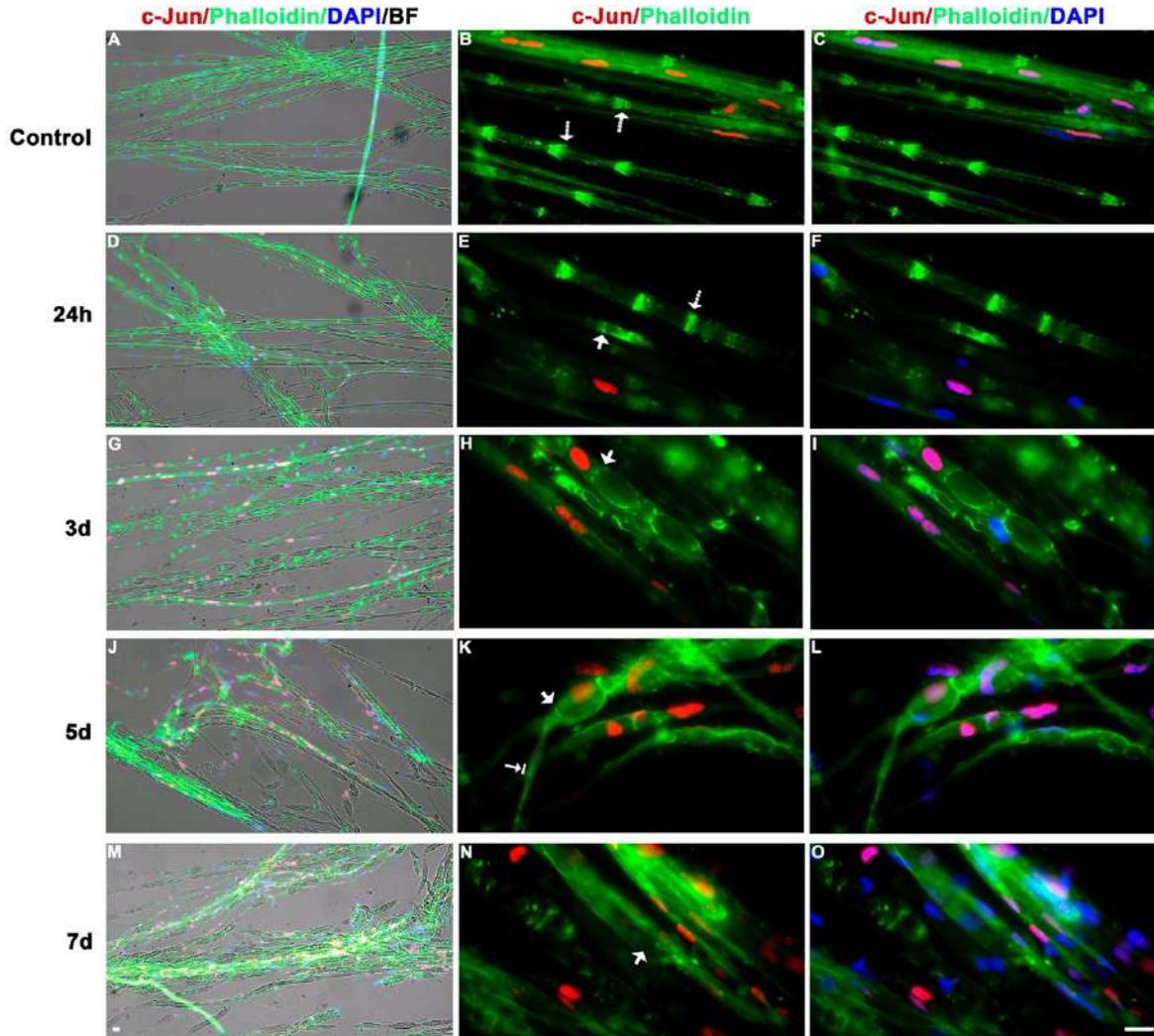
**Figura 10. La expresión de c-Jun aumenta durante la degeneración Walleriana en las células Remak.** En el control se observan núcleos c-Jun<sup>+</sup> en algunas células Remak (A-C); a las 24h se observa c-Jun<sup>+</sup> tanto en núcleos (Nu) de células Remak (triángulos) como CSFM (flecha rellena), el marcaje de GFAP es muy similar al encontrado a las 24h (D-F). A los 3d en la región distal hay aumento de la proliferación nuclear y en la expresión de c-Jun<sup>+</sup>, así como un aumento en el marcaje de GFAP en CS de reparación (contorno de flecha) (G-I). A los 5d aumenta la cantidad de núcleos, la expresión de c-Jun, así como las células GFAP<sup>+</sup> (J-L). A los 7d se presentan características similares a los 5d (M-O). Barra=15  $\mu$ m

A continuación se estudió la localización de c-Jun en relación con la desmielinización de las CSFM durante la degeneración Walleriana, después de una lesión al nervio las CSFM sufren una conversión a un fenotipo de reparación, proceso en el cual c-Jun se describe como un regulador maestro ya que actúa como un inhibidor de la mielinización (Jessen y Arthur-Farraj, 2019), para describir los cambios y el aumento en el marcaje de c-Jun en las CS de reparación se utilizaron inmunofluorescencias con marcadores contra c-Jun, MBP y DAPI (Fig. 11) durante la primera etapa de la degeneración Walleriana. En el control sólo se observa marcaje de c-Jun en las células Remak, mientras que los núcleos de las CSFM no presentan c-Jun (Fig. 11 A-C). A las 24 horas, en la región distal se observa la degeneración de algunas fibras con ensanchamientos en la mielina que formarán ovoides, cuyos núcleos expresan c-Jun (Fig. 11 D-F). A los 3d hay mayor cantidad de fibras degeneradas con ovoides de mielina bien delimitados y núcleos en proliferación los cuáles presentan marcaje de c-Jun (Fig. 11 G-I). A los 5d y 7d es muy evidente la fragmentación de la mielina en ovoides en la mayoría de las fibras y el aumento en la proliferación de núcleos la mayoría marcados con c-Jun, estos núcleos se alinean en el citoplasma de las fibras degeneradas (Fig. 11 J-O), para formar las bandas de Büngner (Lim et al., 2017). A los 7d también es posible observar que algunas fibras presentan segmentos cortos y delgados de mielina con la presencia de núcleos que se encuentran equidistantes entre ellos, los cuáles presentan un ligero marcaje de c-Jun, lo anterior sugiere la presencia de fibras remielinizadas con marcaje de c-Jun. Los resultados anteriores sugieren que el aumento de núcleos con marcaje c-Jun se relaciona con el cambio de las CSFM a un fenotipo de reparación, y que alrededor de los 5d a 7d los núcleos c-Jun+ se organizan al interior de la lámina basal para formar las bandas de Büngner.



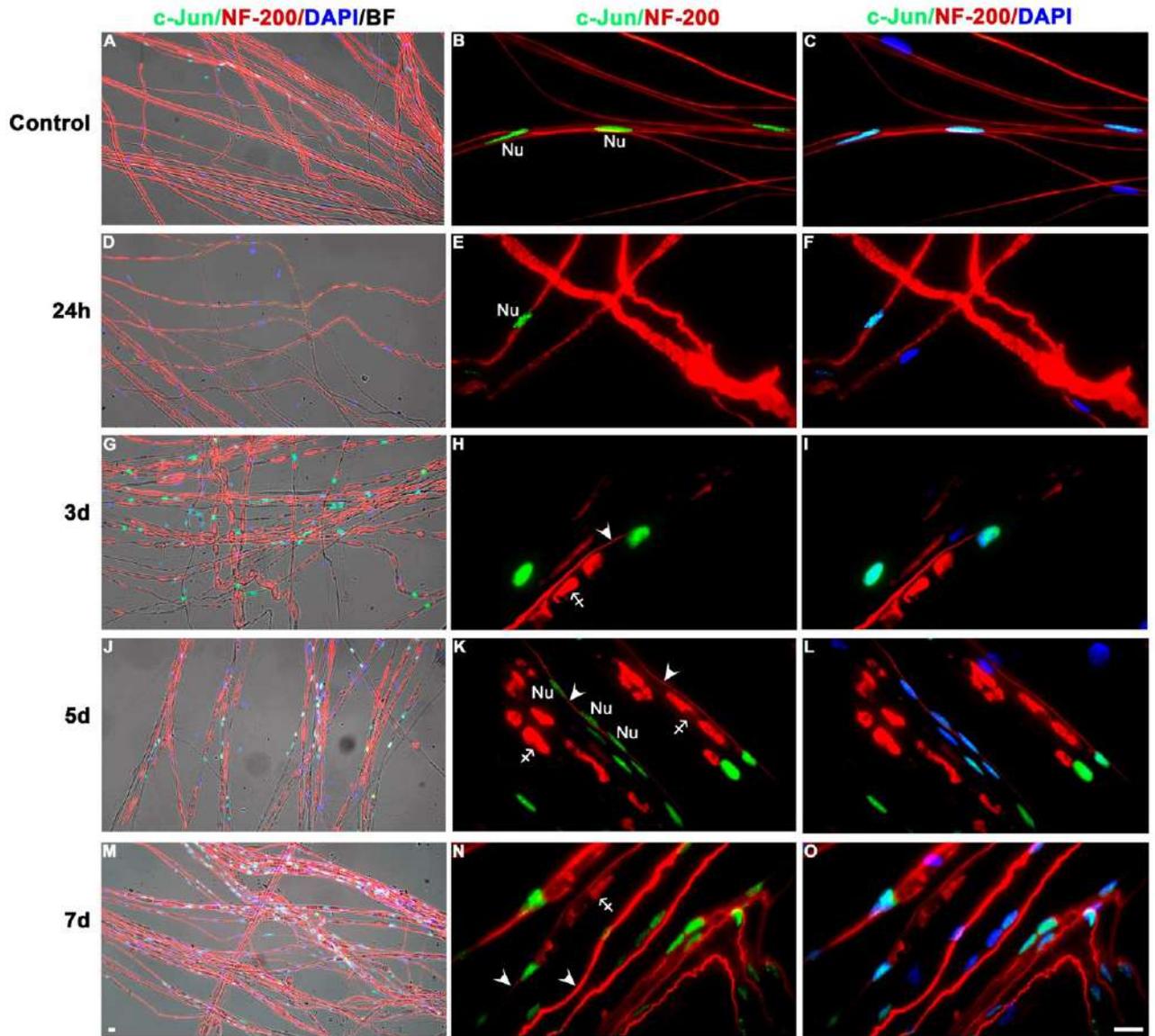
**Figura 11. Durante la degeneración Walleriana se observa c-Jun en las CS marcadas con MBP y aumenta el número de núcleos marcados con c-Jun en la región distal del nervio lesionado.** Control de c-Jun con MBP, c-Jun no se encuentra en CSFM (A-C). A las 24h c-Jun comienza a expresarse en algunas CFMS cuya mielina presenta ensanchamientos (E-F). A los 3d aumenta tanto la cantidad de núcleos (Nu), como la expresión de c-Jun, mientras que la mielina se encuentra en forma de ovoides (flecha delgada) bien delimitados (G-I). A los 5d continúa la proliferación nuclear con mayor expresión de c-Jun y se pueden observar núcleos c-Jun+ (flecha) que forman parte de las bandas de Büngner (J-L). A los 7d algunos núcleos se organizan en bandas de Büngner expresando c-Jun, aún hay algunos ovoides de mielina (M-O). Barra=15 µm

Con base en el resultado anterior, se observa que durante la degeneración Walleriana la mielina se fragmenta en ovoides, este proceso se ha relacionado con cambios en el citoesqueleto de actina que se localiza en ISL, alrededor de las cuales se forman los ovoides (Jung et al., 2011). Con el fin de visualizar el comportamiento de c-Jun en relación con los filamentos de actina durante el proceso de degeneración se realizaron doble inmunofluorescencias utilizando el anticuerpo anti c-Jun y el marcador faloidina, el cual reconoce F-actina, y DAPI (Fig. 12). Los resultados muestran que en el nervio control la actina se encuentra bien delimitada en las ISL, en forma de cono, y en la membrana abaxonal de las CSFM, mientras que en las células Remak se observa un marcaje lineal en el citoplasma, en concordancia con lo ya reportado por Trapp et al. (1989); el marcaje de c-Jun sólo se encuentra en los núcleos de las células Remak (Fig. 12 A-C flechas en B). A las 24h en la región distal la mayoría de las CSFM conservan el marcaje de actina en las ISL, sin embargo, en algunas de ellas la actina se comienza a desestructurar (flecha corta en fig. 12 E), perdiendo su forma de cono y sus núcleos comienzan a mostrar marcaje de c-Jun (Fig. 12 D-F). A los 3d, en la región distal se forman los ovoides de mielina y se observan mayor cantidad de fibras que presentan a la actina desestructurada cuyo marcaje se localiza principalmente en la periferia, además se observa marcaje de F-actina en algunas fibras, también se observa marcaje de c-Jun en los núcleos, de los cuales algunos están en proliferación (Fig. 12 G-I). A los 5d el marcaje de actina se encuentra en la periferia de los ovoides y en las fibras ya desmielinizadas, así como un marcaje fibrilar en algunas partes de las CS de reparación (flecha con línea delantera), c-Jun se observa en todos los núcleos en proliferación (Fig.12 J-L). A los 7d se observa un marcaje fibrilar de actina en las células de reparación, que pueden corresponder a las bandas de Büngner; hay un aumento en la proliferación nuclear, así como en el marcaje de c-Jun, el cual está presente en la mayoría de los núcleos (Fig.12 M-O). En conclusión, la actina se encuentra inicialmente alrededor de los ovoides de mielina y después en las fibras con fenotipo de reparación, en tanto c-Jun se observa desde el inicio de la degeneración en algunos núcleos de CSFM y posteriormente en los núcleos en proliferación de las células en reparación.



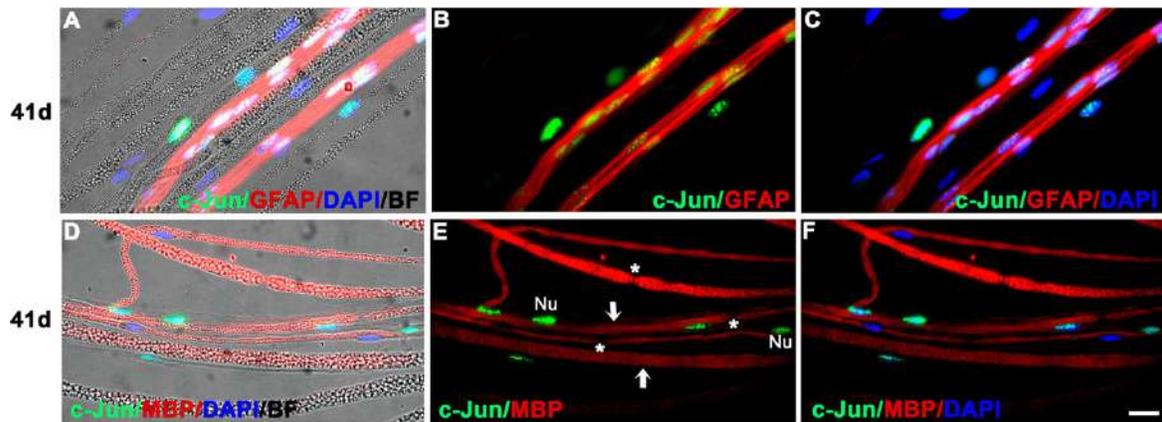
**Figura 12. Durante la degeneración Walleriana c-Jun aumenta mientras la actina es desestructurada y reestructurada en la región distal del nervio lesionado.** En el control se observa marcaje de c-Jun basal y actina bien delimitada en las incisuras de Schmidt-Lanterman (flecha achurada) (A-C). A las 24h aumenta ligeramente la expresión de c-Jun, la actina comienza a desestructurarse en la región distal (flecha corta) (D-F). A los 3d, hay aumento de núcleos y de c-Jun, la actina desestructurada se concentra en los ovoides de mielina (G-I). A los 5d, hay aumento tanto en la cantidad de núcleos, como en el marcaje de c-Jun, la actina continúa desensamblada sin embargo se puede observar también forma fibrilar (flecha con línea delantera) (J-L). A los 7d, continúa el aumento en la cantidad de núcleos, la mayoría expresando c-Jun, la actina continúa desestructurada (M-O). Barra=15  $\mu$ m

Dentro de los eventos de la degeneración Walleriana se incluye a la degeneración axonal y la consecuente regeneración para volver a inervar su blanco original (Dubový, 2011); en los cuales se ha reportado que c-Jun es un importante factor para la supervivencia neuronal y regeneración axonal a través de la activación de diversos genes, incluidos aquellos relacionados con factores neurotróficos y de crecimiento pertenecientes a la familia de las neurotrofinas (Fontana et al., 2012). Debido a lo anterior se estudió el marcaje de c-Jun durante la degeneración y regeneración axonal para poder correlacionar la activación de c-Jun con estos eventos. Para lograr lo anterior se realizaron preparaciones de doble inmunofluorescencia con anticuerpos contra c-Jun, anti-NF200 (marca los axones) y DAPI (Fig. 13). En el control se encontraron axones bien delimitados con anti-NF200, y se observa expresión de c-Jun basal en algunas fibras Remak (Fig. 13 A-C). A las 24h en la región distal los axones muestran un marcaje alterado caracterizado por ensanchamientos y disrupción del marcaje; algunos núcleos son c-Jun+ (Fig. 13 D-F). A los 3d en la región distal se encuentran axones fragmentados en los ovoides de mielina, también se observan axones bien delimitados a lo largo de la periferia del citoplasma de las células, lo que sugiere crecimiento axonal (Fig. 13 H-I), dichas fibras son c-Jun+ y hay un aumento en la proliferación nuclear (Fig. 13 G-I). A los 5d se encuentra un gran número de axones degenerados, sin embargo, es posible encontrar la formación de bandas de Büngner con axones en crecimiento. Hay un aumento en el número de núcleos y la mayoría de éstos expresan c-Jun, principalmente aquellos que se encuentran en las bandas de Büngner (Fig. 13 J-L). A los 7d se observan tanto axones en degeneración como axones a lo largo de las bandas de Büngner, también se encuentra aumento en la cantidad de núcleos de los cuales la mayoría expresa c-Jun (Fig. 13 M-O). En conclusión, los resultados indican que a partir de los 3d es posible encontrar axones en regeneración en fibras donde aún se encuentran ovoides con axones degenerados, a partir de los 5d se observa que muchos de los núcleos marcados con c-Jun forman parte de las bandas de Büngner, los cuales sirven de guía para la regeneración axonal.



**Figura 13. Expresión de c-Jun durante la degeneración y regeneración axonal.** En el control se observa c-Jun+ basal, los axones se encuentran bien delimitados (A-C). A las 24h, en la región distal algunos núcleos (Nu) muestran marcaje c-Jun, los axones comienzan a degenerarse (D-F). A los 3d, en la región distal se observa aumento de núcleos y de c-Jun, los axones se encuentran degenerados en los ovoides de mielina (flecha con trazo horizontal), algunos filamentos de axones se extienden por el citoplasma de ciertas CS (punta de flecha) (G-I). A los 5d, hay aumento en el número de núcleos, la mayoría expresando c-Jun, se encuentran axones degenerados y algunos axones regenerados comienzan a cruzar el puente de la lesión siguiendo las bandas de Büngner (J-L). A los 7d, en la región distal hay aumento en la cantidad de núcleos la mayoría expresando c-Jun, hay mayor cantidad de axones en regeneración y algunos degenerados (M-O). Barra=15  $\mu$ m

Finalmente, para comprobar la rediferenciación de CS y su relación con la expresión de c-Jun después de los eventos de la degeneración Walleriana se llevaron a cabo dobles inmunofluorescencias en nervio de 41d tras una lesión con GFAP, c-Jun y DAPI, así como con MBP, c-Jun y DAPI. Se observó que las células que adoptan un fenotipo Remak muestran algunos núcleos con un marcaje basal de c-Jun (Fig. 14 A-C); mientras que las células que adoptan un fenotipo mielinizante no muestran marcaje con c-Jun (Fig. 14 D-F). Los anteriores resultados indican que una vez que el nervio se ha regenerado el marcaje de c-Jun vuelve a tener características similares al control previo a una lesión.



**Figura 14. Marcaje de c-Jun después de la regeneración nerviosa.** Una vez que la regeneración se ha llevado a cabo se observa una expresión basal de c-Jun en algunos de los núcleos (Nu) de las células Remak (A-C); en la CSFM c-Jun no se expresa (D-F). Nodos de Ranvier (asteriscos). Barra=15  $\mu$ m

## VI. DISCUSIÓN

En este trabajo se realizó la localización y distribución del factor de transcripción c-Jun durante la DW, considerado un regulador maestro para la conversión de las CS maduras a un fenotipo de reparación y es esencial para la regeneración exitosa del nervio (Fontana et al., 2012; Arthur-Farraj et al., 2012; Jessen y Mirsky, 2019). En este proyecto se describen los cambios en la distribución del factor de transcripción durante la DW en un modelo *in vivo*, utilizando la técnica de inmunofluorescencia, la cual nos permite indicar la presencia de la proteína en las CS de reparación y correlacionarse con la expresión de marcadores moleculares en la DW como GFAP, MBP, actina y NF, que ayudan a indicar en qué parte del proceso de la DW se encuentra la región distal del nervio.

Como se observa en los resultados, en nervios sanos, c-Jun se expresa selectivamente entre las CS, ya que sólo algunos de los núcleos de las células Remak se encuentran marcados con c-Jun mientras que los núcleos de las CSFM no presentan marcaje de dicho factor de transcripción (Fig. 9), lo que concuerda con lo reportado por Shy et al. (1996).

Se ha reportado que los niveles del RNAm de c-Jun, utilizando la técnica de Northern Blot, aumentan muy rápido después de la lesión en las primeras horas y se mantiene al alza hasta los 12d pos-lesión (Shy et al., 1996). Los resultados del presente trabajo muestran pequeños cambios en el marcaje de c-Jun a las primeras 24h (Fig. 10 D-F y Fig. 11 D-F), se observa que la mayoría de los núcleos de las células Remak presentan el factor de transcripción y en las CSFM se observa marcaje de c-Jun en los núcleos sólo en aquellas fibras que presentan varicosidades en la mielina, es hasta los 3 días donde los niveles de proteína de c-Jun aumentan radicalmente en ambas CS. Lo anterior indica que no hay una correlación entre el rápido aumento del transcrito de c-Jun y el marcaje de su proteína a las 24h, es decir, los niveles del RNAm de c-Jun aumentan antes que la proteína.

Siguiendo con los eventos de la degeneración, observamos que a los 3d después de la lesión (Fig. 10 G-I y Fig. 11 G-I), hay una fragmentación de la mielina que se aprecia por la formación de ovoides de diferentes tamaños a lo largo de la fibra, es notorio el aumento de c-Jun en los núcleos de estas fibras degeneradas, estos núcleos se localizan en los espacios citoplasmáticos entre los ovoides. En algunas fibras se observan núcleos muy cercanos que sugieren que c-Jun está asociado con la proliferación de las CS de reparación, en contraste a lo descrito por Shy et al. (1996) que indica que durante el desarrollo de las CS, c-Jun no es un marcador de proliferación.

Cabe señalar que la fragmentación de la mielina está delimitada por las ISL (Jung et al., 2011); en este trabajo observamos que a los los 3d (Fig. 10 G-I) se encuentra marcaje de actina desestructurada en la periferia de los ovoides lo que sugiere que un mayor marcaje de c-Jun se relaciona con un aumento en la despolimerización de los filamentos de actina, lo cual concuerda con lo reportado en la literatura respecto a que la despolimerización de la actina es un elemento importante para la

formación de los ovoides de mielina y por tanto para la desdiferenciación de las CS al fenotipo de reparación (Segura-Anaya, 2022), a diferencia de lo estipulado por Jung et al (2011) quienes indican que es la polimerización de la actina la que causa la formación de los ovoides de mielina.

El mayor marcaje de c-Jun se encontró a los 5d y 7d (Fig. 10 J-O y Fig. 11 J-O), lo que concuerda con un aumento de la proliferación nuclear así como un mayor número de CS en fenotipo de reparación, las cuales se encuentran formando las bandas de Büngner, cuyos núcleos expresan c-Jun. Lo anterior coincide con que c-Jun es esencial para la transición de las CS madura a la CS en fenotipo de reparación (Jessen y Mirsky, 2019).

Se ha descrito que en células modificadas genéticamente para sobreexpresar la proteína c-Jun se inhibe a Krox20, el cual es un factor regulador de la transcripción que se ha asociado con la mielinización de las CS, por lo tanto, al inhibirse Krox20 la mielinización de la CS se ve interrumpida, pudiendo considerarse a c-Jun como un regulador negativo de la mielinización (Parkinson et al., 2008). En el presente trabajo se observa que los núcleos c-Jun positivos a las 24h se asocian con CSFM edematizadas (Fig. 11 D-F) que forman ovoides de mielina, lo cual se corrobora a los 3d en donde se observa un aumento de c-Jun y una mayor cantidad de mielina en ovoides (Fig. 11 G-I), lo anterior concuerda con que la activación de c-Jun es necesaria para el proceso de pérdida de la mielina en las CS. Sin embargo, los resultados en días posteriores muestran que a los 7d (Fig. 11 M) se pueden observar algunas fibras remielinizadas (que forman pequeños internodos) las cuales aún son c-Jun+, lo cual sugiere que la presencia de c-Jun no impide la mielinización y por lo tanto no se puede considerar totalmente un regulador negativo de la mielinización, contrario a lo descrito por Parkinson et al. (2008).

Considerando que al inicio de este proyecto se entendía a c-Jun como un regulador negativo de la mielinización (Parkinson et al., 2008), se pensó que el marcaje de c-Jun podría ayudar a identificar a aquellas CS en fenotipo de reparación que al volver a un fenotipo maduro adquieren un fenotipo mielinizante, sin embargo no se encontró un patrón en los núcleos c-Jun+ que pudiese indicar aquellos que formarán parte de CSFM o de células Remak, ya que es posible encontrar células remielinizadas que expresan c-Jun a los 7d (Fig. 11 M).

Diferentes estudios llevados a cabo en Western blots, Northern blots y microarreglos muestran que c-Jun puede considerarse un marcador de CS en fenotipo de reparación (Jessen y Arthur-Farraj, 2019), en concordancia con lo anterior nuestros resultados muestran que c-Jun puede ser utilizado en estudios morfológicos como marcador de células en fenotipo de reparación, ya que se encuentra presente en las células que forman parte de las bandas de Büngner (Fig 10 K-L).

Se ha demostrado que el factor de transcripción c-Jun es importante para la supervivencia neuronal a través de estudios de microarreglos de genes neurotróficos (Jessen y Arthur-Farraj, 2019), por lo que en este trabajo se estudió la relación morfológica del crecimiento axonal con la expresión de c-Jun. Se

observaron axones en crecimiento que siguen las bandas de Büngner con c-Jun positivo (Fig. 13 G-N) lo que correlaciona con lo descrito por Jessen y Arthur-Farrarj (2019), y también refuerza el que a los 7d pos lesión se puedan encontrar fibras remielinizadas con c-Jun.

## VII. CONCLUSIONES

1. La expresión de c-Jun se observa en los núcleos de las células de reparación a partir de los 3 días, con un pico máximo entre 5 y 7 días.
2. Los núcleos de las células de reparación organizadas en bandas de Büngner expresan c-Jun.
3. El proceso de remielinización es independiente de la expresión de c-Jun.
4. La presencia de c-Jun en las células de reparación no actúa como marcador de qué tipo de células de reparación adoptará el fenotipo mielinizante o no mielinizante.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Carroll, S. L., y Worley, S. H. (2016). Wallerian degeneration. *The Curated Reference Collection in Neuroscience and Biobehavioral Psychology*, 485–491. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809324-5.02077-0>
- Cisterna, B. A., Arroyo, P., y Puebla, C. (2019). Role of connexin-based gap junction channels in communication of myelin sheath in Schwann cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00069>
- Dubový, P. (2011). Wallerian degeneration and peripheral nerve conditions for both axonal regeneration and neuropathic pain induction. *Annals of Anatomy*, 193(4), 267–275. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2011.02.011>
- Fazal, S. (2017). *Levels of Schwann cell c-Jun control nerve development and response to injury*. [Tesis de Doctorado, University College London]. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/321483656>
- Fontana, X., Hristova, M., Da Costa, C., Patodia, S., Thei, L., Makwana, M., Spencer-Dene, B., Latouche, M., Mirsky, R., Jessen, K. R., Klein, R., Raivich, G., y Behrens, A. (2012). C-Jun in Schwann cells promotes axonal regeneration and motoneuron survival via paracrine signaling. *Journal of Cell Biology*, 198(1), 127–141. <https://doi.org/10.1083/jcb.201205025>
- Geneser, F., Brüel, A., Christensen, E., Trantum-Jensen, J. y Qvortrup, K. (2021). *Geneser Histología* (4ª ed). Médica Panamericana.
- Hansen, M. D. H., y Kwiatkowski, A. V. (2013). Control of Actin Dynamics by Allosteric Regulation of Actin Binding Proteins. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 303, 1–25. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407697-6.00001-5>
- Jessen, K. R., y Arthur-Farraj, P. (2019). Repair Schwann cell update: Adaptive reprogramming, EMT, and stemness in regenerating nerves. *GLIA*, 67(3), 421–437. <https://doi.org/10.1002/glia.23532>
- Jessen, K. R., y Mirsky, R. (2005). The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(9), 671–682. <https://doi.org/10.1038/nrn1746>
- Jessen, K. R., y Mirsky, R. (2016). The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *Journal of Physiology*, 594 (13), 3521–3531. <https://doi.org/10.1113/JP270874>
- Jessen, K. R., y Mirsky, R. (2019). The success and failure of the Schwann cell response to nerve injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00033>
- Jessen, K. R., y Mirsky, R. (2022). The Role of c-Jun and Autocrine Signaling Loops in the Control of Repair Schwann Cells and Regeneration. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 15:820216. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.820216>
- Jessen, K. R., Mirsky, R., y Lloyd, A. C. (2015). Schwann cells: Development and role in nerve repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(7), 1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020487>

- Jung, J., Cai, W., Lee, H. K., Pellegatta, M., Shin, Y. K., Jang, S. Y., Suh, D. J., Wrabetz, L., Feltri, M. L., y Park, H. T. (2011). Actin polymerization is essential for myelin sheath fragmentation during Wallerian degeneration. *Journal of Neuroscience*, 31(6), 2009–2015. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4537-10.2011>
- Lim, E. M. F., Nakanishi, S. T., Hoghooghi, V., Eaton, S. E. A., Palmer, A. L., Frederick, A., Stratton, J. A., Stykel, M. G., Whelan, P. J., Zochodne, D. W., Biernaskie, J., y Ousman, S. S. (2017). AlphaB-crystallin regulates remyelination after peripheral nerve injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 114(9), E1707–E1716. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612136114>
- Menorca, R. M. G., Fussell, T. S., y Elfar, J. C. (2013). Nerve physiology. Mechanisms of injury and recovery. *Hand Clinics*, 29(3), 317–330. <https://doi.org/10.1016/j.hcl.2013.04.002>
- Muñoz, S. R., Miranda, E. A., Giannini, E. J., Escobar, F. A., Astudillo, C. A., Muñoz, S. R., Miranda, E. A., Giannini, E. J., Escobar, F. A., y Astudillo, C. A. (2022). Ultrasonido de nervios periféricos I (aspecto normal). *Revista chilena de radiología*, 28(3), 92–98. <https://doi.org/10.24875/RCHRAD.22000033>
- Nave, K. A., y Werner, H. B. (2014). Myelination of the nervous system: Mechanisms and functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 503–533. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013101>
- Parkinson, D. B., Bhaskaran, A., Arthur-Farraj, P., Noon, L. A., Woodhoo, A., Lloyd, A. C., Feltri, M. L., Wrabetz, L., Behrens, A., Mirsky, R., y Jessen, K. R. (2008). c-Jun is a negative regulator of myelination. *Journal of Cell Biology*, 181(4), 625–637. <https://doi.org/10.1083/jcb.200803013>
- Reed, C. B., Feltri, M. L., y Wilson, E. R. (2022). Peripheral glia diversity. *Journal of Anatomy*, 241(5), 1219–1234. <https://doi.org/10.1111/joa.13484>
- Rigoni, M., y Negro, S. (2020). Signals Orchestrating Peripheral Nerve Repair. *Cells*, 9(8), 1768. <https://doi.org/10.3390/cells9081768>
- Ross, M y Pawlina, W. (2020) *Ross. Histología: Texto Y Atlas. Correlación Con Biología Molecular y Celular* (8va ed). Wolters Kluwer
- Salzer, J. L. (2015). Schwann cell myelination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(8), a020529. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020529>
- Segura-Anaya, E. (2022). *Localización de la AQP1 en el nervio ciático normal y lesionado de la rata y diferencias entre rata y ratón en la localización de AQP1 y en los patrones de expresión de las isoformas de aqp del nervio ciático*. [Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México]. Repositorio de Tesis DGBSDI <https://hdl.handle.net/20.500.14330/TES01000826613>
- Shy, M. E., Shi, Y., Wrabetz, L., Kamholz, J., y Scherer, S. S. (1996). Axon-Schwann Cell Interactions Regulate the Expression of c-Jun in Schwann Cells. *Journal of Neuroscience Research*, 43, 511-525. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19960301\)43:5<511::AID-JNR1>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19960301)43:5<511::AID-JNR1>3.0.CO;2-L)
- Taveggia, C., Zanazzi, G., Petrylak, A., Yano, H., Rosenbluth, J., Einheber, S., Xu, X., Esper, R. M., Loeb, J. A., Shrager, P., Chao, M. V., Falls, D. L., Role, L., & Salzer, J. L. (2005). Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron*, 47(5), 681–694. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.08.017>

