

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA FACULTAD DE CIENCIAS

Licenciatura en Biología / Profundización en Genética

Pasantía

Estudio molecular y morfométrico en Sistema Nervioso Periférico proveniente de pacientes portadores de la neuropatía de origen genético Charcot-Marie-Tooth.

Pasante: Gonzalo Rosso
Responsable: Dra. Alejandra Kun

Departamento de Proteínas y Ácidos Nucleicos, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (I.I.B.C.E)-Unidad Asociada a la Sección Bioquímica de Facultad de Ciencias

Contenido

Indice	Página N°
1. Introducción.	5
1.1 <i>Síntesis: desarrollo del desarrollo del Sistema Nervioso</i>	5
1.2 <i>Funciones básicas de las células gliales</i>	6
<i>Desde células madre a neuronas y glías:</i>	
1.3 <i>Rol de las proteínas SOXs durante el desarrollo del Sistema Nervioso</i>	7
2. Células gliales del sistema nervioso periférico: origen y desarrollo.	8
2.1 <i>Regulación y supervivencia de las células de Schwann</i>	12
2.2 <i>Relación entre axones y glías</i>	13
2.2.1 <i>Citoesqueleto de las células de Schwann e interacciones con la lámina basal.</i>	13
2.2.2 <i>Control radial del citoesqueleto axonal a partir de señales que involucran ambos tipos celulares.</i>	14
3. Mielina.	16
3.1 <i>Composición Lipídica.</i>	18
3.2 <i>Los lípidos de la mielina del SNC y el SNP son similares.</i>	19
3.3 <i>Mielina compacta.</i>	19
3.4 <i>Mielina no compacta.</i>	21
3.5 <i>Composición proteica de la mielina.</i>	22
3.6 <i>Proteínas mielínicas del SNC.</i>	22
3.7 <i>Proteínas mielínicas del SNP.</i>	27

3.8 <i>Proteínas mielinicas compartidas tanto en la mielina del SNC como en el SNP.</i>	28
3.9 <i>Otras proteínas relacionadas a la mielina.</i>	30
3.10 <i>Enzimas asociadas a la mielina.</i>	30
4. Estructura del complejo “axón-célula de Schwann mielinizante”.	31
4.1 <i>Nodos de Ranvier.</i>	32
4.2 <i>Paranodos.</i>	35
4.3 <i>Juxtaparanodos.</i>	37
4.4 <i>Internodos.</i>	38
4.5 <i>Incisuras de Schmidt-Lanterman.</i>	38
5. Neuropatías periféricas hereditarias.	
5.1 <i>Base celular de la clasificación de neuropatías hereditarias.</i>	41
6. Análisis Morfométrico de fibras nerviosas para el estudio de neuropatías periféricas.	42
6.1 <i>Rol del análisis histológico-morfométrico en el diagnóstico de neuropatías periféricas.</i>	42
6.2 <i>Evolución de los parámetros morfométricos y su significado biológico.</i>	43
7. Objetivos generales y específicos.	44
8. Materiales y métodos.	45
8.1 <i>Colectado de las muestras y procesamiento del tejido.</i>	45
8.2 <i>Tratamiento de las muestras obtenidas por micrótopo para inmunocitoquímica.</i>	45
8.3 <i>Análisis Morfométrico de fibras nerviosas.</i>	46

9. Resultados.

9.1 Análisis Morfométrico	48
9.2 Área axonal, grosor mielinico y densidad de fibras promedio por fascículo.	50
9.3 Análisis histológico y clínico	54
9.4 Análisis inmuno-citoquímico	58

10. Discusión y conclusiones.

10.1 Factor-g, área axonal, grosor mielinico y densidad de fibras por fascículo.	60
10.2 Inmunocitoquímica	61
10.3 Conclusiones	62

11. Bibliografía 64

12. Anexos I y II

Gliogénesis en el Sistema Nervioso.

Factores implicados en el control temprano de la gliogeneis

Introducción	II
--------------	----

12.1 SOX 10	II
-------------	----

12.2 Neuregulina-1 y receptores ErbB	IV
--------------------------------------	----

12.3 Notch	VI
------------	----

12.4 BMP-2 y BMP-4	VI
--------------------	----

Clasificación de subtipos CMT y sus mutaciones asociadas	VII
--	-----

Tabla 3	VIII
---------	------

Introducción

1.1 Síntesis: desarrollo del sistema nervioso.

El desarrollo del sistema nervioso de los vertebrados es un evento complejo el cual ha sido foco de intensos estudios durante las últimas décadas, atrayendo la atención de numerosos científicos de distintas áreas de la ciencia y el conocimiento. A nivel de su funcionamiento celular, anatómico, fisiológico y sus intrincados procesos de desarrollo, el sistema nervioso requiere una gran cantidad de eventos en perfecta sincronía para su crecimiento y mantenimiento. Realizaremos una revisión de los principales mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo y sus posibles analogías, observadas durante la regeneración y reparación del sistema nervioso periférico (SNP) lesionado o bajo condiciones de alteración crónica: Neuropatía periférica hereditaria. En todos los animales vertebrados el sistema nervioso se desarrolla a partir del ectodermo embrionario, precisamente de una región denominada placa neural. Durante el proceso de formación del sistema nervioso, células madres nerviosas se diferencian en neuronas y células gliales, en un proceso dependiente de señales procedentes del mesodermo subyacente, que se originan precisamente en el notocordio. En el proceso inicial de formación del sistema nervioso (Figura 1), la placa neural la cual se dispone todo a lo largo de la superficie dorsal del embrión, gradualmente se pliega sobre si misma formando el surco neural. Esto se debe a que la proliferación celular es mayor a lo largo de los márgenes de la placa neural en comparación con la línea media. Esta hendidura situada en la línea media, se va profundizando gradualmente y se cierra, formando una estructura hueca denominada tubo neural. El tubo neural está recubierto por neuroepitelio, que consta de células epiteliales que generan prácticamente la totalidad de las neuronas del sistema nervioso central. La porción caudal del tubo neural forma la médula espinal, mientras que la rostral se convierte en el cerebro. A partir del neuroepitelio, se desarrollan también las células gliales (macroglia) del SNC, y la cavidad situada dentro del tubo neural forma el sistema ventricular. Mientras que el SNC se desarrolla a partir de las células epiteliales que revisten el tubo neural, muchos componentes clave del sistema nervioso periférico lo hacen a partir de una población de células llamadas cresta neural. Esta colección de células surge de la región dorsal del tubo neural, desplazándose periféricamente y dando origen a todas las neuronas cuyos cuerpos celulares se encuentran fuera del SNC.

Luego de tomar posición en la superficie dorsal del tubo neural, las células de la cresta neural pronto migran, algunas en dirección lateral y otras ventralmente. En dirección lateral lo hacen diferenciándose en melanocitos de la piel, ventralmente para hacerlo en neuronas de los ganglios sensoriales dorsales y glia acompañante, o en componentes periféricos del sistema nervioso autónomo. La cresta neural da también origen a células no neurales, incluidas las células cromafín de la médula suprarrenal y las células de Schwann, que forman la vaina mielínica de los nervios periféricos. Las células de la cresta neural de la parte más anterior del tronco, la denominada cresta cardíaca generan fibroblastos y algo de células musculares, mientras que las de la cresta cefálica en la cabeza del tronco forman cartílago y hueso. Las dos capas meníngeas interiores, la aracnoides y la pia mater, se derivan también de la cresta neural, no

obstante, la capa más externa y mas dura, la dura mater, se deriva del mesodermo (*John H. Martin, Neuroanatomía Segunda Edición 2000*).

Los mecanismos que conducen a esta población de células homogénea de la cresta nerviosa a diferenciarse y generar dicha diversidad celular son poco conocidos y de intensa investigación actual. La totipotencialidad celular en combinación con señales activadoras y represoras, serian responsables de dirigir la migración y diferenciación de las células de la cresta neural. Es fundamental para el desarrollo y migración de las células madre precursoras la participación de los factores de transcripción de la familia Sox en sinergia con otros factores como por ejemplo (FoxD3, Slug/Snail y Krox20) entre otros. Se tiene evidencia que la presencia del factor de transcripción SOX10 es un determinante esencial para el desarrollo de las células gliales del sistema nervioso periférico, este es expresado también por todas las células de la cresta neural. Hasta el presente se han descrito una gran diversidad de factores de transcripción, moléculas solubles y receptores celulares todos ellos involucrados en la maduración del cerebro, así como moléculas de superficie señalizadoras, involucradas en interacciones intercelulares, cruciales durante la diferenciación.

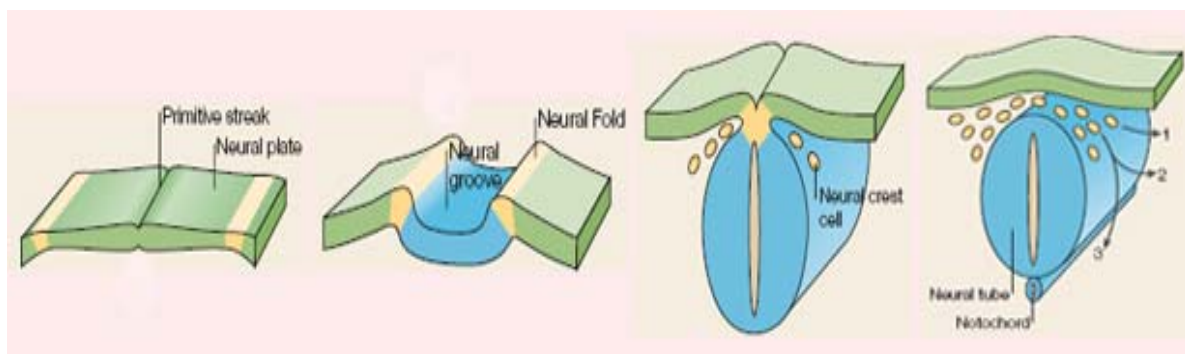


Figura 1. Formación del tubo neural y migración de las células de la cresta neural. En el proceso conocido como neurulación o inducción neural (de izq a der en la figura) la placa neural la cual se encuentra a lo largo de la superficie dorsal del embrión gradualmente se pliega sobre si misma para formar el surco neural. Las crestas neurales se fusionan para formar el tubo neural, las células de los bordes de la cresta neural comienzan a segregarse en varias direcciones. Esquema tomado y modificado de “*The origin and development of glial cells in peripheral nerves*” Kristjan R. Jessen & Rhona Mirsky. *Trends in Neuroscience* Vol.28 N°11 November 2005.

1.2 Funciones básicas de las células gliales.

Dentro de las funciones generales atribuibles a las células gliales, esta el soporte que dan a las neuronas brindando estructura y consistencia al cerebro. Además brindan aislamiento, separación de grupos neuronales y de conexiones sinápticas, cumplen además acción macrófaga por la remoción de desechos celulares, de neuronas muertas y metabolitos propios del entorno celular.

Las células gliales del sistema nervioso central de los vertebrados, pueden dividirse en dos clases denominadas macroglia y microglia. La microglia esta representada por fagocitos, células especializadas que se ponen en marcha luego de la

injurias del tejido nervioso, daños por infección o enfermedades. Algunas células gliales proveen de factores tróficos y nutritivos para las neuronas, otras captan neurotransmisores liberados por neuronas durante la transmisión sináptica del medio extracelular.

La macroglia está representada por tres tipos de células en el sistema nervioso, los astrocitos, los oligodendrocitos, y el epitelio ependimario. Los astrocitos son los más numerosos, de forma estrellada y con terminaciones en forma de pie establecen contactos con los cuerpos neuronales proveyendo nutrientes a células nerviosas del cerebro y la medula espinal. Otros astrocitos establecen contacto con vasos sanguíneos en la barrera hemato encefálica y con los nodos de Ranvier en el SNC. Los oligodendrocitos recubren los axones de las neuronas aumentando la velocidad de conducción del impulso eléctrico nervioso. Se encuentran en el SNC y rodean, formando mielina, en promedio, entre 15-30 segmentos internodales axonales, frecuentemente de diferentes axones.

En el SNP, en contraste, las células gliales están representadas por las células de Schwann, que envainan un solo segmento internodal de un único axón, encontrándose en íntima asociación con este (de hasta 2000µm de longitud).

1.3 De células madre a neuronas y glías:

Rol de las proteínas SOXs durante el desarrollo del Sistema Nervioso.

El sistema nervioso de los vertebrados contiene muchos tipos de neuronas las cuales se encuentran en asociación con células gliales. Según algunos autores (Kandel, *Principles of Neural Science*), existen tres tipos de células pertenecientes a la macroglía dentro del sistema nervioso de los vertebrados (oligodendrocitos, astrocitos y células de Schwann), otros en cambio (Larry, R. Squire; Berg, D; Bloom, E; du Lac, S; Ghosh, A; *Fundamental Neuroscience*) ubican a las células de Schwann fuera de esta categoría. La macroglía en sí, constituye una población heterogénea de células. Los oligodendrocitos y las células de Schwann forman vaina de mielina alrededor de los axones mientras que los astrocitos tienen como papel principal el proporcionar soporte trófico y nutricional a las neuronas manteniendo la homeostasis extracelular en las regiones sinápticas. La glia constituye además un reservorio de células madre en el sistema nervioso adulto.

Una gran cantidad de proteínas con motivos hélice-bucle-hélice y homeodominios han sido identificadas como factores de transcripción neurogénicos. Los mismos se encuentran involucrados en dar cierta especificidad a las células del sistema nervioso desde estadios muy tempranos de desarrollo. Dentro de estos factores de transcripción, se encuentran las proteínas de la familia Sox, las mismas establecen interacciones con el surco menor del ADN y se caracterizan por pertenecer al grupo de moléculas de alta movilidad. Existen al menos 20 proteínas Sox distintas descritas en mamíferos, y 8 para *Drosophila melanogaster*.

Dentro de la familia Sox, se encuentran las proteínas Sox1, Sox2 y Sox3, las cuales conforman el grupo SoxB1. En los estadios más tempranos del desarrollo, precisamente en las células del neuroectodermo, este grupo de proteínas se expresa fuertemente. Las proteínas del grupo SoxB1 presentan una gran similitud bioquímica y funcional, por lo que como característica principal se destaca su redundancia y compensación frente a la eventual pérdida funcional de alguna de estas.

De esta manera la formación y el desarrollo del neuroectodermo es normal en ratones deficientes para Sox1 y Sox3, así como también para Sox2. La co-expresión y el alto grado de similitud entre las proteínas SoxB1 es tema recurrente a la hora de estudiar el sistema nervioso ya que las células del neuroectodermo, ciertas veces enmascaran la función de una de las proteínas Sox en particular cuando se realizan experimentos de pérdida de función.

Todas las proteínas SoxB1 continúan siendo expresadas en las células neuroepiteliales a lo largo del desarrollo del SNC. Ciertos experimentos en los cuales se induce la sobreexpresión de Sox1, Sox2 o Sox3, las células son capaces de mantener el estadio tipo célula madre (Stem cell) y permanece inhibida la diferenciación hacia un fenotipo neuronal. Por otro lado, cuando se realiza la inhibición de la actividad de estas proteínas ocurre una prematura salida del ciclo celular iniciándose así la diferenciación hacia un fenotipo neuronal.

Más allá del efecto negativo en la diferenciación neuronal, las proteínas SoxB1 interaccionan de manera conjunta co-expresándose con proteínas pro-neurales. Se especula que las proteínas Sox son capaces de secuestrar a los factores pro-neurales en complejos macromoleculares donde estos ya no son capaces de unirse al ADN y/o actuar como transactivadores.

Las proteínas o factores pro-neurales suprimen de manera recíproca la expresión y la actividad de las proteínas SoxB1 involucradas en la regulación positiva de otra proteína denominada Sox21.

Las proteínas Sox21 y Sox14 forman parte del grupo de factores de transcripción SoxB2, las cuales se encuentran en relación cercana al grupo de proteínas SoxB1 y probablemente se unen a las mismas secuencias blanco, pero se diferencian de estas últimas en que poseen dominios de represión.

Las proteínas del grupo SoxB2 interfieren con la activación dependiente de SoxB1 y como consecuencia promueven el desarrollo de neuronas en el SNC en desarrollo. Es de esta manera que se genera un balance entre las proteínas SoxB1 y SoxB2, crucial en la decisión hacia la diferenciación celular de las neuronas en desarrollo.

2. Células gliales del sistema nervioso periférico: origen y desarrollo.

Las células de la cresta neural conducen a la formación de células gliales tempranas que se encuentran entre los axones de los nervios nacientes dentro del sistema nervioso periférico, estos nervios atraviesan los tejidos corporales hasta llegar a su blanco. El punto final del desarrollo de las células de Schwann es la formación de células mielinizantes y no mielinizantes que envainan axones de pequeño y gran diámetro en el SNP. La formación de las células de Schwann es precedida por la generación de dos tipos celulares: células precursoras de Schwann (Schwann cells

precursors, PsSC) por sus siglas en inglés, las cuales conforman la glia embrionaria de los días (E) 14-15 en nervios de rata (ratón E12-13), y las células de Schwann inmaduras las cuales se desarrollan a partir de PsSC E15-17 en ratas (ratón E13-15). La característica postnatal de las células de Schwann inmaduras es determinada al azar por los axones que establecen contacto íntimo con estas células, así de esta manera, la mielinización es selectivamente activada en aquellas células que envuelven axones de gran diámetro. Por razones que todavía se desconocen únicamente los axones de gran calibre ($> 1\mu\text{m}$) son mielinados, mientras que axones de menor diámetro son envainados por SC no mielinizantes. La razón fisiológica de este aparente umbral es que el modo saltatorio de conducción podría no conferir tasas de activación significativas en la transmisión del impulso nervioso en fibras de pequeño calibre.

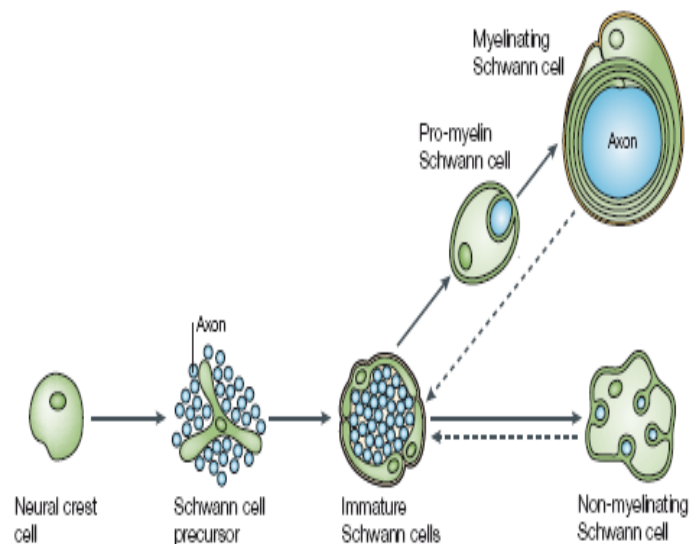
La sucesión de eventos puede ser interpretada en tres etapas de transición representadas en la (Figura 4).

- 1- Transición de las células madre migratorias de la cresta neural a las PsSC.
- 2- Transición desde las PsSC hacia la formación de las células de Schwann inmaduras.
- 3- Transición desde células inmaduras a células de Schwann maduras, divergencia de esta última población celular para formar células de Schwann mielinizantes y no mielinizantes.

Todos estos eventos de transición son estrictamente dependientes de factores tróficos y de supervivencia, mitógenos y señales de diferenciación de los axones con los cuales estos tipos celulares (PsSC y células de Schwann) se encuentran en continua asociación.

Figura 4. Linaje de las Células de Schwann.

Ilustración esquemática representando la transición y tipos celulares involucrados en la formación y desarrollo de las células de Schwann. Las líneas punteadas representan fases en las cuales puede revertirse el fenotipo. La fase embrionaria del desarrollo involucra tres tipos de poblaciones celulares. Primero, células migratorias de la cresta neural. Segundo, células precursoras de Schwann (PsSC) las cuales expresan marcadores únicos de este estadio (BFABP, P0 y Dhh). Tercero, células de Schwann inmaduras, las cuales poseen el mismo potencial de desarrollo, quedando determinado por el tipo de asociación con los axones los cuales establecen contacto. Estas últimas se desarrollan formando células de Schwann mielinizantes (formadoras de mielina) y no-mielinizantes. (Ilustración tomada de Jessen & Myrsky 2005).



Las células de Schwann maduras mielinizantes y no mielinizantes son capaces de revertir su fenotipo en respuesta a la injuria hacia células de Schwann inmaduras. Esta notable propiedad confiere una plasticidad celular importante a las células de Schwann, pudiendo demielinizar y remielinizar axones afectados, mecanismo observado frecuentemente asociado a patologías neurodegenerativas periféricas. Únicamente el periodo de transición desde PsSC hacia células de Schwann inmaduras es irreversible. Las células de la cresta neural, PsSC y las células de Schwann inmaduras proliferan muy rápidamente *in vivo*, únicamente la llegada al estadio de mielinización es el único paso en la diferenciación de todo el linaje, que se encuentra claramente ligado a una salida del ciclo celular.

Existen una serie de marcadores moleculares asociados a los distintos estadios de diferenciación, los cuales son usados para determinar y caracterizar cada uno de los estadios del linaje de las células de Schwann (Figura 5).

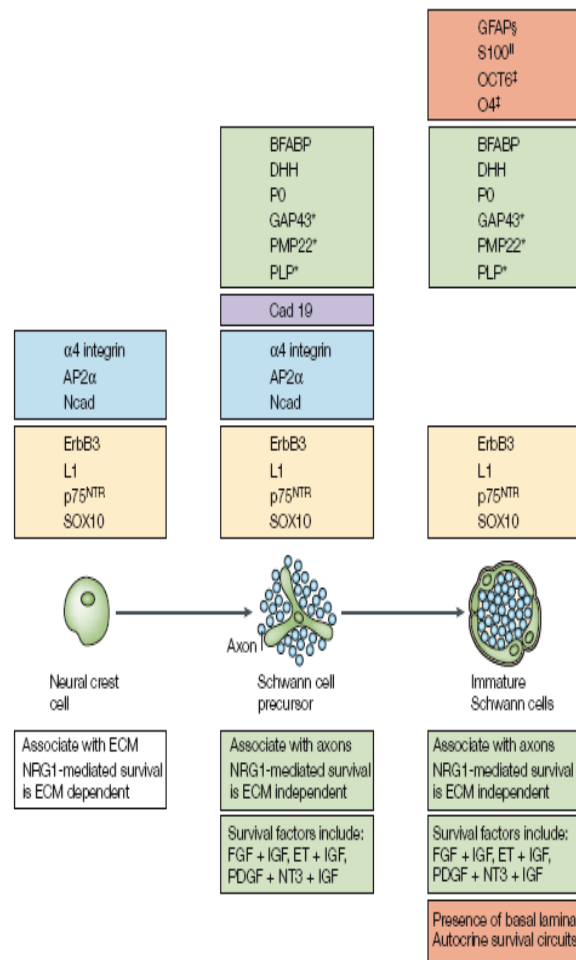
Este tipo de marcadores pueden clasificarse en 5 grupos:

- 1- Los que se encuentran presentes en todas las etapas del desarrollo (Ejemplo: SOX10).
- 2- Los que se expresan en las células de la cresta neural y PsSC, pero no en las células de Schwann inmaduras (Ejemplo: Activator protein 2 α , AP2 α)
- 3- Los expresados únicamente por PsSC (Ejemplo: Cadherin 19), único marcador en esta categoría hasta ahora.
- 4- Los expresados únicamente en las PsSC y las células de Schwann inmaduras, pero no en las células migratorias de la cresta neural (Ejemplo: BFABP, Brain fibrillary acidic protein por sus siglas en inglés).
- 5- Los presentes en las células de Schwann inmaduras pero ausentes, o en bajos niveles en PsSC (Ejemplo: GFAP o S100).

Figura 5. Cambios en el perfil molecular y fenotípico a lo largo del linaje durante el desarrollo embrionario de las células de Schwann.

Los recuadros a color indican cambios en los perfiles de expresión génica que transcurren a lo largo del desarrollo.

La molécula Cadherin19 (Cad19) es expresada únicamente por PsSC. Cada estadio en el desarrollo además involucra relaciones características con los tejidos que los rodean así como también distintas propiedades en cuanto a las señales celulares (recuadros de abajo). En principio, las células de la cresta neural migran a través de la matriz extracelular. En contraste, PsSC y las células de Schwann se encuentran embebidas entre las neuronas (axones) con mínimos espacios extracelulares. La lámina basal se encuentra ausente en las células migratorias de la cresta neural y en PsSC, pero aparece en las células de Schwann. Las células de Schwann poseen circuitos autocrinos de supervivencia los cuales se encuentran ausentes desde las PsSC. La proteína (GFAP, glial fibrillary acidic protein) representa un marcador tardío en la generación de las células de Schwann. (Imagen tomada de *Jessen and Mirsky 2005*).



Existen otro tipo de diferencias entre las células que forman este linaje. Solamente las PsSC y las células inmaduras de Schwann se encuentran en asociación con neuronas (axones), en contraste a lo que ocurre con las células migratorias de la cresta neural. Las PsSC y las células migratorias de la cresta neural muestran numerosas diferencias en respuesta a factores de supervivencia. Diferencias adicionales existen entre las PsSC y las células Schwann inmaduras tales como la presencia de lámina basal, la cual comienza a sintetizarse pronto, luego de que las células de Schwann inmaduras se formaron. Dentro de las más sorprendentes diferencias de estas células, es la habilidad de las células de Schwann para asegurar y reforzar su propia supervivencia a través de la ayuda de circuitos y mecanismos de regulación autocrinos. Estos mecanismos autocrinos de regulación se encuentran ausentes en PsSC, lo cual requiere de parte de estas una completa dependencia de señales de supervivencia provenientes desde los axones. Este tipo de señales probablemente se encuentran mediadas en su mayoría por NRGβ.

Una sorprendente característica de las células de Schwann es su labilidad y plasticidad presente todo a lo largo de su vida. A modo de ejemplo, si un nervio maduro es seccionado, las células mielinizantes y no mielinizantes en la región distal del cabo cortado atraviesan por numerosas y radicales alteraciones en cuanto a su morfología y expresión génica.

Mientras que algunas de estas respuestas son transitorias y complejas, la característica más resaltante es la formación de una sola población de células que poseen un estado de diferenciación comparable a las células de Schwann inmaduras antes de desencadenar el fenotipo mielinizante y no mielinizante (Mirsky R, Jessen KR, 1996). Experimentos *in vitro* e *in vivo*, han demostrado que este proceso involucra la dediferenciación o regresión en el desarrollo de las células de Schwann individuales acompañado de un colapso en la mielina y la invasión de macrófagos en el cabo distal, un estadio de proliferación de las células de Schwann conocido comúnmente como degeneración Walleriana.

Una característica importante de las células de Schwann en respuesta a la injuria del nervio, es la generación de un ambiente propenso que permita la regeneración axonal. Por otro lado, las células de Schwann que se encuentran en el cabo distal de un nervio seccionado expresan moléculas de adhesión y receptores importantes para la elongación axonal (ej: L1, N-CAM, N-caderina, y el receptor p75NGF) los cuales en los nervios maduros se encuentran restringidos a las células de Schwann no mielinizantes (Jessen KR, Mirsky R, 1992), (Shibuya Y, *et al.*, 1995).

Los mecanismos autocrinos que conducen a las células de Schwann a sobrevivir incluso en ausencia de contacto axonal junto con la dramática respuesta de estas a la injuria del nervio, establecen la base de la regeneración y reparación de nervios en el SNP.

2.1 Regulación y supervivencia de las células de Schwann.

El desarrollo de las células de Schwann involucra cambios en la regulación de los mecanismos de supervivencia. La supervivencia de las células precursoras es estrictamente dependiente de señales axonales, mientras que la supervivencia de las células de Schwann inmaduras es independiente de señales provenientes del axón (Figura 6). Este cambio en los mecanismos de supervivencia posee sentido biológico. La dependencia de asociación de los precursores con los axones, establece cierta ayuda en cuanto al número de precursores en relación al número de axones, y podría evitar la supervivencia de aquellos precursores estacionarios o rezagados que quedaron restringidos a axones en una ubicación inapropiada. Por otro lado, la supervivencia de las células de Schwann luego del nacimiento en ausencia de axones, asegura a largo plazo, que la muerte de las células de Schwann no ocurra en respuesta al daño o pérdida axonal, la cual en si, podría comprometer de manera severa la posibilidad de regeneración luego de la injuria axonal.

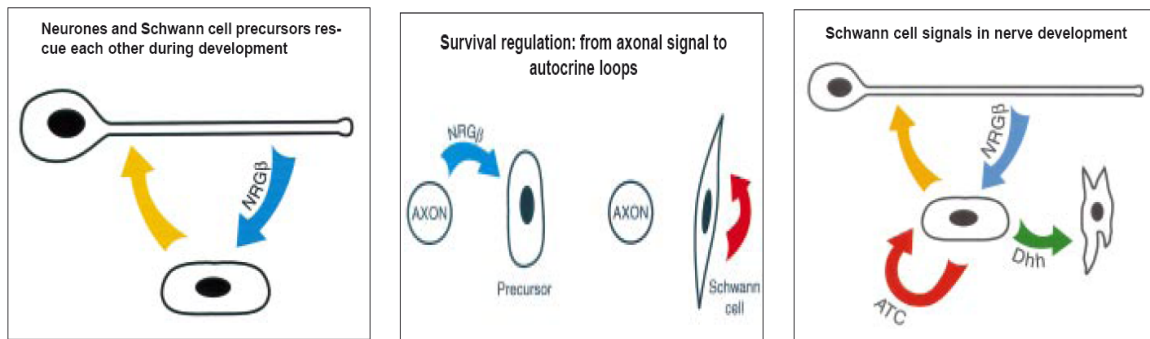


Figura 6. Señales de supervivencia entre axones y células gliales durante el desarrollo del SNP. Izquierda- Esquema hipotético mostrando como el número de neuronas en desarrollo y células gliales podrían estar reguladas por señales reciprocas de supervivencia. Esta aun no establecida la identidad molecular (flecha amarilla) de la señal derivada de las células gliales de supervivencia neuronal probablemente GDNF, neurturin o persephin, (Milbrandt et al, 1996 y 1998). Las células precursoras de Schwann mantienen su supervivencia por la señal neuronal NRGβ (flecha azul). Centro- A medida que avanza el desarrollo, ocurre un cambio en la procedencia de las señales de supervivencia. En principio provenientes del axón exclusivamente (NRGβ flecha azul), para luego establecerse circuitos “loops” autocrinos de señalización desde las células precursoras hacia la generación de las células de Schwann. Derecha- Señales autocrinas (ATC) secretadas por las células de Schwann: mantienen su propia supervivencia (flecha roja), señales de supervivencia hacia las neuronas (flecha amarilla) y señales de supervivencia (Dhh Desert hedgehog flecha verde) que ayudan a la organización del perineuro que rodea los fascículos nerviosos. (Imágenes tomadas de R. Myrsky & K.R. Jessen: *The neurobiology of Schwann cells* 1999).

2.2 Relación entre axones y glia.

2.2.1 Citoesqueleto de las células de Schwann e interacciones con la lámina basal

En el SNP, las fibras mielinadas están constituidas por un axón acompañado de células de Schwann a lo largo de su recorrido, desde el cono de arranque hasta las proximidades de las terminales nerviosas. El conjunto axón/célula de Schwann se encuentra completamente rodeado de una lámina o membrana basal continua. Esta lámina se encuentra compuesta por colágeno tipo IV, proteoglicanos (heparan sulfato), glicoproteínas, lamininas y contactina (Thomas & Olsson, 1963).

Las lamininas son trímeros compuestos por subunidades α , β y γ , y cada una pertenece a una familia génica; la composición de la laminina-2 es $\alpha2\beta1\gamma1$. Esta isoforma se encuentra en la lámina basal del músculo esquelético y en la lámina basal que rodea a la célula de Schwann. Es requerida para el desarrollo normal ya que ratones carentes de la cadena $\alpha2$ de la laminina son mutantes homocigotas para el gen *lama2* presentando fenotipos asociados a neuropatías desmielinizantes y miopatías, las cuales se relacionan ambas con defectos en la lamina basal. Por otro lado en humanos, mutaciones en el gen *LamA2* son la causa mas común de miopatías congénitas, algunos de estos pacientes experimentan velocidades de conducción nerviosa reducidas (Shorer et al, 1995), y podría estar asociada la laminina-2 jugando un rol esencial en el proceso de mielinización normal.

Las células de Schwann poseen dos receptores para laminina-2, uno denominado integrina $\alpha6\beta4$ (Einheber et al, 1993; Feltri et al, 1994) y otro llamado dystroglican (Matsumura et al, 1997; Yamada et al, 1996). El receptor $\alpha6\beta4$ se expresa todo a lo largo

y en forma circunferencial en la membrana abaxonal (membrana externa) de la célula de Schwann mielinizante. En epitelios como los de la piel, los heterodímeros $\alpha 6\beta 4$ están asociados a hemi-desmosomas los cuales adhieren las células epiteliales a la membrana basal por medio de filamentos intermedios. En contraste, las células de Schwann no contienen hemi-desmosomas y por tanto la integrina $\alpha 6\beta 4$ podría estar asociada al citoesqueleto de actina y no a los filamentos intermedios (Scherer & Arroyo, 2002). Los receptores dystroglican están conformados por subunidades α y β las cuales son productos del mismo gen.

En las células de Schwann mielinizantes ciertos hallazgos (Sherman et al, 2001) demostraron que la proteína asociada a dystroglicano 2 (DRP2) y la molécula de periaxina forman un complejo con el receptor dystroglican. Las moléculas de DPR2 se encuentran en el citoplasma de las células de Schwann yuxtapuestas a la vaina de mielina. Cabe destacar que además de los complejos ya mencionados, existen otros complejos moleculares estableciendo contactos con receptores dystroglican, Dp116, L-periaxina y utrophina. De todos estos únicamente los complejos asociados a utrophina son capaces de establecer contactos con el citoesqueleto de actina dado que esta molécula posee sitios específicos de reconocimiento (Figura 7). La importancia de estos receptores en las células de Schwann requiere aun ser dilucidada tanto en condiciones normales como patológicas. Estos componentes moleculares estarían involucrados en los procesos de mielinización ya que mutaciones que afectan sus genes son causa de manifestaciones fenotípicas tales como las neuropatías periféricas desmielinizantes (Comi et al, 1995; Guillespie et al, 2000; Boerkoel et al, 2000; Guilbot et al, 2001; Yamada et al, 1996; Rambukkana, 2001).

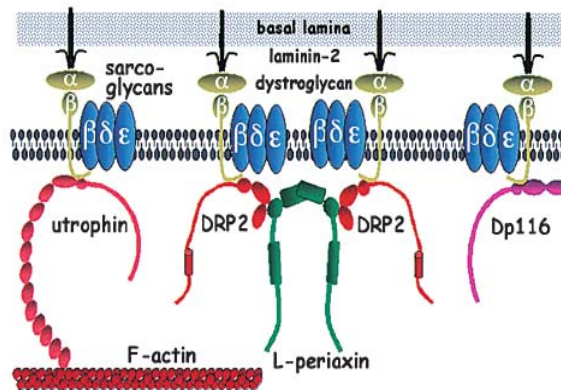


Figura 7. Complejo receptor de dystroglicanos en las células de Schwann formadoras de mielina. El receptor de dystroglican se encuentra ligado a tres miembros de la familia de las distrofinas en las células de Schwann mielinizantes, utrophin, DRP2 y Dp116. De todos ellos, únicamente utrophin posee un dominio de unión a los filamentos de F-actina, mientras que DRP2 se encuentra unido a periaxina. Tres tipos de sarcoglicanos (β , δ y ϵ) se encuentran en asociación con los dystroglicanos.

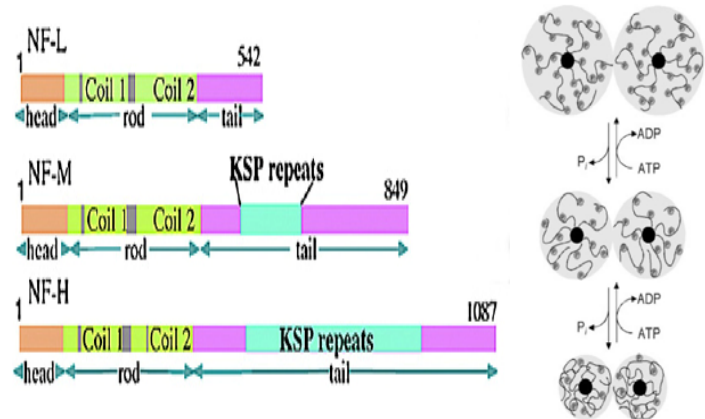
2.2.2 Control radial del citoesqueleto axonal a partir de señales que involucran células de Schwann y axones.

El perfil de moléculas expresadas por las células de Schwann y los axones durante el contacto celular permite un correcto ensamblaje de los componentes del

citoesqueleto submembranoso de ambos tipos celulares, así como también a contribuir en mecanismos de mantenimiento de diferentes estructuras celulares.

Los tres principales parámetros que gobiernan la conducción del impulso nervioso en una fibra miélica son el diámetro axonal, el grosor de la mielina y la longitud internodal. El grosor de la mielina es proporcional al diámetro del axón, fibras de mayor diámetro presentan además mayores longitudes internodales y por tanto mayor velocidad de conducción. La regulación del diámetro axonal se encuentra controlada en parte por la fosforilación de los brazos del citoesqueleto de neurofilamentos. Los neurofilamentos son heteropolímeros de tres tipos de filamentos intermedios de 8-10nm: cadena liviana (NF-L 68 kD), Mediana (NF-M 90 kD) y pesada (NF-H 110 kD) (Hoffman & Lasek, 1975; Liem et al, 1978). Una característica remarcable de las proteínas NF-H y NF-M consiste en su largo dominio terminal-COOH que constituye una proyección en forma de brazo a la periferia del filamento. Este dominio se encuentra enriquecido en aminoácidos cargados de múltiples repetidos de tripeptidos Lys-Ser-Pro (KSP) que posibilitan su fosforilación (Julián & Mushynsky, 1982; Carden et al, 1985, Julien et al 1988; Lees et al, 1988, S. Hisanaga & N. Hirokawa, 1988). La presencia de aminoácidos cargados negativamente producto de la fosforilación de los brazos NF-M y NF-H sugiere que estas fuerzas repulsivas afectan la densidad y el estado de empaquetamiento proteicos promoviendo modificaciones del calibre axonal (Figura 8). El incremento en la repulsión podría tender a un aumento en el espacio entre los neurofilamentos así como también un mayor reclutamiento de los mismos en dicho sitio.

Figura 8. Representación esquemática de las cadenas polipeptídicas de NFs y del mecanismo de modulación de las interacciones entre filamentos intermedios provocado por la fosforilación de los residuos repetidos (KSP). Izquierda- Cadenas polipeptídicas de NFs. Derecha- Axones vistos en sección transversal, interacciones electroestáticas entre diferentes segmentos del polímero, incrementan en la cantidad de cargas fosfato aumentando la repulsión entre los filamentos intermedios provocando incremento en el calibre axonal. Imagen tomada de (Mukhopadhyay R, Kumar S, Hoh JH, 2004).



Evidencias de estos acontecimientos provienen de estudios en ratones de fenotipo *Trembler* (deWaegh et al, 1992). Los mismos poseen una mutación puntual en el gen que codifica la proteína miélica PMP-22 provocando una neuropatía desmielinizante periférica (Suter et al, 1992). Estos ratones con fenotipos hipomielinizantes presentan niveles de fosforilación reducidos en los brazos NF-H, mostrando una disminución del calibre axonal (Cole et al, 1994). El mecanismo por el cual ratones con la mutación puntual en el gen PMP-22 regula el calibre axonal no es del todo comprendida, la

demielinización y remielinización crónica de axones *Trembler* complica aun mas las interpretaciones de los mecanismos subyacentes.

La glicoproteína glial asociada a la mielina (MAG) es un determinante clave en la regulación del calibre axonal dado que regula mediante una cascada intracelular de interacciones moleculares la fosforilación de los neurofilamentos y el espacio entre estos (Figura 9).

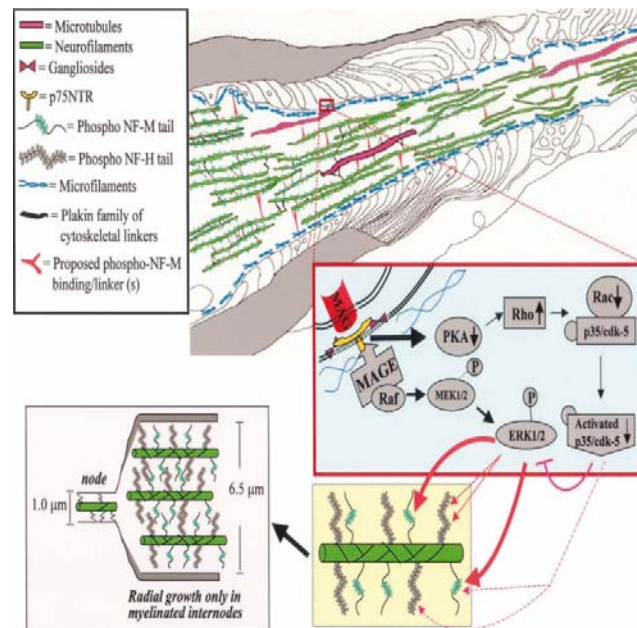


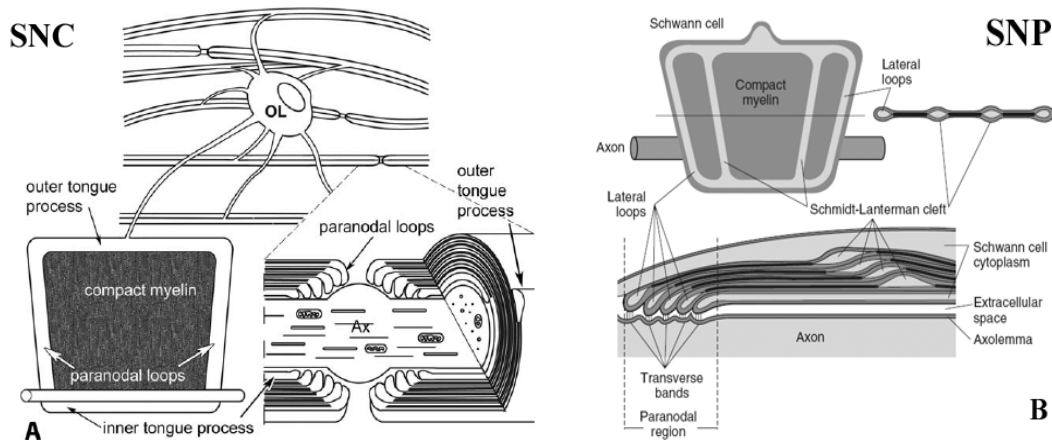
Figura 9. Modelo en cascada de señalización dependiente de MAG que controla el calibre axonal. En axones normales la organización axonal es dependiente de las células mielinizantes. Cascadas de señales (recuadro azul) se originan desde MAG en la membrana de la célula de Schwann utilizando el receptor del factor de crecimiento p75^{NTR} en combinación con gangliósidos neuronales para transmitir la señal desde la mielina hacia el axoplasma. Sobre la asociación de MAG con p75^{NTR}, miembros de la familia génica de antígeno de melanoma (MAGE) se unen al dominio intracelular de p75^{NTR} proporcionando el andamiaje intracelular para la activación de la cascada ERK1/2, resultando en la fosforilación de las colas NF-M (flechas naranjas) y NF-H (flechas violetas). La inactivación MAG-dependiente de p35/cdk-5 podría reducir la fosforilación de cdk-5, de NF-M y NF-H así como también prevenir la inhibición cdk-5-dependiente en ERK1/2. La fosforilación de NF-M es requerida para establecer el arreglo volumétrico tridimensional (recuadro rosa) mediado por una serie de enlaces entre neurofilamentos adyacentes (verde) y entre neurofilamentos y microtúbulos (rosa) o filamentos de actina corticales (azul). Esquema tomado de Garcia *et al.*, 2007.

3. Mielina.

La mielina es una extensión espiralada de membrana plasmática de las células de Schwann en el SNP (Geren, 1954) y de los oligodendrocitos en el SNC (Bunge et al 1962).

La mielina es el esfingofosfolípido más conocido dentro de los seres vivos, se encuentra en el sistema nervioso formando vainas alrededor de los axones de las neuronas de vertebrados. Este desarrollo se cree que evoluciono otorgando una mayor velocidad de conducción a la transmisión de los impulsos nerviosos en organismos cada vez más complejos. En el SNP, en nervios craneales y raquídeos las vainas de mielina que recubren los axones son formados por las células de Schwann, mientras que en el SNC

las células formadoras de mielina son los Oligodendrocitos que enrollan axones de varias neuronas de manera simultánea. Así de esta manera, un solo Oligodendrocito puede mielinizar varios internodos en el SNC, mientras las células de Schwann en el SNP envainan solo un segmento de axón. De esta manera, un solo axón es acompañado por muchas células de Schwann a lo largo de su recorrido.

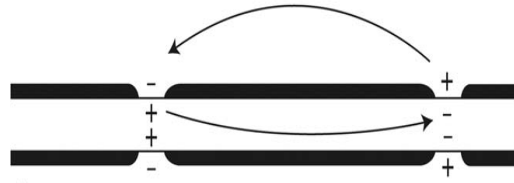


La mielina es una sustancia membranosa multilaminar producida a través de modificaciones estructurales y bioquímicas de la membrana plasmática de estas células. En el SNP la formación de la mielina sobre un axón requiere que este último envíe señales adecuadas hacia las células de Schwann y viceversa modificando estas su perfil génico posibilitando desarrollar el fenotipo mielinico en una serie de eventos de compleja comunicación entre glías y axones. La mielina es un determinante clave para la correcta propagación del impulso nervioso, además esta oficia de aislante eléctrico al axón y brinda una barrera impermeable a ciertas biomoléculas e iones en determinadas regiones celulares, donde esta se encuentra mas compacta. Al igual que las neuronas, células polarizadas por excelencia, las interacciones entre axones y glías presentan polaridad expresada a nivel molecular en el citoplasma y la membrana.

Esta polaridad celular provoca por ejemplo, que únicamente en los nodos de Ranvier se deposite la mayor cantidad de canales de sodio sensibles a voltaje, y así posibiliten la propagación del impulso nervioso de manera saltatoria (Figura 10). Existen diferencias sustanciales en cuanto al incremento en la velocidad de conducción nerviosa para fibras mielinicas respecto de las no mielinicas. Cada internodo dentro de la mielina puede ser dividido en dos dominios o regiones estructural y funcionalmente distintas: mielina compacta y mielina laxa. La región de mielina compacta inhibe el intercambio de iones durante la conducción nerviosa dado que posee una baja capacitancia y una alta resistencia. Para una misma célula de Schwann, a ambos lados del internodo se encuentran los juxtaparanodos, los paranodos y los nodos.

Esta disposición tiene como consecuencia directa la formación de dominios o regiones particulares, molecularmente distintas dentro de la mielina, que agregan un nivel más de complejidad a la estructura celular a lo largo del axón mielinizado.

Figura 10. Representación esquemática de conducción saltatoria del impulso nervioso. La figura representa la conducción del impulso saltatorio a lo largo de un axón mielinizado. Este mecanismo de conducción facilita una mayor velocidad de propagación del impulso el cual se desplaza de nodo en nodo. Los signos positivos (+) representan corrientes iónicas de entrada, los negativos (-) de salida.



Los contactos entre la célula de Schwann y el axón están caracterizados por interacciones moleculares tanto en *cis* como en *trans* (en cada célula y entre ambas) que producen una polaridad “transversal”, de la que hablaremos mas adelante (ver punto 5).

3.1 Composición Lipídica.

No existe un lípido particular que caracterice de forma específica a la mielina, pero el cerebrósido (galactosil-ceramida) es el más típico dentro de esta. La concentración de este lípido en el cerebro es directamente proporcional a la cantidad de mielina presente. Un quinto de la cantidad de galactolípidos de la mielina son sulfatidos, en los cuales el motivo 3-hidroxil en la molécula de galactosa del cerebrósido se encuentra sulfatado. Presumiblemente, los glicolípidos en la mielina, así como en otras membranas, se localizan preferentemente en la cara extracelular de las líneas intraperiodo.

Más allá de los cerebrósidos/sulfatidos, otros lípidos abundantes de la mielina son el colesterol y los fosfolípidos. Además la mielina de los mamíferos contiene entre 0,1-0,3% de gangliósidos (complejos de ácido siálico conteniendo glicosfingolípidos). El mayor gangliósido dentro del SNC es el mono-sialo-gangliósido (GM1) mientras que existen bajas cantidades de poly-sialo-gangliósidos que son característicos de membranas neuronales. Las membranas de algunas especies, incluidos los humanos, contiene además sialo-galactosil-ceramida (GM4).

Por otro lado, ambos tipos de mielina producidos tanto por oligodendrocitos como por las células de Schwann difieren de manera sutil en algunos aspectos bioquímicos de sus constituyentes. La mielina producida por las células de Schwann se compone básicamente de un 45% de agua por peso, la mielina humana deshidratada contiene 71% de lípidos y 29% de proteínas. Dentro de los componentes lipídicos, los mas abundantes son los fosfolípidos (55% del total), glicolípidos (cerebrósidos, sulfatidos y gangliosidos 22% del total) y el colesterol (23% del total).

A continuación se esquematiza la comparación entre la composición de proteína respecto de la cantidad de lípidos, tanto para el cerebro en su totalidad, como para la mielina (Figura 11).

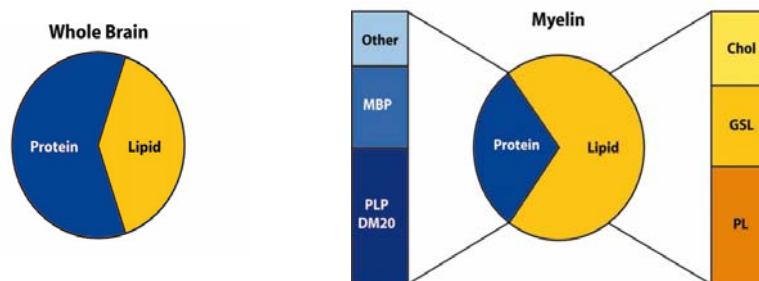


Figura 11. Composición de lípidos y proteínas más abundantes de la mielina. Comparado con otras membranas celulares, la mielina posee una elevada cantidad de lípidos, en particular glicosfingolípidos. Colesterol (Chol), fosfolípidos (PL), glicosfingolípidos (GSL). La proteína más abundante en la mielina, es la proteína proteolipídica (PLP) y su isoforma generada por splicing alternativo DM20, y la proteína básica de la mielina (MBP), que juntas representan aproximadamente el 80% de las proteínas mielínicas.

3.2 Los lípidos de la mielina del SNC y el SNP son similares.

La composición de la mielina se encuentra bien caracterizada debido a que esta puede ser separada y altamente purificada mediante métodos de fraccionamiento subcelular. Tanto a nivel del SNC y el SNP, homogenizados de tejido nervioso pueden ser sometidos a medios de baja fuerza iónica para aislar la mielina, esta se separa de los axones y forma vesículas del tamaño de las mitocondrias o los núcleos (Lazzarini, R. A, 2002). Debido a su alto contenido en lípidos, estas vesículas de mielina poseen la menor densidad intrínseca que cualquier otra fracción membranosa del sistema nervioso. Los procedimientos de aislamiento toman ventaja de estas propiedades, grandes vesículas y baja densidad (Morell, 1984). La mielina *in situ*, posee un contenido en agua de 40% y una alta proporción de lípidos (70-85%), además de una baja cantidad de proteína (15-30%). Las proteínas y los lípidos en esta membrana se distribuyen asimétricamente. Las diferencias en composición lipídica del SNC y el SNP son similares cualitativamente, pero difieren en forma cuantitativa. La mielina del SNP contiene menos cerebrosidos y sulfatidos mientras que posee una mayor cantidad de esfingolípidos que la mielina del SNC. De interés, es la presencia del gangliosido LM1 (sialosil-lactoneotetraosylceramida) como componente característico de la mielina del SNP de algunas especies. Estas diferencias en cuanto a la composición y componentes lipídicos de la mielina en SNC y el SNP no son, sin embargo, tan dramáticas como las diferencias existentes en la composición proteica.

3.3 Mielina compacta.

La mayoría de la mielina del internodo consiste en mielina compacta la cual aparece como una estructura laminar de alternadas líneas claras y oscuras que se disponen de manera espiral alrededor del axón. La mejor visualización de este tipo de estructuras se obtiene mediante la utilización del microscopio electrónico (EM).

La mielina compacta es interpretada mejor si se la considera como un proceso o vaina celular espiralada que contiene dos membranas plasmáticas en ausencia de citoplasma. Las membranas visualizadas por EM muestran una región interna translúcida y dos líneas electrón densas en la superficie extracelular e intracelular (Alberts *et al.*, 1994). La (Figura 12-A) representa una sección transversal de una hipotética vaina de mielina con citoplasma (verde). El proceso de espiralamiento se esquematiza en la (Figura 12-B), y el de espiralamiento y compactación en la (Figura 12-C). En la representación de la compactación las membranas extracelulares (líneas rojas) llamadas líneas intraperiodo (IP) son separadas por 2,0nm en el SNC y por 2,5nm en el SNP (Figura 12-D). Las regiones citoplasmáticas aparecen fusionadas formando las líneas densas mayores (MD).

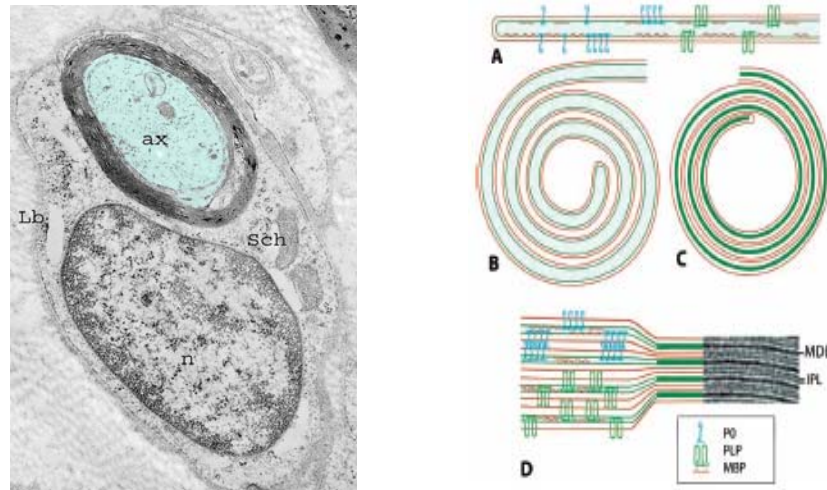


Figura 12. Representación de la composición y formación de la mielina compacta en el SNP. Imagen izquierda. Microscopía electrónica de una fibra mielínica humana del SNP vista transversalmente. Se detalla en verde el axón (ax) rodeado por la vaina de mielina compacta, región electrón-densa, n, núcleo, Lb, lámina basal, Sch, célula de Schwann. Imagen derecha. Representación esquemática de la periodicidad de la mielina compacta. La mielina compacta vista como un proceso celular (A). Este proceso crece de forma espiralada (B) alrededor del axón, y durante la compactación (C) el citoplasma (verde) es excluido. Las membranas citoplasmáticas (verde oscuro) se fusionan para formar las líneas densas mayores (D, MDL), mientras que las extracelulares (rojo) se disponen una cerca de otra para formar las líneas intraperiodo (D, IPL). La orientación de estas tres proteínas juega un rol dominante en la compactación de la mielina y su integridad. (Imagen izq de Dra Alejandra Kun, Imagen derecha tomada de Lazzarini, *Myelin Biology and Disorders*).

Las membranas en espiral de la mielina compacta poseen una periodicidad (distancia desde línea densa a línea densa) de aproximadamente 13 a 14nm cuando son fijadas por aldehídos y embebidas en resinas epoxy (Fernandez-Moran & Finean, 1957; Kirschner & Hollingshead, 1980), siendo algo mayores en el SNP respecto del SNC. *In situ*, estas distancias son un poco mayores (17 a 18nm) cuando son medidas por difracción de rayos X (Kirschner & Sidman, 1976).

La mayor función de la mielina compacta es el aislamiento y la función principal de sus moléculas parece ser la adhesión. Abundantes cantidades de proteína se encuentran dispuestas en la mielina compacta, incluidas la proteína P0, la proteína básica de la mielina (MBP), la proteína P₂ y la proteína PMP-22 en la mielina del SNP (Greenfield *et al.*, 1973), la proteína proteo-lipídica (PLP) y MBP en la mielina del SNC (Less & Brastoff,

1984). Estudios de composición de amino ácidos y propiedades bioquímicas identificaron a P0, PMP-22 y PLP como proteínas integrales de membrana y a MBP y P₂ como proteínas de membrana extrínsecas. P0, PMP-22 y PLP se encuentran posicionadas para mantener la periodicidad del espacio extracelular y citoplasmático de las membranas mielinicas, mientras que MBP y P₂ podrían mantener la fusión de las regiones citoplasmáticas (Figura 13).

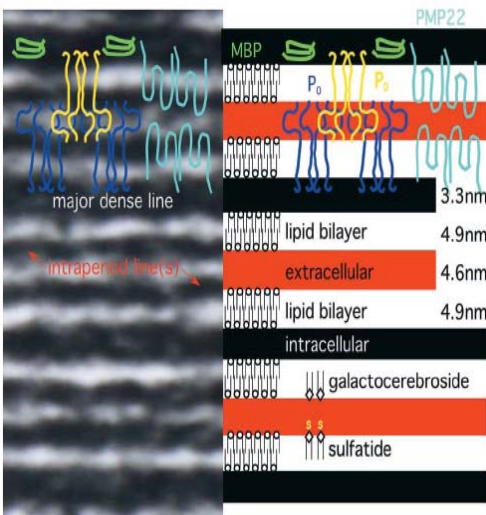


Figura 13. Localización de las proteínas de la mielina compacta en el SNP. El panel de la izquierda muestra una micrografía electrónica de la mielina compacta, esta consiste en capas alternantes conocidas como líneas intraperiodo (IPL) y las (líneas densas mayores MDL) descritas anteriormente. El panel derecho muestra una descripción esquemática de cómo es la disposición de las membranas celulares para generar este tipo de líneas. La proteína P0 se dispone en forma de tetrámero, PMP-22 como dímero y MBP como monómero. Se representan además los galactocerebrosidos y sulfatidos. Se indican también los grosores aproximados de las capas lipídicas y de los espacios tanto extracelulares como intracelulares (Vonasek *et al.*, 2001). *Imagen tomada de Steven S, Sherer & Edgardo J, Arroyo. Recent progress on the molecular organization of myelinated axons, 2002).*

Estudios en ratones mutantes demostraron la importancia de la proteína P0 en el SNP siendo la encargada de mantener la periodicidad y el espaciamiento de la mielina compacta (Giese *et al.*, 1992). Cuando PLP y P0 se encuentran ausentes, el espacio de la mielina compacta es variable.

3.4 Mielina no compacta

La periodicidad de la mielina compacta en el SNC y el SNP difiere y es difícil de distinguir sin comparaciones morfométricas. Las fibras mielinicas del SNP y del SNC pueden ser distinguidas una de otra por la presencia de lámina basal alrededor de la célula de Schwann en el SNP, no en el SNC. Estas además difieren en su ultraestructura y distribución de los canales citoplasmáticos en el margen externo del internodo. La lámina basal y el colágeno son criterios validos para distinguir las fibras mielinicas del SNP de las del SNC.

La lámina basal de las células de Schwann contiene laminina-2 y colágeno tipo II y IV (Carey *et al.*, 1983; Cornbrooks *et al.*, 1983). La región externa o membrana abaxonal del internodo en el SNP contiene múltiples canales citoplasmáticos. La superficie citoplasmática en la membrana de la célula de Schwann que forma los canales contiene CNP (Trapp *et al.*, 1988) y componentes de microfilamentos, filamentos de actina (F-actina), spectrina y ankyrina (Trapp *et al.*, 1989b). Los canales de membrana de las células de Schwann están enriquecidos además en caveolas, las cuales contienen la molécula caveolin (Mikol *et al.*, 1999). Respecto a la superficie interna tanto en el SNP como en el SNC en los internodos mielinicos, estos se encuentran separados del axón

por un espacio periaxonal de aproximadamente 12 a 14nm. Las membranas periaxiales contienen moléculas como MAG, CNP y microfilamentos (Trapp *et al.*, 1988 1989b). MAG se encuentra presente en: a) en el mesaxón interno, el cual conecta la mielina compacta y la membrana periaxonal; b) en el mesaxón externo; c) en los loops paranodales y d) en las incisuras de Schmidt-Lanterman, las cuales representan regiones de mielina no compacta dentro del internodo.

3.5 Composición proteica de la mielina

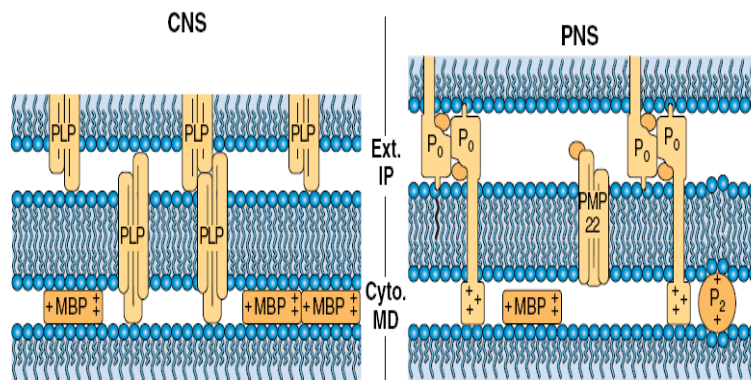


Figura 14. Representación diagramática en la organización molecular de mielina compacta del SNC y SNP. La oposición de las superficies extracelulares (Ext), tanto de oligodendrocitos como células de Schwann para formar las líneas intraperiodo (IP) se esquematiza arriba. La oposición de las superficies citoplasmáticas (Cyto) que forman las líneas densas mayores (MD) se esquematizan abajo en la figura. Los círculos naranja intenso en P0 y PMP-22 representan oligosacáridos. La punta que sobresale del ápice en P0 representa un residuo triptófano el cual interacciona con la bicapa lipídica opuesta. La representación no incluye a CNP, MAG y otras proteínas mielínicas. Tomado de Quarles *et al.*, 2006.

3.6 Proteínas mielínicas del SNC

La composición proteica de la mielina dentro del SNC contiene algunas proteínas únicas no presentes en el SNP y viceversa. Las proteínas mas abundantes dentro del SNC son la proteína básica de mielina (MBP) y la PLP (proteolípido protein, por sus siglas en inglés), representando entre el 60-80% del total. Estas dos proteínas conforman el mayor componente proteico de las membranas mielínicas del SNC dentro de los mamíferos, existiendo proteínas de similares características en otras especies.

Proteolípido protein. La proteína proteolípida PLP, también conocida como la proteína Folch-Less, posee una propiedad física inusual de solubilidad en solventes orgánicos. La masa molecular de PLP es de 30.000, migra de manera anómala en geles de SDS indicando una menor masa molecular aparente. La secuencia aminoacídica se encuentra altamente conservada a lo largo de la evolución y posee cuatro dominios de membrana. Tanto la cola N- como C-terminal, se encuentran del lado citoplasmático (ver Figura 14). El rol más importante de PLP es estabilizar las líneas intraperiodo de la mielina del SNC, además mantiene y determina el espacio entre estas. PLP posee una isoforma generada

por splicing alternativo, DM20 (M_r 20.000), la cual esta presente en la mielina del SNC a concentraciones menores que PLP. El gen de PLP es expresado tempranamente durante el desarrollo, al igual que el mRNA de DM20 el cual se sintetiza mas temprano que el de PLP, incluso luego de la formación de la mielina en embriones y oligodendrocitos pre-mielinizantes (Hudson, 2004). El gen PLP/DM20 al parecer podría haber evolucionado de un gen ancestral el cual codificaba una proteína formadora de poro, apoyando la hipótesis de que la mielina esta involucrada en el movimiento iónico. Sin embargo, PLP y DM20 cumplen importantes funciones a pesar de no ser esenciales. Ratones knockout para PLP son relativamente normales con respecto a la formación de la mielina (excepto por las diferencias en las líneas intraperiodo, Hudson, 2004). Esto sugiere que otras proteínas o lípidos de la mielina contribuyen a la adherencia de las caras extracelulares de la bicapa a nivel de las líneas intraperiodo. Por otro lado, ratones knockout para PLP/DM20 presentan una significativa degeneración axonal sugiriendo que la mielina no puede sostener un normal funcionamiento de la célula adyacente. Cabe mencionar además, que la expresión de PLP/DM20 no es única de los oligodendrocitos, sino que también lo expresan las células de Schwann mielinizantes y amielínicas del SNP, sintetizándose en menores cantidades y siendo poco incorporada a la mielina. Por ultimo, más allá de la expresión de DM20 en el SNC y el SNP, se la detecto en el timo y el corazón. Esto sugiere otros posibles roles de esta proteína distintos de la formación y el mantenimiento de la mielina.

Proteína básica de mielina (MBP). La proteína MBP puede ser extraída de la mielina así como de la sustancia blanca tanto con soluciones ácidas como salinas, una vez extraída esta es muy soluble en agua. Los genes codificantes de MBP se encuentran sumamente conservados en un gran número de especies, y al igual que el gen PLP, MBP posee una variante por corte y empalme (Campagnoni *et al.*, 2001; Aruga *et al.*, 1991). El gen mas común de MBP posee siete exones, los exones 2, 5B y 6 están presentes o ausentes en otras cuatro proteínas MBP halladas en la mielina. En humanos la mas abundante contiene a los exones 1B, 3, 4, 6 y 7 (18.5kDa MBP), mientras que en roedores se encuentran presentes en forma abundante la MBP de 18.5kDa y MBP de 14kDa la cual contiene los exones 1B, 3, 4, 5 y 7. Existen dos MBPs menores diferentes de aproximadamente 17kDa, las cuales son codificadas por los exones 1B, 2, 3, 4, 5B y 7 o 1B, 3, 4, 6 y 7 respectivamente. Una representación diagramática del splicing alternativo se esquematiza en la (Figura 15). La proporción de las MBPs cambia a lo largo del desarrollo ya que en oligodendrocitos inmaduros, el mRNA de MBP se localiza en el cuerpo celular. Sin embargo en las células maduras, el mRNA de MBP se localiza dentro de los procesos mielínicos, lejos del cuerpo celular, presumiblemente porque la nueva traducción de MBP es asociada rápidamente con la membrana en estos sitios de síntesis (Trapp *et al.*, 2004).

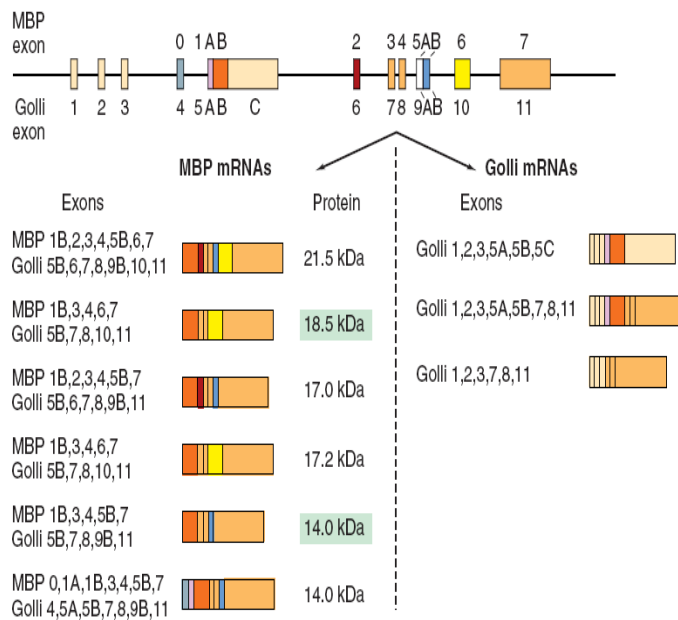


Figura 15. Secuencias aminoacídicas correspondientes a varias MBPs de ratón codificadas por un gen de 11 exones. Los exones de MBP se representan por medio de rectángulos con el número original encima y el número de exón *golli*/MBP debajo. El gen MBP puede ser procesado por splicing dando como producto dos tipos de ARNm: el ARNm de MBP y el de *golli*. Se indican los exones capaces de formar varios ARNm, así como también el peso en kDa de cada producto proteico. Adaptado de Campagnoni & Campagnoni, *Myelin Biology and Disorders* 2004.

Las MBPs, son proteínas extrínsecas localizadas exclusivamente en las superficies citoplasmáticas en las líneas mayores densas, esta es una conclusión basada en su secuencia aminoacídica. Se sugiere además que MBP podría formar dímeros, y se cree que es la principal proteína de estabilización de las MDL de la mielina en el SNC. Esta hipótesis se basa en observaciones de hipomielinización severa y fallas en la compactación de la mielina en las MDL de ratones mutantes *shiverer* deficientes en MBP.

Es interesante el hecho de que el clásico gen de MBP forma parte de un largo gen denominado *golli* (gene of the oligodendrocyte lineage, por su significado en inglés), el cual posee mas de 100kb de longitud (Campagnoni *et al.*, 2004). Este gen contiene tres sitios de inicio de la transcripción, dos de los cuales son usados para transcribir los mRNAs de MBP, mientras que el sitio de inicio más hacia 5' genera los mRNA de *golli*. Los transcriptos sintetizados bajo este promotor son expresados de forma más ubicua que los mRNA de MBP, tanto en neuronas como oligodendrocitos así como también en células T. Las proteínas *golli* son expresadas durante el desarrollo embrionario y en tejidos postnatales, encontrándose estas proteínas en numerosos compartimientos subcelulares incluidos el núcleo, citoplasma y procesos celulares.

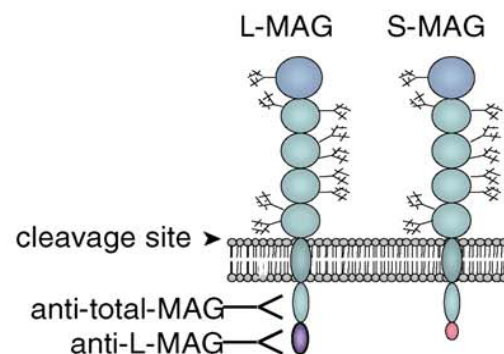
Proteína CNP (2':3'-cyclic-nuclotid-3'phosphodiesterase). La cantidad de proteína mielínica varía mucho de una especie a otra (los roedores generalmente poseen más que los grandes mamíferos). La proteína CNP se evidencia en las corridas electroforética

como dos bandas de aproximadamente 50kDa, esta representa un gran porcentaje de la proteína total de la mielina y posee actividad enzimática. Existen bajos niveles de CNP asociados a otros tipos celulares y se encuentra enriquecida en la mielina del SNC y en los oligodendrocitos por lo cual es usada como marcador molecular. Es expresada en bajos niveles por las células de Schwann en el comienzo de la mielinización y no incrementa durante el desarrollo con la acumulación de la mielina como lo hace en el SNC. Esta enzima es extremadamente activa con el sustrato 2', 3' cAMP así como también con los análogos cGMP, cCMP y cUMP. Dos polipéptidos son generados por splicing alternativo a partir del mRNA, el polipéptido largo posee 20 aminoácidos extra hacia el extremo N-terminal.

La localización celular de esta proteína se restringe a regiones específicas de mielina asociadas al citoplasma como los procesos oligodendrocíticos, las lenguas membranosas internas y externas y en los loops laterales. Se encuentra en el citoplasma, pero mucha esta asociada a las membranas. Muchas de las funciones postuladas de CNP proponen la unión a elementos del citoesqueleto como la F-actina y tubulina regulando su dinámica (Quarles, 2004). Se postula además que podría estar involucrada en algunos aspectos relacionados al transporte de RNAs y/o procesamiento de estos en oligodendrocitos.

Glicoproteína asociada a la mielina (MAG) y otras glicoproteínas de la mielina del SNC. La proteína MAG tiene un peso aproximado de 100kDa cuando es purificada de la mielina tanto del SNC como del SNP. MAG posee un simple dominio transmembrana que separa la parte extracelular mas pesada de la molécula, compuesta por cinco dominios tipo inmunoglobulina y ocho o nueve sitios de glicosilación N-terminal, del dominio intracelular carboxilo terminal. Su estructura completa es muy similar a las de las moléculas de adhesión neural (N-CAMs). En roedores, MAG se expresa como dos isoformas altamente reguladas, son generadas por splicing alternativo a partir del mRNA y difieren únicamente en su dominio citoplasmático. La isoforma con una larga cola C-terminal (L-MAG) predomina durante el desarrollo temprano y durante la activa mielinización del SNC, mientras que la isoforma con la corta cola citoplasmática (S-MAG) incrementa durante el desarrollo para hacerse más prominente en los roedores adultos (Figura 16).

Figura 16. Representación esquemática de las isoformas de MAG. En la figura, se detallan los posibles sitios de clivaje y sus productos, además del sitio de reconocimiento de anticuerpos.



MAG no se encuentra presente en la mielina compacta, pero esta localizada en las membranas gliales periaxiales de las laminas de mielina. Su disposición próxima al axón y siendo miembro de la superfamilia de IgGs, sugieren que MAG se encuentra involucrada en la adhesión y señalización entre las células gliales formadoras de mielina y el axolema. Recientemente, se ha encontrado evidencia suficiente la cual sugiere que MAG esta involucrada en la señalización en ambas direcciones, tanto hacia la glia como hacia el axón. Parece ser que existen otras funciones importantes de esta molécula que son diferentes tanto para el SNC como el SNP. MAG es una lectina tipo inmunoglobulina de unión al ácido siálico, un subgrupo de la superfamilia de IgGs y se une a glucoproteínas y gangliósidos con motivos de unión al ácido siálico $\alpha 2-3$. MAG tiene una función importante en los mecanismos de señalización desde los axones hacia los oligodendrocitos durante la mielinización. Sin embargo, MAG no es esencial para la formación de la mielina porque se observo que ratones null-MAG mielinizan axones de manera relativamente normal. A pesar de todo, en el SNC, estos knockouts exhiben un retardo significativo en la mielinización, anomalías estructurales a nivel de los paranodos, loops redundantes de mielina y fenómenos de hipermielinización. La ausencia de MAG causa que los oligodendrocitos formen mielina de manera deficiente durante el desarrollo desencadenando distrofia con el envejecimiento. Así como otras proteínas de la superfamilia de IgGs, la interacción de MAG con su ligando(s) en el axolema media la señalización célula-célula por mecanismos que involucran la fosforilación. Los dominios citoplasmáticos de MAG son fosforilados en los residuos de serina y treonina por la proteína quinasa C, L-MAG es además fosforilada en el residuo tirosina-620. Además, el dominio citoplasmático de L-MAG interacciona con la tirosina quinasa fyn, con la fosfolipasa Cy y otras proteínas oligodendrogiales. La isoforma L-MAG parece ser particularmente importante para la mielinización del SNC, ratones knockout para la isoforma L poseen las mismas anomalías en el SNC.

Existen una gran cantidad de glicoproteínas asociadas a la mielina, una de estas es la proteína de 26kDa denominada por sus siglas en inglés, Myelin-oligodendrocyte glycoprotein (MOG). MOG es una proteína transmembrana que contiene un simple dominio tipo IgG y un sitio de glicosilación N-terminal. A diferencia de MAG, la cual es secuestrada en el interior de las vainas de mielina del SNC, MOG se localiza en la superficie externa de las vainas de mielina y de oligodendrocitos, aparentemente dirigida a este blanco por una señal en su dominio citoplasmático. Debido a su localización superficial, ha sido usada como antígeno blanco en estudios de respuestas autoinmunes vinculadas a enfermedades desmielinizantes del SNC y como candidata a ser antígeno de importancia en la esclerosis múltiple. La localización superficial además sugiere que podría vincularse a señales de transducción, transmitiendo información desde la matriz extracelular o de vainas mielinicas adyacentes a los oligodendrocitos. Otra Glicoproteína con un nombre similar a MOG es (OMgp, oligodendrocyte-myelin glycoprotein por sus siglas en ingles). OMgp no pertenece a la superfamilia de IgGs, pero es caracterizada por un motivo rico en cisteínas en su región N-terminal, una serie de repetidos en tandem ricos en leucina y el epítopo HNK-1. Estas características sugieren que OMgp podría actuar en la interacción célula-célula. Sin embargo, en contraste a MOG y MAG, OMgp no es específica de las células formadoras de mielina y es además expresada en neuronas.

3.7 Proteínas mielínicas del SNP

Glicoproteína P0. Con un peso aproximado de 30kDa, P0 representa más de la mitad de la proteína del SNP (aprox~60%). La glicoproteína P0 pertenece a la membrana mielínica y contiene aproximadamente unos 220 aminoácidos. La proteína P0 en ratas, esta conformada por dominio extracelular simple tipo IgG de 124 aminoácidos, un dominio transmembrana hidrofóbico de 26 aminoácidos y un dominio intracelular de 69 aminoácidos (Quarles, 2002; Kirschner *et al.*, 2004). La región amino-terminal del dominio extracelular tiene un sitio de glicosilación conteniendo oligosacáridos muy heterogéneos, sulfatos y ácido siálico. Algunas modificaciones post-traduccionales incluyen además de la glicosilación, la acetilación y la fosforilación de P0. La principal diferencia de la composición proteica en la mielina entre el SNC y el SNP, lo representa el reemplazo de P0 por PLP en el SNP, además las células de Schwann formadoras de mielina expresan bajos niveles de PLP. Una función atribuida a P0 es la estabilización de las líneas intraperiodo de la mielina del SNP. Ciertas evidencias (Kirschner *et al.*, 2004) sugieren que contactos hidrofílicos entre las moléculas de P0 involucran interacciones proteína-proteína y proteína-carbohidrato. Estudios acerca de la estructura tridimensional de la proteína demuestran que el dominio extracelular de P0 se inserta en cada superficie membranosa como tetrámero. La estructura cristalográfica además sugiere que un residuo triptófano en la superficie apical del dominio extracelular podría interactuar directamente con la bicapa lipídica de la membrana opuesta. El dominio citoplasmático se encuentra cargado positivamente y contribuye a la estabilización de las MDL en el SNP. Delecciones completas de P0 provocan profundas consecuencias en la estructura mielínica, en contraste con las benignas consecuencias a la delección de PLP en el SNC. Ratones null-P0, presentan alteraciones motoras, temblores y ocasionales convulsiones además de una hipomielinización acompañada de regiones de mielina no compacta. La expresión de P0 es aparentemente esencial para una correcta formación y mantenimiento de la mielina; ratones heterocigotos para P0 presentan apariencia normal pero con la edad desarrollan una demielinización inflamatoria crónica. Sin embargo, ratones transgénicos que sobreexpresan P0, exhiben neuropatías desmielinizantes dependientes de la dosis expresada, pasando desde una hipomielinización transitoria hasta un severo compromiso mielínico en determinados axones. El balance en la cantidad de P0 requerido para la formación normal de la mielina es similar al observado con otras proteínas mielínicas, esto refleja el requerimiento de cantidades apropiadas de proteína mielínica para formar los complejos de forma estequiométrica. Hoy en día es claro que el control en la expresión de P0 es complejo, involucra interacciones con el axón y con la lámina basal, depende de la tasa de división celular y de la acción de factores tanto inhibidores como estimuladores así como también de los niveles de AMPc y factores de transcripción. Bajos niveles de P0 se expresan en células de Schwann y en células de la cresta neural durante el desarrollo embrionario antes de la mielinización, lo cual sugiere que P0 tendría otras funciones las cuales podrían involucrar la interacción entre el axón y la célula de Schwann o en la transducción de señales.

Peripheral myelin protein-22 (PMP-22). Esta proteína de 22kDa representa menos del 5% de la proteína total de la mielina y al igual que P0, PMP-22 posee un sitio simple de glicosilación. En contraste a P0, la cual es específica de nervios, PMP-22 se expresa en muchos otros tejidos. Posee cuatro dominios transmembrana hidrofóbicos y es considerada dentro de la superfamilia de proteínas tetraspan tal como PLP, pero entre estas no hay homología de secuencia. PMP-22 se localiza en la mielina compacta del SNP (ver Figura 14). La poca cantidad relativa en la mielina y la característica de estar presente tanto en las células de Schwann formadoras de mielina como en las no formadoras sugiere que podría desempeñar un rol dinámico en la función de ensamblaje o el mantenimiento de la mielina más que una función estructural. PMP-22 es capaz de formar complejos con P0, y esta interacción podría ser relevante para su propia función. Alteraciones en el gen *PMP-22* (mutaciones, duplicaciones, deleciones) causan fenotipos desmielinizantes tales como los observados en ratones *trembler* y en neuropatías humanas tales como Charcot-Marie-Tooth.

Proteína P₂. La mielina del SNP contiene una proteína cargada positivamente aparte de MBP conocida como P₂ (M_r 15.000). No posee homología de secuencia con MBP y es miembro de la familia FABP (fatty acid binding proteins por su sigla en inglés) las cuales se encuentran en varios tipos celulares (Martenson *et al.*, 1992). La cantidad de P₂ varía entre especies, desde un 15% de la proteína total en la mielina del SNP en Bovinos, 5% en humanos y menos del 1% en roedores. P₂ generalmente es considerada como proteína mielínica del SNP pero es expresada en pequeñas cantidades en las vainas de mielina del SNC en algunas especies, se encuentra presente en las MDL de las vainas de mielina donde podría desempeñar un rol estructural similar a MBP.

3.8 Proteínas mielínicas compartidas tanto en la mielina del SNC como en el SNP

MBP. En la mielina del SNP, MBP varía desde aproximadamente entre 5-18% de la proteína total, en contraste con el SNC, donde esta alcanza valores cercanos al 30% (Morell, 2004). En roedores, las cuatro isoformas de MBP de (21, 18.5, 17 y 14) kDa del SNC están presentes en el SNP. En roedores adultos, la isoforma MBP 14kDa es la más prominente y es denominada en la nomenclatura del SNP como P_r. El componente de 18.5kDa también se encuentra presente y es denominada como la proteína P₁ en la nomenclatura de las proteínas mielínicas del SNP. Una variación dentro de la especie humana es debida a que la proteína MBP de 18.5kDa es la más prominente dentro del SNC. Se cree que MBP no juega un rol crítico en la estructura de la mielina del SNP tal como lo hace a nivel del SNC. Por ejemplo, ratones mutantes *shiverer*, los cuales no expresan MBP, tienen una reducida cantidad de mielina en el SNC acompañada por la no compactación de las MDL. En contraste, la mielina del SNP en estos mismos ratones es esencialmente normal tanto en cantidad como estructura a pesar de la ausencia de MBP. Esta diferencia SNC/SNP en el rol de MBP es probablemente porque el dominio citoplasmático de P0 tiene un rol importante en la estabilización de las MDL del SNP. Animales doble deficientes P0 y MBP tienen un acentuado defecto en la compactación de las MDL en el SNP comparado con ratones P0-null. Esto último indica que ambas

proteínas contribuyen a la compactación de las superficies citoplasmáticas en la mielina del SNP.

MAG. Así como en el SNC, MAG se encuentra presente en las membranas periaxoniales de las células de Schwann formadoras de mielina, en las incisuras de Schmidt-Lanterman, en loops paranodales y en el mesaxón externo (Quarles, 2002; Georgiou, 2004) (Figura 17).

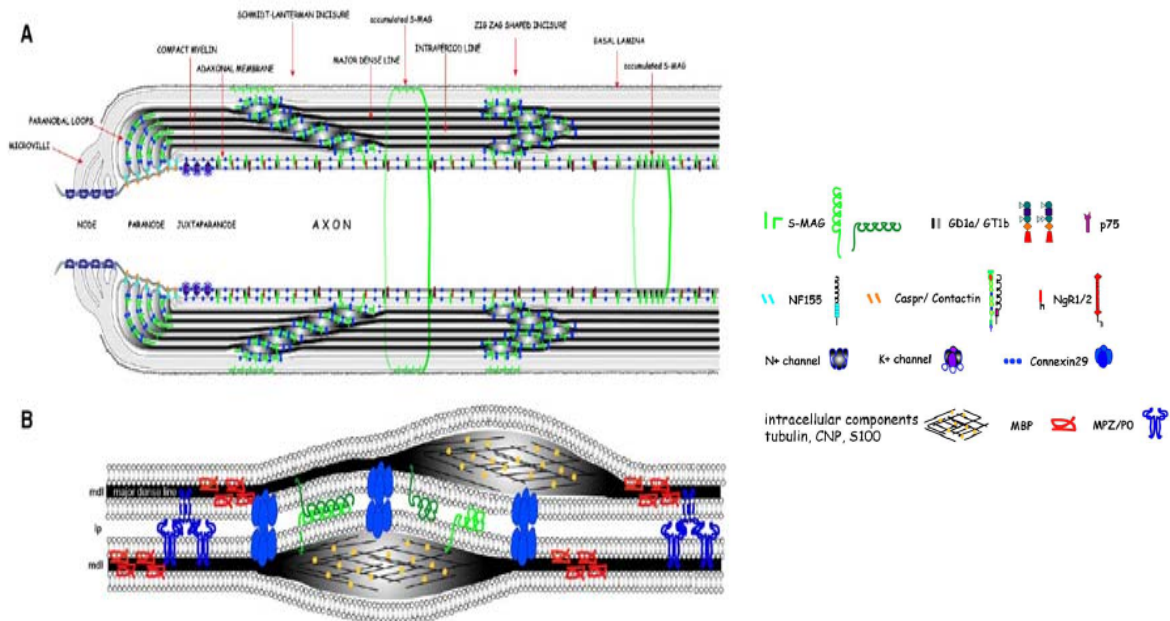


Figura 17. Ilustración esquemática correspondiente a la sección longitudinal de una fibra del SNP indicando la distribución de la isoforma S de MAG y otras moléculas. (A) La isoforma S-MAG se localiza en la membrana periaxonal interactuando con GD1a y GT1b, NgR1/2 y p75^{NTR}. Además S-MAG, se encuentra presente en incisuras de Schmidt-Lanterman y loops paranodales. (B) Se detalla la disposición de algunas moléculas que forman parte de las incisuras de Schmidt-Lanterman. En el margen derecho de la imagen se detalla cada una de las moléculas ilustradas como referencia. Tomado de Erb *et al.*, 2006.

Sin embargo, además de su rol en la interacción glia-axón, MAG podría funcionar interactuando entre membranas de células de Schwann adyacentes en otros lugares dentro del SNP. Ambas isoformas de MAG se encuentran presentes en el SNP de roedores, S-MAG es la isoforma predominante en todas las edades. La mielinización del SNP en ratones null-MAG es inicialmente mas normal que la mielinización del SNC. Sin embargo con la edad, estos ratones desarrollan neuropatías periféricas caracterizadas por la degeneración de los axones mielínicos. La patología es asociada con una disminución del calibre axonal, incremento en la densidad de neurofilamentos, reducida expresión y fosforilación de neurofilamentos acompañado de una eventual degeneración axonal. Estos hallazgos demuestran la importancia de MAG y su rol esencial en la señalización desde las células de Schwann hacia los axones necesaria para el mantenimiento normal de los axones mielínicos en el SNP. MAG es un ejemplo mas de una proteína glial relacionada a la mielina, cuya ausencia provoca profundos efectos en el axón envainado. En cuanto a MAG, se sabe que es una de las tantas proteínas gliales (también incluidas Nogo y OMgp) las cuales inhiben el crecimiento de neuritas tanto en

cultivos celulares como en la regeneración axonal *in vivo*. El receptor axonal de MAG que transmite la señal inhibitoria se encuentra localizado en un complejo tipo raft de señalización el cual consiste en gangliósidos, el receptor Nogo y el receptor de neurotrofinas p75^{NTR}. En resumen, la función más importante de MAG en el SNP es la transmisión de señales desde las células de Schwann hacia el axón, mientras que la principal función dentro del SNC es la transmisión de señales en dirección inversa promoviendo la eficiente mielinización y viabilidad de los oligodendrocitos.

3.9 Otras proteínas relacionadas a la mielina.

Las vainas de mielina contienen una numerosa cantidad otras de proteínas en pequeñas cantidades las cuales se encuentran además en otros tipos celulares. Algunas de estas se encuentran en la mielina compacta, otras enriquecidas en determinados dominios. Una gran variedad de proteínas de membrana, incluidos algunos miembros de la superfamilia de las IgGs son selectivamente localizadas por ejemplo en el axón o en los paranodos y juegan un papel importante en la formación y estabilización de estas complejas estructuras. Como ejemplo se destaca la interacción en *trans* a nivel del paranodo entre la molécula de Neurofasina-155 en la membrana glial y el complejo Caspr/contactina en la membrana axonal para formar las uniones septadas, a nivel de los paranodos.

3.10 Enzimas asociadas a la mielina.

Un gran numero de enzimas se encuentran asociadas a la mielina (Ledeen, 1992). Al contrario de lo que se suponía, la mielina es metabolitamente activa desde el punto de vista de sus síntesis, procesando un intercambio constante de sus propios componentes. Además, la mielina juega un rol importante en el transporte iónico con respecto al mantenimiento de su propia estructura, también participando como buffer iónico cerca del axón. Existe una mayor cantidad de estas enzimas en el SNC comparado con el SNP sugiriendo una función mas especializada en el primero. Algunas enzimas asociadas a la mielina incluyen la AMPc kinasa, kinasa dependiente calcio/calmodulina, proteína kinasa C, algunas proteasas y fosfatasa de fosfoproteínas. Las actividades proteína kinasa C y fosfatasa son presumiblemente las responsables del rápido intercambio de los grupos fosfato de MBP. Las enzimas mielínicas involucradas en el metabolismo lipídico consisten un numero de enzimas modificadoras de esteroides y del colesterol, actividades UDP-galactosil:ceramida, galactosil-transferasa y muchas enzimas del metabolismo glicero-fosfo-lipídico. Se incluyen además las enzimas necesarias para la síntesis de fosfatidil-etanolamina a partir de diradyl-sn-glicerol y etanolamina. Los bloques elementales con los cuales se construye la mielina quizás sean ensamblados en los lípidos por enzimas mielínicas; la acetil-coenzima A (CoA) sintasa se encuentra presente en la mielina, sugiriendo la capacidad de integrar ácidos grasos a los lípidos de la mielina.

4. Estructura del axón mielinizado: “Desde la morfología a la funcionalidad”

El territorio en el cual se extiende, en íntimo contacto, una célula de Schwann a lo largo del axón, es denominado internodo. Dentro de este, existen dominios específicos caracterizados por la presencia de determinados complejos moleculares que definen cada compartimiento celular (Figura 18).

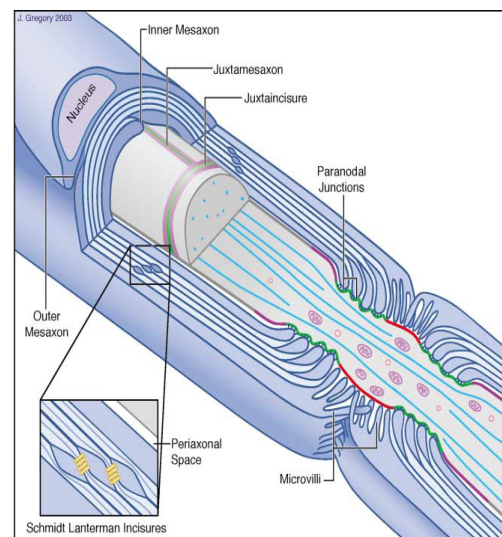
El establecimiento de la polaridad celular en las fibras nerviosas requiere de las interacciones extracelulares e intracelulares capaces de generar asimetrías en las membranas, además de enriquecer en moléculas de adhesión sitios donde se realiza el contacto celular. Este tipo de mecanismos son suplementados por selectivos procesos de recambio proteico y localización, los cuales son estabilizados mediante interacciones entre complejos tanto extracelulares como intracelulares (Mostov *et al.*, 2003). La disposición de canales y moléculas de adhesión se encuentran distribuidas de manera difusa sobre los axones cultivados en ausencia de células gliales. Estas mismas proteínas, además se presentan en baja densidad, ocupan una expansión celular mucho mas grande en fibras no mielinizadas o en estadios de pre-mielinización comparadas con nervios mielinizados (Salzer, 1995). No obstante, los niveles totales de proteínas son típicamente altos en fibras antes de la mielinización y luego son reguladas negativamente con el comienzo de esta. Este tipo de regulación negativa contribuye a la formación de dominios moleculares por la redistribución proteica que desencadena.

En términos morfológicos el internodo puede dividirse en dos dominios, de mielina compacta y mielina no compacta. Las regiones no compactas de la mielina, en las cuales se sitúan las incisuras de Schmidt-Lanterman y los paranodos, representan una minoría en cuanto a proporción, respecto a las regiones compactas de mielina. La mielina no compacta provee una continuidad citoplasmática entre la célula formadora de mielina y varias regiones del internodo mielinico.

Ambos tipos de mielina, tanto compacta como no compacta, se caracterizan por composiciones proteicas únicas, las cuales cumplen funciones importantes en el mantenimiento y correcto ensamblaje de dichas estructuras en condiciones normales. Alteraciones en dichos componentes proteicos, como el caso de mutaciones en genes específicos conllevan al desarrollo de neuropatías tanto centrales como periféricas.

Figura 18. Morfología de los dominios de un axón mielinizado del SNP.

Se muestra el corte longitudinal de una sección a través de un axón mielinizado (gris) rodeado por vainas de mielina pertenecientes a dos células de Schwann contiguas. Se muestra el nodo de Ranvier (rojo), sobre el cual se proyectan las microvelocidades de las Células de Schwann adyacentes, las uniones y loops paranodales (verde) y la región juxtaparanodal (violeta). La magnificación en el recuadro representa las incisuras de Schmidt-Lanterman junto con las uniones gap. El diámetro del axón se encuentra reducido en la región nodal y en los paranodos donde además se acumulan mitocondrias y los neurofilamentos se disponen mas empaquetados. (Imagen tomada de Salzer *et al.*, 2003).



La mayoría de los componentes de la mielina son sintetizados en el citoplasma perinuclear de la célula formadora de mielina, canales citoplasmáticos desde las superficies externas hacia las regiones más internas son necesarios para expandir y mantener la estructura mielínica del internodo. Estos canales contienen microtúbulos y otros componentes del citoesqueleto para brindar transporte a través de estas estructuras así como también mitocondrias para el aporte de energía. Además en algunas áreas, existe la presencia de retículo endoplásmico y de polisomas libres que se encargan de efectuar la síntesis local de los componentes proteicos de las membranas. Las membranas de la mielina no compacta adquieren funciones especiales las cuales son determinadas por su característica y única composición molecular. Las membranas de la superficie adaxonal se encuentran en contacto directo con los axones, sus canales citoplasmáticos pueden transmitir señales que se encargan de regular la formación de la mielina, además estas señales ayudan a determinar la longitud y el grosor de la mielina internodal.

4.1 Nodos de Ranvier

Los nodos de Ranvier, descubiertos por el anatomista y patólogo Francés Louis-Antoine Ranvier (1835-1922), exponen la membrana del axón al líquido extracelular. En la región nodal, dos células de Schwann contiguas emiten prolongaciones en forma de microvellocidades las cuales establecen contacto con moléculas de reconocimiento ubicadas en la membrana axonal. Dentro del sistema nervioso, tanto en el SNP como en el SNC, los nodos cumplen idénticas funciones, son morfológicamente similares pero no ultraestructuralmente idénticos. Desde un punto de vista ultraestructural de una fibra mielínica, pueden distinguirse tres regiones: nodo, paranodo y juxtapanodo. Cada una de estas regiones contribuye con la conducción saltatoria y son mantenidas por complejas interacciones moleculares.

Los nodos representan una región pequeña, estrecha y desnuda de membrana plasmática (axolema) que separa los segmentos de mielina a lo largo de las fibras nerviosas individuales. Este dominio de membrana es de fácil identificación en secciones longitudinales de fibras peinadas y teñidas con tetróxido de osmio. La longitud del nodo se relaciona con el diámetro del axón y puede variar desde menos de 1µm en las fibras más pequeñas del nervio óptico hasta más de 5µm en fibras largas de la medula espinal (Fraher, 1973; McDonald & Ohlrich, 1971). El diámetro axonal a la altura del nodo usualmente difiere con respecto a las regiones paranodales e internodales, el mismo presenta una leve constricción. Es en esta región donde se acumulan una mayor cantidad de mitocondrias y vesículas, así como también se ven incrementados en densidad los neurofilamentos. En los nodos el espacio entre los neurofilamentos disminuye, y refleja en parte, una menor fosforilación de sus brazos los cuales determinan el calibre axonal (Mata *et al.*, 1992). Los segmentos iniciales cercanos al soma de la neurona y los nodos de Ranvier son sitios en los cuales se genera y regenera el potencial de acción. Ambos dominios se encuentran altamente enriquecidos en canales de Na⁺ dependientes de voltaje. Los canales de Na⁺ voltaje dependientes son complejos hetero-triméricos

compuestos por una larga subunidad α pre-formada y dos subunidades β transmembrana, una de ellas se encuentra unida por un puente disulfuro mientras que la otra no esta covalentemente asociada (Catterak, 2000). Mas de diez subunidades α han sido identificadas las cuales pertenecen todas a una familia multigénica. Los diferentes canales de Na^+ son funcionalmente similares, las únicas diferencias se presentan a nivel de su cinética de activación (Yu & Catterall, 2003). Los canales de $\text{Na}_v1.6$ son los predominantes en los nodos adultos tanto en el SNC como en el SNP (Caldwell *et al.*, 2000; Tzoumaka *et al.*, 2000), donde se encuentran asociados con la subunidad $\beta1$ (Ratcliffe *et al.*, 2001). De forma interesante la subunidad α durante el desarrollo presenta una transición (Boiko *et al.*, 2001). La isoforma del canal de $\text{Na}_v1.2$ es expresada durante el desarrollo y luego remplazada mas tarde por la conformación $\text{Na}_v1.6$ presente en los nodos de los individuos adultos en el SNP, y en la mayoría de los nodos adultos en el SNC (Boiko *et al.*, 2001), ya que una porción de estos nodos del SNC también continúan expresando la conformación $\text{Na}_v1.2$ y $\text{Na}_v1.8$ (Arroyo *et al.*, 2002).

Con respecto a la formación de los nodos de Ranvier durante el desarrollo (Figura 19), inicialmente es algo difusa la distribución de las moléculas que conforman la estructura madura. Los nodos inicialmente se forman como complejos difusos asociados a los extremos de las células de Schwann para luego fusionarse y condensarse (Vabnick & Shrager, 1998). Este patrón que tiene como objetivo final la formación de clusters nodales, se lleva a cabo mediante la remoción de canales en el internodo redistribuyendo estos en la superficie celular vía una barrera de difusión asociada a los extremos de la célula de Schwann (Pedraza *et al.*, 2001; Trapp & Kidd, 2000; Vabnick & Shrager, 1998). El ensamblaje de los dominios es de forma secuencial y ordenada a lo largo del tiempo (Figura 19). En el SNP, el ensamblaje de los dominios avanza desde la formación del nodo hacia los paranodos, y de estos hacia los juxtaparanodos (Melendez-Vasquez *et al.*, 2001; Poliak *et al.*, 2001). Esta secuencia de eventos se relaciona generalmente con cambios experimentados por las células de Schwann. Subsecuentemente las lamelas de mielina se elaboran, conformando los loops paranodales siendo los más cercanos al nodo los que se generan primero. Las uniones paranodales maduran conjuntamente a medida que comienzan los loops paranodales a acercarse y hacer contacto con el nodo en un marco espacio temporal.

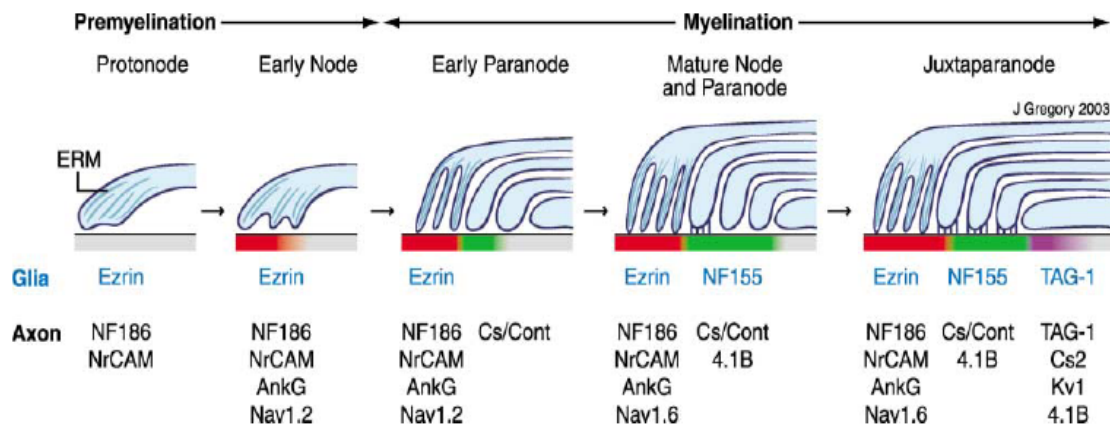


Figura 19. Ensamblaje y maduración secuencial de dominios en el SNP. Entre los eventos más tempranos ocurre la polarización longitudinal de la célula de Schwann, indicada por la acumulación de Ezrina en los extremos de la célula y luego la posterior acumulación de las moléculas de unión a ankirina G y CAMs en el axón en asociación con la formación del protonodo. Poco después, antes de la formación de la mielina compacta ocurre la acumulación en los nodos de ankirina G y $\text{Na}_v1.2$. Durante la formación de las láminas de mielina, se detecta en los paranodos Caspr y contactina. Los nodos maduran subsecuentemente y ocurre el reemplazo $\text{Na}_v1.2$ por $\text{Na}_v1.6$, al mismo tiempo que maduran las uniones paranodales. Finalmente ocurre el desarrollo de los juxtaparanodos acumulándose TAG-1, Caspr2, canales K_v1 y 4.1B. Los componentes del juxtaparanodo están presentes en los paranodos, son desplazados a los juxtaparanodos por la acumulación de Caspr (no mostrado). La secuencia de ensamblaje difiere un poco en el SNC. (Imagen tomada de Salzer et al, 2003).

Cuatro genes que codifican las subunidades β ya han sido identificados, estos modulan diferencialmente la superficie de expresión además de regular la cinética y la amplitud de las corrientes en los canales de sodio (Catterall, 2000; Yu & Catterall, 2003; Yu et al., 2003). Cada una de las subunidades β contiene un dominio simple tipo Inmunoglobulina-Ig, y de forma consistente con su estructura promueve la adhesión interaccionando en *trans* con proteínas de la matriz extracelular (Isom, 2002). La subunidad $\beta1$ interacciona en *cis* con la molécula de neurofascina y Nr-CAM, las cuales contribuyen a la organización del complejo nodal (Ratcliffe et al., 2001). Los canales de Na^+ son parte de un complejo multiproteico en el nodo y en los segmentos iniciales del axón (Peles & Salzer, 2000). Un componente clave es la proteína multivalente denominada ankirina G (Bennet & Lambert, 1999). Esta molécula se encuentra implicada en la organización de la membrana del citoesqueleto, en el *targeting*, así como también en la polaridad (Mohler et al., 2002). La ankirina G además, se une directamente a las subunidades α de los canales de sodio vía un motivo conservado en el segundo loop citoplasmático (Garrido et al., 2003; Lemaillet et al., 2003), también lo hace a la βIV -spectrina, una isoforma que se localiza en los segmentos iniciales del axón y en los nodos (Berghs et al., 2000; Komada & Soriano, 2002). Existen además de estas, una gran variedad de proteínas que se localizan en el nodo y que interaccionan con la ankirina G, incluidas las moléculas de adhesión neural. Nr-CAM y la isoforma de 186kDa de la neurofascina son miembros de la subfamilia L1 de IgCAMs (Hortsch, 2000), y poseen una secuencia citoplasmática altamente conservada que promueve la interacción con la ankirina G (Bennett & Lambert, 1999). La glicoproteína asociada a la mielina MAG,

también forma parte de estas estructuras, localizándose en los loops paranodales regulando los espacios adyacentes entre estos y en los juxtaparanodos (Trapp & Kidd, 2000 citado por Lazzarini).

Figura 20. Representación esquemática de la región nodal junto con sus moléculas asociadas. Figura izquierda. Se esquematiza la organización de los compartimientos de la célula de Schwann en una sección longitudinal a través de un axón mielinico. El recuadro en rojo representa la región nodal, las microvelocidades de la célula de Schwann contactando el axolema nodal.

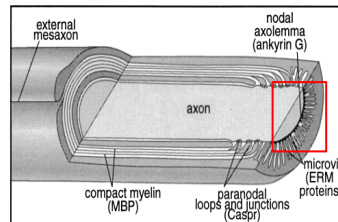
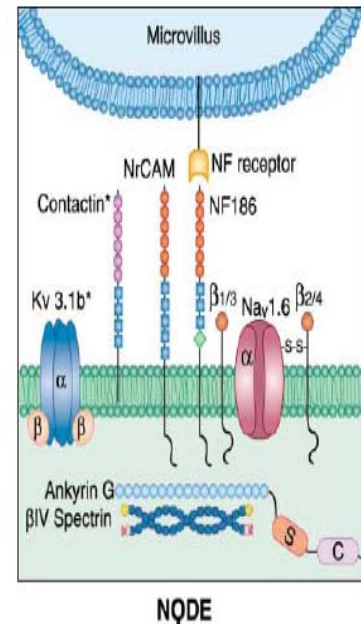


Figura derecha. Componentes proteicos de un nodo maduro, NrCAM, neurofascina 186 y el complejo trimérico de canales de $\text{Na}_v1.6$ asociados con cualquiera de las moléculas $\beta1/\beta3$ o $\beta2/\beta4$. Estos se encuentran asociados a ankirinaG, la cual se une a un heterodímero de βIV -spectrina. La molécula de neurofascina interacciona en *trans* con un posible receptor de la célula de Schwann en la microvelocidad, e interacciona en *cis* con las subunidades β de los canales de sodio. Los canales de $\text{K}_v3.1$ y la contactina se encuentran presentes en algunos nodos del SNC (*). Los nodos de Ranvier también se encuentran enriquecidos en las moléculas ERMs, (Ezrina, Radixina y Moesina), EBP50 y actina las cuales no se esquematizan en esta figura. (Imágenes tomadas de Melendez-Vasquez et al., 2001 & James L. Salzer, 2003).



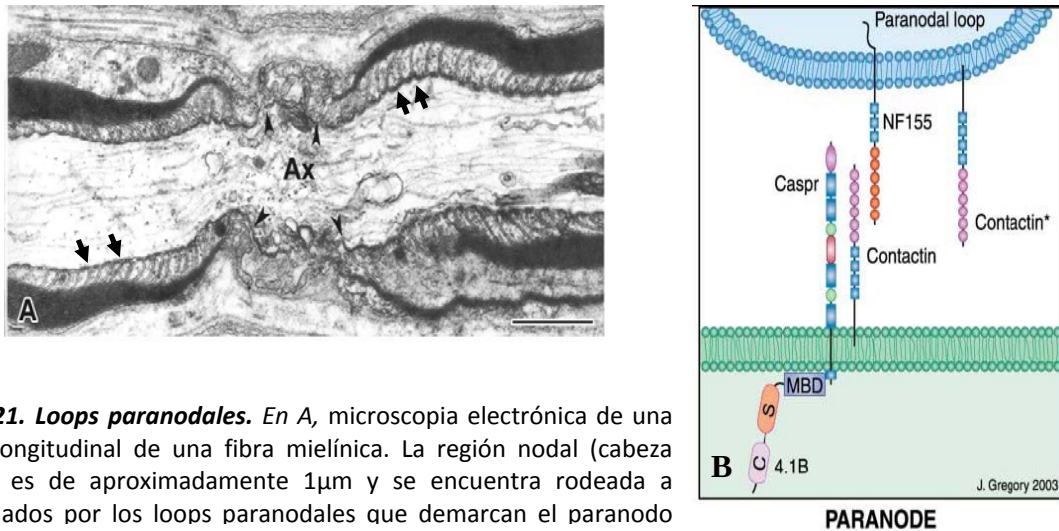
Algunos componentes extracelulares involucrados a los nodos de Ranvier en el SNC incluyen tenascin R, la cual estabiliza los complejos que rodean los canales de sodio mediante la unión a contactina y a la subunidad $\beta2$, promoviendo una normal velocidad de conducción (Weber et al., 1999).

La estabilización de los nodos de Ranvier requiere una coordinada distribución de los componentes proteicos, estudios recientes (Melendez-Vasquez et al., 2001), han demostrado que la presencia de proteoglicanos a nivel de la región nodal tanto en el SNC como en el SNP contribuyen al ensamblaje de esta estructura. Los proteoglicanos de la familia condrotin sulfato tales como Sindican-3 y Versican, se encuentra enriquecidos en las microvelocidades nodales del SNP, Estos además, promueven la unión de factores de crecimiento y proliferación de las células de Schwann, ya que se encuentra co-localizando con receptores de tipo erbB2 (asociado a factores de crecimiento), lo cual sugiere un contacto directo entre estas proteínas a nivel del nodo. Se postula además que este tipo de proteoglicanos podrían estar involucrados en la regulación del ambiente iónico a nivel del nodo.

4.2 Paranodos

Los loops paranodales representan los extremos laterales del internodo mielinico. Los mismos consisten en una orientación longitudinal espiralada del citoplasma de la

célula de Schwann el cual se encuentra adherido al axón y entre si por complejos de anclaje de tipo unión septada. La ultraestructura paranodal se observa mejor cuando se dispone de manera longitudinal a cada lado del nodo, se pueden ver así los “bolsillos citoplasmáticos” de la célula de Schwann (Figura 21).



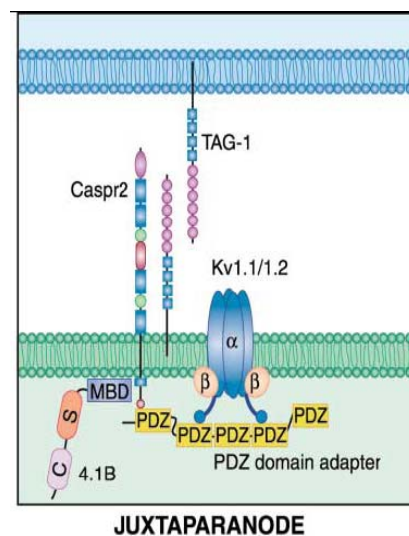
A medida que la mielina compacta se aproxima al nodo, las MDLs se abren y acomodan su citoplasma. Las membranas extracelulares de las láminas vecinas se abren formando los loops paranodales, los cuales se encuentran separados uno de otro aproximadamente por 12 a 14nm. El arreglo de los loops paranodales en las fibras ocurre de manera ordenada con la llegada de las láminas de mielina mas internas primero hacia la región nodal y por ultimo las más externas, que se disponen más adyacentes al nodo. Dentro del espacio existente entre los loops paranodales y el axón se encuentra una región densa que se encarga de conectar las dos membranas, denominada (bandas transversales). Estas bandas densas representan uniones septadas y conforman el mayor aparato de adhesión entre la mielina y el axón. Las membranas paranodales y del axolema contienen una numerosa cantidad de partículas intermembranas las cuales se disponen enfrentadas para anclar las dos membranas. Los mayores componentes proteicos de estas regiones son, contactina y Caspr, las cuales se encuentran en el axolema tanto en el SNC como en el SNP (Einheber *et al.*, 1997; Menegoz *et al.*, 1997; Rios *et al.*, 2000). Estas moléculas funcionan como heterodímeros y se postula que podrían ensamblarse antes de la inserción en el axolema. Los loops paranodales contienen además la isoforma de neurofascina (NF155), la cual co-localiza y forma complejos con contactina/Caspr (Charles *et al.*, 2002; Tait *et al.*, 2000). Todas estas moléculas forman parte de las uniones septadas. La ausencia tanto de Caspr como contactina en ratones *knockout* resulta en la perdida de estas uniones tipo septadas (Bhat *et al.*, 2001; Boyle *et al.*, 2001).

Al parecer, las uniones paranodales axo-gliales jugarían un rol clave en la separación espacial y en la distribución de canales Na^+ y K^+ en el nodo de Ranvier, siendo los primeros los confinados a la región nodal y los segundos a la región juxtaparanodal.

4.3 Juxtaparanodos

Las regiones juxtaparanodales, se encuentran adyacentes a los loops paranodales. La región comprendida entre dos juxtaparanodos de una misma célula de Schwann se denomina internodo. Mediante microscopia electrónica por criofractura, se identificaron clusters de partículas intramembranasas en el axolema juxtaparanodal (Rosenbluth, 1976). Estas partículas corresponden a canales de potasio $\text{K}_v1.1$ y $\text{K}_v1.2$ así como también su subunidad asociada β_2 (Rasband *et al.*, 1998). Existe además en esta región, una molécula homologa de Caspr, Caspr2, la cual se encuentra enriquecida en el axolema juxtaparanodal tanto en el SNC como en el SNP, co-localizando con $\text{K}_v1.1/1.2/\beta_2$ (Poliak *et al.*, 1999). Caspr2 y Caspr poseen estructuras similares especialmente en la región extracelular, pero únicamente Caspr2 posee un dominio PDZ. $\text{K}_v1.1$ y $\text{K}_v1.2$, también tienen dominios PDZ y forman complejos con Caspr2, probablemente mediados por una proteína con múltiples sitios de unión PDZ adaptadora. La Glicoproteína transitoria axonal (TAG-1 por su sigla en ingles), se encuentra también en los juxtaparanodos a nivel de la membrana glial y forma complejos en *cis* con Caspr2 (Poliak *et al.*, 2003; Traka *et al.*, 2003). A nivel del juxtaparanodo, en la membrana glial, también se encuentran presentes hemicanales de Conexina-29 los cuales se cree que juegan un rol en la remoción de iones K^+ en exceso hacia el espacio periaxonal (Altevogt *et al.*, 2002). Los canales de potasio juxtaparanodales desempeñan un rol fisiológico importante en la excitabilidad de las fibras mielinizadas. Esta idea es respaldada por el hallazgo en ratones *Kv1.1-null*, de una generación anormal de impulsos cerca de la unión neuromuscular (Smart *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1998b).

Figura 22. Principales complejos moleculares en la organización del juxtaparanodo. (Salzer, 2003).



4.4 Internodo

Un internodo representa por definición el segmento de una fibra mielinizada por una única célula de Schwann o por un oligodendrocito, de forma aproximada este segmento tiene en promedio entre 200-2000µm de longitud. El nodo de Ranvier, representa el territorio en el cual dos células de Schwann contiguas se encuentran, y tiene aproximadamente 1µm de longitud; estos dominios se disponen en condiciones normales a intervalos regulares a lo largo de la longitud del axón mielinizado. Es posible determinar en fibras peinadas y teñidas con osmio, la presencia de estas y otras estructuras mas translucidas tales como las incisuras de Schmidt-Lanterman que atraviesan de forma radial la mielina compacta. El núcleo de una célula de Schwann mide aproximadamente 50µm de longitud, y en un corte longitudinal de un internodo, este representa el 3% de la larga fibra mielínica.

La membrana internodal axonal del SNP es organizada de forma coordinada con la vaina de mielina. Estudios de ME por criofractura, demostraron que los internodos poseen partículas similares a la región juxtaparanodal (Millar & Da Silva, 1977; Stolinski & Breathnach, 1977; Stolinski *et al.*, 1981, 1985). La membrana internodal de los axones en el SNP contiene complejos Caspr/contactina flanqueados por complejos Kv1.1/1.2/β2/Caspr2 (Arroyo *et al.*, 1999; Rios *et al.*, 2000). Recientemente se han encontrado NF155 (Tait *et al.*, 2000), Cx29 (Altevogt *et al.*, 2002), y TAG-1 (Traka *et al.*, 2002) localizándose en una distribución complementaria en la membrana adaxonal de las células de Schwann formadoras de mielina.

4.5 Incisuras de Schmidt-Lanterman

Como parte de los estudios y reportes morfológicos en axones mielínicos del SNP, tanto Schmidt (1874) como Lanterman (1877), de manera independiente, describieron una serie de hendiduras o incisuras con forma de “embudo” que interrumpían la apariencia densa de la mielina (Figura 23). Estas hendiduras, se denominaron incisuras de Schmidt-Lanterman. Dichas estructuras fueron observadas además por Ranvier (1878) y Ramón y Cajal (1928). Estas incisuras son propias de las regiones internodales y muy abundantes entre las regiones perinuclear y paranodal en el SNP. Bajo diferentes condiciones patológicas y ciertas enfermedades pueden alterar la frecuencia de las incisuras. El número total de incisuras incrementa con el grosor de la mielina, la longitud internodal (Hiscoe, 1947; Sotnikov 1965; Ghabriel & Allt, 1980a), y en respuesta a numerosos estímulos como injuria axonal o el daño por compresión, así como también en nervios en regeneración (Berger & Gupta, 2006).

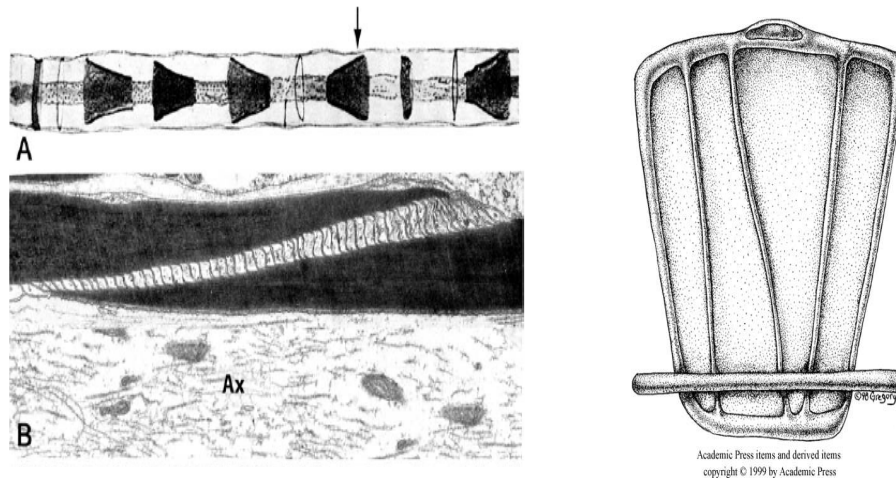


Figura 23. Incisuras de Schmidt-Lanterman. A. Dibujo de Ramón y Cajal (1928) mostrando el arreglo tipo “embudo” de las incisuras en una fibra miélnica del SNP. B. Sección longitudinal de una incisura examinada bajo microscopia electrónica. La imagen derecha muestra una célula de Schwann completamente desenrollada del axón, las líneas casi verticales representan regiones de mielina no compacta que conforman las incisuras. Ax=axón. Imagen B, Mugnaini *et al.*, 1977. Tomado de Lazarini, *Myelin Biology and Disorders*.

Las largas fibras del nervio ciático de rata poseen en promedio 25 incisuras por internodo. Estas están presentes durante los primeros estadios de mielinización y en los internodos remielinizados. Se han establecido criterios ultraestructurales para su identificación por medio de microscopia electrónica. Cuando se examina la ultraestructura en secciones longitudinales, las incisuras de Schmidt-Lanterman aparecen como una serie de aberturas citoplasmáticas de la mielina compacta (Robertson, 1958; Gabriel & Allt, 1981; Hall & Williams, 1970; Peters *et al.*, 1991) (Figura 23 B). Orientadas tanto de manera longitudinal como transversal, las membranas de las incisuras de Schmidt-Lanterman se distinguen de la mielina compacta por la presencia de citoplasma de la célula de Schwann (MDL no fusionadas), presencia de microtúbulos, desmosomas, filamentos de actina, organelos tipo mitocondrias y algo de retículo endoplásmico (Blakemore, 1969; Singer, 1968, Landon & Hall, 1976). Además, las incisuras contienen una gran variedad de proteínas tales como: fosfatasa alcalina, MAG, proteína básica P₂ y la proteína gap Conexina-32 (Pinner *et al.*, 1964; Novikoff, 1967; Trapp *et al.* 1979; Schober *et al.*, 1981; Xu *et al.*, 2000). Mutaciones en el gen que codifica la proteína Conexina-32, el cual se encuentra ligado al cromosoma X, desencadena un tipo de neuropatía hereditaria desmielinizante denominada Charcot-Marie-Tooth ligada al X.

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

Singer, 1968; Hall & Williams, 1971; Singer *et al.*, 1972; Rawlins, 1973). El rol funcional de estos “atajos” es también analizado desde la óptica del mantenimiento “local” alejado de los centros celulares de abastecimiento de proteínas, tanto en axones como en células de Schwann (Kun, A et al, 2007).

Pocas evidencias existen atribuyéndole a estas un rol en el transporte de proteínas o lípidos requeridos para la formación de la mielina o su recambio. Por otro lado, las incisuras son estructuras muy dinámicas capaces de migrar a lo largo del internodo (Mugnaini *et al.*, 1977, imágenes estáticas de incisuras parcialmente formadas). Sin embargo, observaciones *in vivo* de otros autores no confirmaron la translocación de las incisuras en internodos del SNP (Hall & Williams, 1970).

Estructuras tipo incisura fueron descriptas en internodos mielínicos dentro del SNC por medio de microscopia electrónica (Blakemore, 1969). Estas difieren de las del SNP, en que no contienen MAG.

5. Neuropatías periféricas hereditarias.

La neuropatía es un componente frecuente de numerosos síndromes heredables y diversos factores. Cuando este ocurre solo, es usualmente denominado enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT). La biología de los axones y las células de Schwann mielinizantes se hacen vulnerables a efectos en mutaciones que afectan una gran cantidad de genes.

Las neuropatías hereditarias periféricas más frecuentes, han sido descritas inicialmente por Charcot, Marie y Tooth a fines del siglo XIX y complementada por otros como Herringham, Déjérine, y Sotas más tarde (citado en Dyck et al., 1993a, Vallat et al. 2002). Las formas dominantes de estas neuropatías son reconocidas como CMT en honor a sus descubridores.

Los tipos o manifestaciones CMT, clásicamente se han organizado para su estudio según la alteración genética que portan y que puede afectar a las células de Schwann o a los axones (neuronas). Así se han dividido en desmielinizantes (CMT1) y axonales (CMT2), acorde a ciertas características clínicas, electrofisiológicas e histológicas, que acompañan las mutaciones específicas en cada caso. La mas común de todas estas es CMT1, caracterizada por una manifestación inicial a temprana edad (primer o segunda década de vida), presentando velocidades de conducción (VCNs) menores a 38 m/s en los miembros superiores y demielinización segmentaria, remielinización y formaciones de tipo “bulbos de cebolla” en biopsias de nervio. CMT2 por el contrario, posee una manifestación más tardía, con VCNs iguales a/levemente menores de 38 m/s y perdida de axones mielínicos (Dyck et al., 1993^a).

El síndrome Déjérine-Sottas (DSS), HMSN III, y CMT3 se manifiestan en niños los cuales poseen severas neuropatías (Dyck *et al.*, 1993^a; ; Gabreels-Feste, 2002; Ouvrier,

1996; Ouvrier *et al.*, 1990 Plante-Bordeneuve y Said, 2002). El desarrollo motor comienza a los 3 años aproximadamente pudiendo extenderse durante toda la infancia. El sistema sensorial puede verse afectado, especialmente por pérdida de axones mielínicos, a tal punto de presentar síntomas de ataxia sensorial. Los reflejos tendinosos pueden estar ausentes. Las biopsias revelan una completa ausencia de fibras con un grosor mielínico normal y fibras con aspecto a “bulbos de cebolla”. Los axones poseen inapropiado grosor mielínico para s calibre axonal y/o se encuentran desmielinizados de forma segmentaria.

Figura 24. Imágenes características de la enfermedad en pacientes con CMT. Izq- Atrofia y debilidad de los miembros distales. Der- A medida que la enfermedad progresa ocurre una arqueado del pie provocando deformidad, el paciente desarrolla lo que se denomina *pie cavus*.



En el Anexo II, acoplado al final de este trabajo, se muestra la tabla correspondiente a la clasificación actual de las neuropatías hereditarias según MIM(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>).

El abordaje tradicional para evaluar una neuropatía es determinar los eventos asociados a un desorden primario “axonal” o “desmielinizante”. Si el axón, o incluso la neurona es la afectada en primera instancia, luego desencadena una neuropatía “axonal”, la subsiguiente degeneración mielínica ocurre de forma Walleriana y no desmielinizante.(Griffin & Hoffman, 1993; Scherer & Salcer, 2001). Neuropatías axonales pueden terminar en “desmielinización secundaria”, incluso asociada con atrofia axonal (Dyck *et al.*, 1993b). Si la célula de Schwann es la afectada primero, luego estas terminan como neuropatía desmielinizante, incluso los propios axones pueden degenerar posterior a la desmielinización por razones no del todo comprendidas (Frei *et al.*, 1999; Sancho *et al.*, 1999).

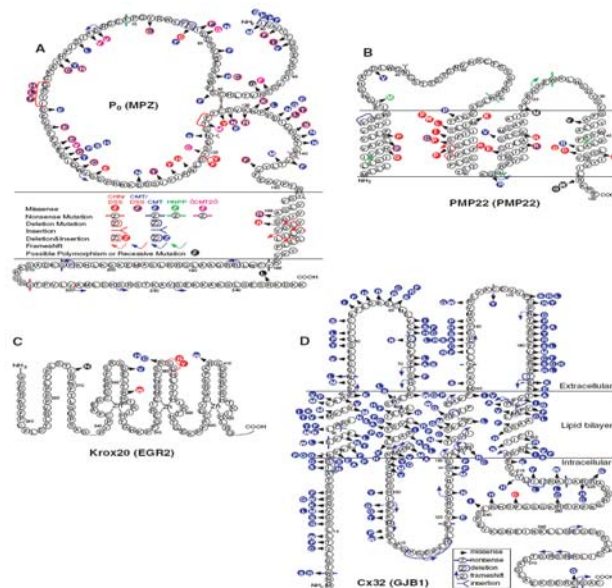
Para las neuropatías periféricas en general es difícil o incluso imposible, determinar como una neuropatía es primero “desmielinizante” o “axonal”.

5.1 Base celular de la clasificación de neuropatías hereditarias.

Mientras que se aprende más acerca de la comparación entre los distintos genotipos y fenotipos de pacientes con CMT, las aproximaciones biológicas nos proveen de aspectos claves de acerca de la patogénesis en si misma. La expresión de proteínas mutantes y los análisis en modelos animales, indican que las neuropatías hereditarias

desmielinizantes son provocadas por el efecto de mutaciones en genes, que son expresados por las células de Schwann y son manifestadas primero en las mismas células de Schwann (Martín, 1997; Nave, 2001). En otras palabras, este tipo de mutaciones poseen un efecto netamente autónomo por lo menos al comienzo de la neuropatía. Mientras que estos conceptos concuerdan con la mayoría de los datos, existen excepciones. Por ejemplo, fenotipos clínicos de ciertas mutaciones asociadas a “genes mielínicos”, indican que en su alteración o manifestación primaria puede radicar en axón de la célula nerviosa. Algunos genes que causan neuropatías hereditarias pueden ser expresados tanto por las neuronas como por las células de Schwann pudiendo tener efectos autónomos en ambos tipos celulares.

Figura 25. Representación esquemática de mutaciones en los genes MPZ, PMP22, ERG2 y GJB1. Mutaciones sitios de la proteína P0 (A), PMP22 (B), ERG2 (C) y Cx32 (D) respectivamente. Las posiciones de los aminoácidos afectados por las mutaciones así como también los fenotipos provocados se indican en la figura.



El mantenimiento del fenotipo mielínico depende de esta manera de la integridad de la relación axón-glia. La alteración axonal conlleva a la degeneración Walleriana, en la cual las vainas de mielina son fagocitadas y ocurre la dediferenciación de las células de Schwann expresando marcadores de fenotipos no mielinizantes. El estudio de la estructura y la función de los axones mielínicos, acompañadas de sus correspondientes estudios genéticos podrán brindar las claves para interpretar como este tipo de mutaciones causan neuropatías hereditarias desmielinizantes.

6. Análisis Morfométrico de fibras nerviosas para el estudio de neuropatías periféricas.

6.1. Rol del análisis histológico-morfométrico en el diagnóstico de neuropatías periféricas.

El análisis morfométrico de las fibras nerviosas es una herramienta comúnmente utilizada para el diagnóstico de neuropatías periféricas en humanos o animales

afectados. Las técnicas utilizadas para llevar a cabo el estudio morfométrico pueden ser manuales, sem.-automáticas o automáticas dependiendo de si se utiliza o no un operador y la ayuda de software adecuado. Los métodos manuales son usualmente muy tediosos, se consume mucho tiempo en su realización y es fuente de numerosos errores (Auer, 1994; Vita *et al.*, 1992). Los métodos automáticos son por lejos, los mas precisos ya que tienen menos errores, pero es necesaria la intervención de un operador para que manualmente elimine regiones negras de tejido, núcleos de las células de Schwann o artefactos en la imagen que pudiesen sesgar los datos.

6.2 Evolución de los parámetros morfométricos y su significado biológico.

Los parámetros mas comúnmente usados en el análisis morfométrico para la descripción de nervios son: área, perímetro, diámetro, factor-g [Área axón / (Área axón + Mielina)] (1), grosor de la mielina, longitud internodal, distribución en histogramas, etc. El factor-g es una medida comúnmente utilizada en análisis morfométricos para determinar alteraciones tanto axonales como en las células de Schwann pudiendo acompañar a otros resultados en el diagnostico de una neuropatía.

$$factor-g = \frac{diámetro\ axón}{diám\ axón + diám\ mielina} \quad (1)$$

El mismo, al ser un cociente en el cual su divisor es más grande, los valores oscilan ente 0 y 1. Los valores mas grandes se interpretan comúnmente como alteraciones axonales CMT2 ya que es este ultimo parámetro el que se incrementa y hace tender el factor hacia 1. Lo contrario ocurre al realizar el razonamiento inverso, valores pequeños denotan engrosamientos mielínicos, “bulbos en cebolla” que probablemente estén vinculados a trastornos de demielinización remielinización que comprenden el crecimiento hipertrófico de las células de Schwann asociados comúnmente a CMT de tipo 1.

Cada uno de estos parámetros permite evaluar el estado de la fibra nerviosa y debe acompañarse mediante los correspondientes análisis estadísticos.

7. Objetivos generales:

Obtención de datos morfométricos a partir de un estudio aplicado en fibras de muestras nerviosas periféricas (SNP) de humanos normales (donantes sanos) y portadores de CMT.

Estudio de la relación existente entre axones y células de Schwann en humanos portadores de la neuropatía periférica de origen genético Charcot-Marie-Tooth (CMT), usando marcadores moleculares pertenecientes a ambos tipos celulares.

Objetivos específicos:

Empleo de un análisis morfométrico que evalúa diversos parámetros (factor-g, área axonal, grosor mielinico, densidad de fibras por fascículo), en fibras de nervio sural de pacientes portadores de CMT comparados con los mismos parámetros obtenidos a partir de fibras sanas, con el fin de determinar su aplicabilidad diagnóstica a este tipo de neuropatía.

Estudio de la distribución de marcadores específicos axonales y gliales, tales como los del citoesqueleto de neurofilamentos, y la proteína asociada a la mielina MAG respectivamente, involucrados en el correcto funcionamiento de las fibras nerviosas normales y de pacientes CMT.

8. Materiales y métodos

En el presente trabajo, se utilizaron muestras de nervio sural humanos, estas muestras humanas provienen de biopsias de rutina obtenidas de cuatro pacientes portadores de alguna de las variantes de la neuropatía Charcot-Marie-Tooth y un humano control. Las mismas fueron realizadas por Neurólogos del Instituto de Neurología del Hospital de Clínicas (Montevideo-Uruguay). Se analizaron un total 230 axones mielínicos, 46 en cada una de las muestras. El rango de edades de los pacientes comprende entre 17 a 40 años entre los cuales se incluye tres mujeres y dos hombres. La numeración otorgada a cada una de las muestras se realizó en base al orden cronológico de la biopsia de un conjunto mayor de pacientes.

Las muestras de tejido nervioso, humano normal y patológico se procesaron para ser analizadas por inmuno-citoquímica y análisis morfométrico.

Las imágenes obtenidas en el presente trabajo se adquirieron mediante el uso de microscopio confocal Olympus DP70. Se utilizó como software el programa Fluoview (FV300 Confocal Laser Scanning versión 4.3) para las imágenes de inmuno-microscopía.

8.1 Colectado de las muestras y procesamiento del tejido.

Las muestras destinadas para el análisis morfométrico se fijaron con glutaraldehído 2,5%, luego teñidas con O_2O_4 al 1% e incluidas en resina epóxica (Epoxy Embedding Medium kit de Fluka Chemika kit No 45359). Luego fueron procesadas en secciones transversales semifinas para finalmente ser teñidas con azul de toluidina y sujetas al análisis morfométrico.

Las muestras destinadas para el análisis inmuno-citoquímico por microscopía óptica confocal se fijaron con paraformaldehído 3,5% y fueron incluidas en resina hidrofílicas LR-White (Sigma Lot 89H9804). Luego se realizaron cortes por semifinos (500-300nm de espesor). Finalmente se procedió al reconocimiento inmunohistoquímico.

8.2 Tratamiento de las muestras obtenidas por micrótopo para inmunocitoquímica.

La resina fue corroída por incubación de los cortes con Periodato de Na^+ 0,56mM por 1 hora a temperatura ambiente. Luego se incubaron los cortes con Boro-hidruro de Na^+ por 15 minutos a temperatura ambiente, para bloquear los grupos aldehídos libres presentes en la muestra. Las diferentes proteínas fueron reconocidas por técnicas de inmunotinción indirecta. Ellas constaron de las siguientes etapas: incubación con buffer de bloqueo (BSA 0,1% + glicina 0,56mM + PHEM), conteniendo suero normal del animal en el que se produjo el anti anticuerpo; incubación con anticuerpos específicos, a tiempos variables (desde 2 horas a temperatura ambiente hasta 16hs a 4°C). Las secciones fueron entonces incubadas con anti-anticuerpos conjugados a fluorocromos, montados con medio anti-fade (disminuye el auto apagado y prolonga la duración de la fluorescencia), visualizadas en microscopio confocal y registradas sus imágenes digitales mediante programas específicos (Fluoview, versión 4.3).

8.3 Análisis Morfométrico de fibras nerviosas.

Para el estudio morfométrico se utilizó el método semi-automático de análisis (Vita *et al.*, 1992; Mezin *et al.*, 1994; Auer, 1994; Romero *et al.*, 2000). Las imágenes digitales de secciones semifinas de nervio fueron obtenidas por medio del microscopía óptica (Microscopio Olympus DP70) usando el programa Microsuite, luego se realizaron las medidas y se procesaron los datos para el análisis morfométrico. El programa informático permite al investigador, de modo manual, seleccionar, modificar o eliminar las fibras registradas para poder corregir cualquier reconocimiento anómalo o exclusión de alguna fibra producto del proceso de informatizado.

Las imágenes obtenidas para el análisis del factor-g, medidas de área axonal, grosor mielinico y densidad de fibras por fascículo pertenecen a secciones transversales de nervio sural de cuatro pacientes portadores de CMT y de un humano normal usado como control. Todas las secciones fueron revisadas en busca de la presencia de artefactos y apariencias patológicas bajo microscopía óptica antes del análisis. Para cada una de las muestras analizadas, se realizó una numeración previa de cada fibra mielínica individual para su posterior identificación. Los datos numéricos obtenidos fueron exportados al programa Excel para su análisis y elaboración de las gráficas correspondientes.

Para la medición del factor-g, luego de ser procesada la imagen, se usó como criterio arbitrario de medida diametral la longitud más corta, ya que tanto los axones como la mielina no presentan una forma circunferencial exacta. Los datos morfométricos de factor-g, diámetros y áreas se extrajeron con el programa Image-J versión 1.37 (National Institute of Health, USA) todos al mismo aumento, evitando aquellos artefactos que podrían sesgar los datos. Se determinó para cada fascículo el diámetro axonal de cada fibra, el diámetro de la fibra completa (Axón + mielina), factor-g, área de cada axón y la densidad de fibras mielinicas promedio por fascículo. Se implementó el test D'Agostino para probar la normalidad de la distribución de los valores correspondientes al factor-g en cada una de las muestras, en los cuales se estudió su frecuencia de distribución. El factor-g se calculó midiendo el diámetro axonal y mielinico en la misma fibra y se usó la ecuación (1). La significación estadística de los datos se analizó usando el test de Student's y Kolmogorov-Smirnov según cada caso, comparando las muestras de pacientes CMT contra el grupo control. Para el cálculo de la densidad de fibras por fascículo se implementó el método de tres ventanas (Chentanez *et al.*, 2006; S, Agthong *et al.*, 2008) usando 3 cuadrantes de $0,012\text{mm}^2$ dispuestos sobre cada fascículo en imágenes a 20X. Una de estas ventanas fue colocada en el centro mientras que las restantes se colocaron de manera aleatoria a ambos lados de esta, en posiciones opuestas tal como se esquematiza en la siguiente (figura 26).

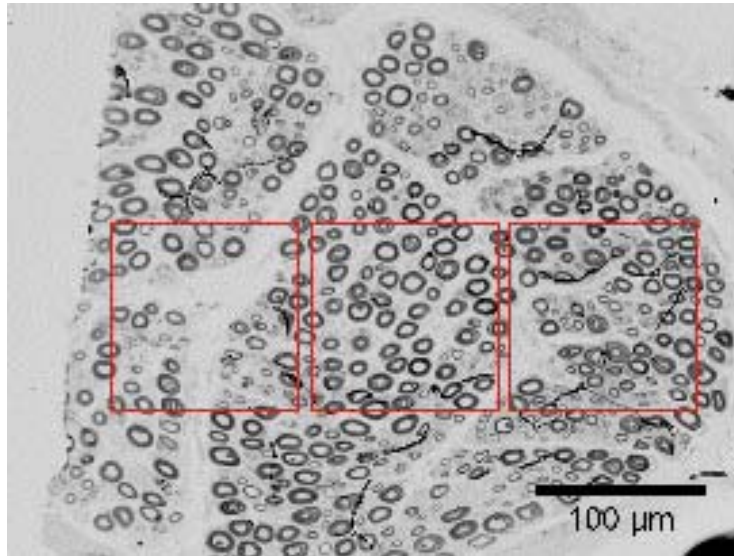


Figura 26. Sección semifina de biopsia de nervio sural humano normal. La figura esquematiza la disposición de las tres ventanas de $0,012\text{mm}^2$ usadas para el cálculo de densidad de fibras por fascículo. Dos ventanas se colocaron en la periferia del fascículo en direcciones opuestas y las tercera en el centro según (Chentanez *et al.*, 2006; Agthong *et al.*, 2008).

9. RESULTADOS

9.1 Análisis Morfométrico

Según los resultados obtenidos para el cálculo del factor-g, el promedio calculado para el grupo control concuerda con los valores señalados en la literatura (Chentanez *et al.*, 2006; Chentanez *et al.*, 2006; $0,48 \pm 0,06$) en nervio sural normal de humanos. Los valores medios de factor-g calculados se esquematizan en la Tabla.1. En cada uno de los casos, los datos calculados para el factor-g arrojaron una distribución normal según el estadístico del test D'Agostino (datos no mostrados). El grupo control tiene un promedio de $0,48 \pm 0,085$. Para los datos correspondientes a pacientes portadores de CMT se obtuvieron los siguientes promedios con sus respectivos desvíos estándar; P1= $0,5 \pm 0,134$, P3= $0,488 \pm 0,133$, P4 = $0,57 \pm 0,098$, P8 = $0,75 \pm 0,0736$ (ver tabla 1).

Los resultados gráficos y numéricos obtenidos en el análisis de los parámetros estimados en cada una de las muestras se representan en la (Figura 27, A-F) así como en la Tabla 1. Las imágenes de las secciones semifinas correspondientes a los fascículos transversales utilizados en el análisis morfométrico tanto para el control como para los pacientes CMT se muestran en la (Figura 31).

Según lo calculado, únicamente los valores promedios correspondientes a los pacientes 4 y 8 poseen diferencias significativas con respecto al control y a los pacientes 1 y 3 (Figura 27, F), según el test de Student's ($p < 0,005$). En una primera aproximación, según el presente análisis, serían los pacientes 4 y 8 los que poseen un menor grosor mielinico relativo, teniendo en cuenta que presentan elevados valores de factor-g ($0,57 \pm 0,098$ y $0,75 \pm 0,0736$, respectivamente). Por otro lado, los pacientes 1 y 3 no poseen diferencias estadísticas respecto del control, lo cual no implica que no presenten otras alteraciones morfométricas que el factor-g no contempla o que escapan de sus supuestos.

En cuanto al rango comprendido entre *Mínimo-Máximo* calculado, es el paciente 3 el que tiene el valor máximo (0,989), superior al control (0,728) y al resto de los máximos hallados (ver Tabla 1), correspondiendo este valor al 2,56% del total de fibras muestreadas en este paciente. Por otro lado, los valores mínimos fueron observados en el paciente 1 (0,224) correspondiendo este valor al 6,52% del total de fibras muestreadas.

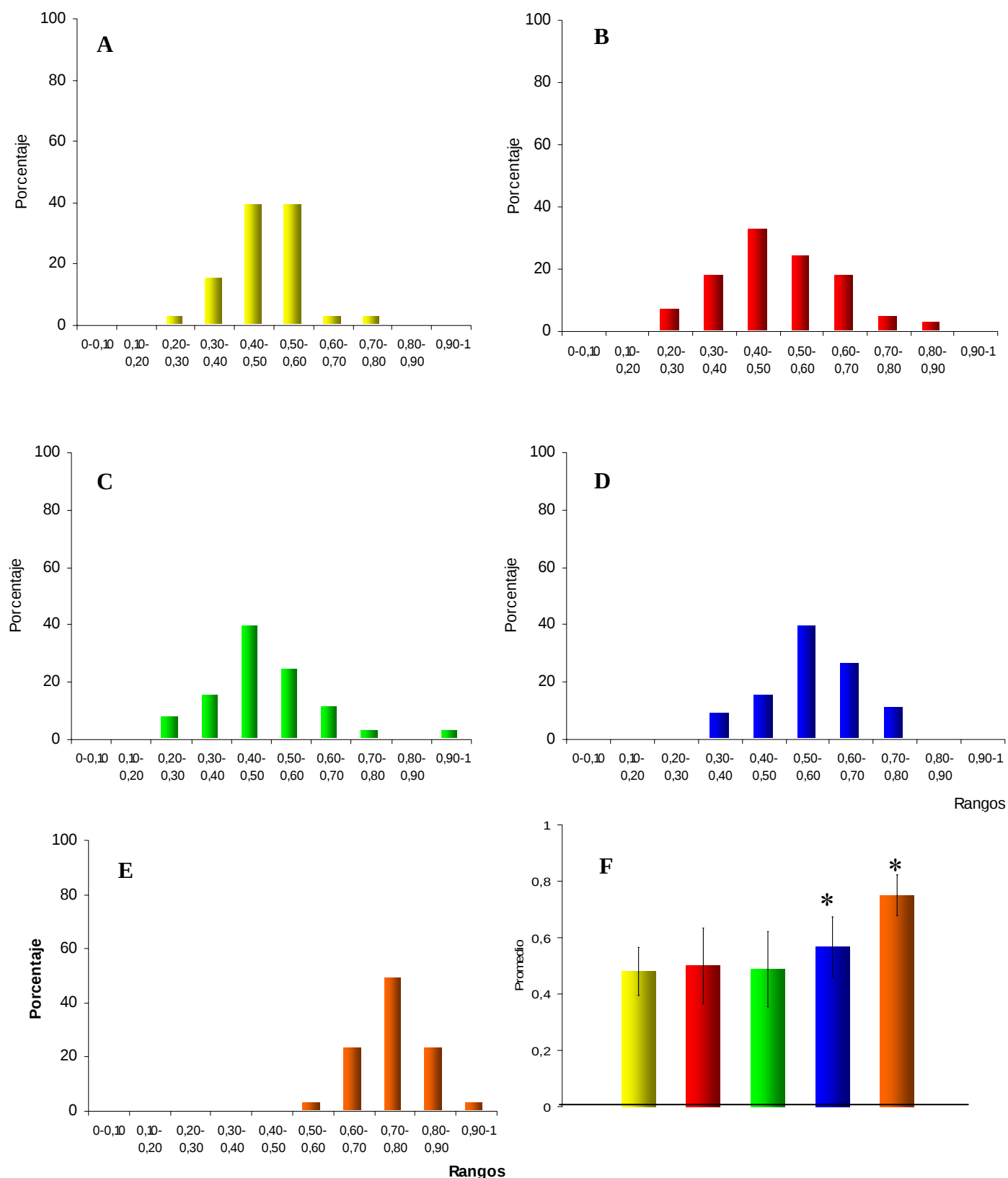


Figura 27. Valores de frecuencias expresados en porcentaje de la distribución y promedios del factor-g para cuatro pacientes CMT y un control. (A-E) Se grafican el porcentaje de fibras del control (A) y de cada uno de los pacientes (B-E), en función de la distribución por rangos del factor-g. Los datos en cada una de las graficas poseen una distribución normal verificada estadísticamente por el test de D-Agostino. La (figura F) representa el *factor-g* promedio con sus respectivos desvíos estándar para el control y los pacientes CMT. Los * representan diferencias significativas según el test de Student's de los pacientes CMT (p -valor<0,005) vs grupo control.

Tabla 1. *Resumen de los datos morfométricos obtenidos para el calculo del factor-g y área axonal.*

<i>Muestra</i>	<i>Promedio factor-g $\pm$ D. Std</i>	<i>Min-Máx.</i>	<i>Área Axonal $\pm$ D. Std</i>
<i>Control</i>	<i>0,48 $\pm$ 0,085</i>	<i>0,261-0,728</i>	<i>5438 $\pm$ 2066</i>
<i>P1</i>	<i>0,5 $\pm$ 0,134</i>	<i>0,224-0,837</i>	<i>2879 $\pm$ 1647</i>
<i>P3</i>	<i>0,488 $\pm$ 0,133</i>	<i>0,244-0,889</i>	<i>2483 $\pm$ 2238</i>
<i>P4</i>	<i>0,57 $\pm$ 0,098</i>	<i>0,343-0,763</i>	<i>3734 $\pm$ 3438</i>
<i>P8</i>	<i>0,75 $\pm$ 0,0736</i>	<i>0,585-0,911</i>	<i>10019 $\pm$ 4680</i>

El análisis correspondiente al paciente 8 fue el más disímil respecto del control. Su valor promedio para el factor-g calculado es el mas alto dentro de todos los promedios obtenidos (Figura 27, F). El paciente 8 mostró un claro incremento en la cantidad de fibras para los rangos más altos del factor-g observados (Figura 27, E) y que mayor diferencia presenta respecto del control (Figura 27, A). El valor *Máximo*, es el segundo mas alto (0,911) de los obtenidos. Tomados todos en conjunto, estos resultados denotan una disminución del grosor relativo de la mielina en los pacientes 4 y 8, según el análisis morfométrico correspondiente al factor-g.

9.2 Área axonal, grosor mielinico y densidad de fibras promedio por fascículo.

Los resultados obtenidos para el calculo del área axonal, grosor mielinico y densidad de fibras por fascículo, se ha observado que aportan evidencias morfométricas importantes que también contribuyen al diagnostico temprano de diversas neuropatías periféricas. La media y su desvío estándar para las diferentes áreas axonales calculadas en el control y los pacientes CMT, se esquematizan en la (Figura 28, F) y en la Tabla 1. Según los datos correspondientes al área axonal, la distribución en rangos que muestran los pacientes CMT es distinta del control, excepto el paciente 4 para el cual no se hallaron diferencias significativas (Figura 28, F). Los pacientes 1, 3 y 8 presentan diferencias significativas según el test de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,02$) al compararlos contra el grupo control (Figura 28, F). Los pacientes 1 y 3, presentan una perdida importante de fibras de gran calibre axonal (Figura 28, B y C) respectivamente. Ambos pacientes 1 y 3, poseen un enriquecimiento en fibras de pequeño calibre respecto del control (Figura 28, A-C).

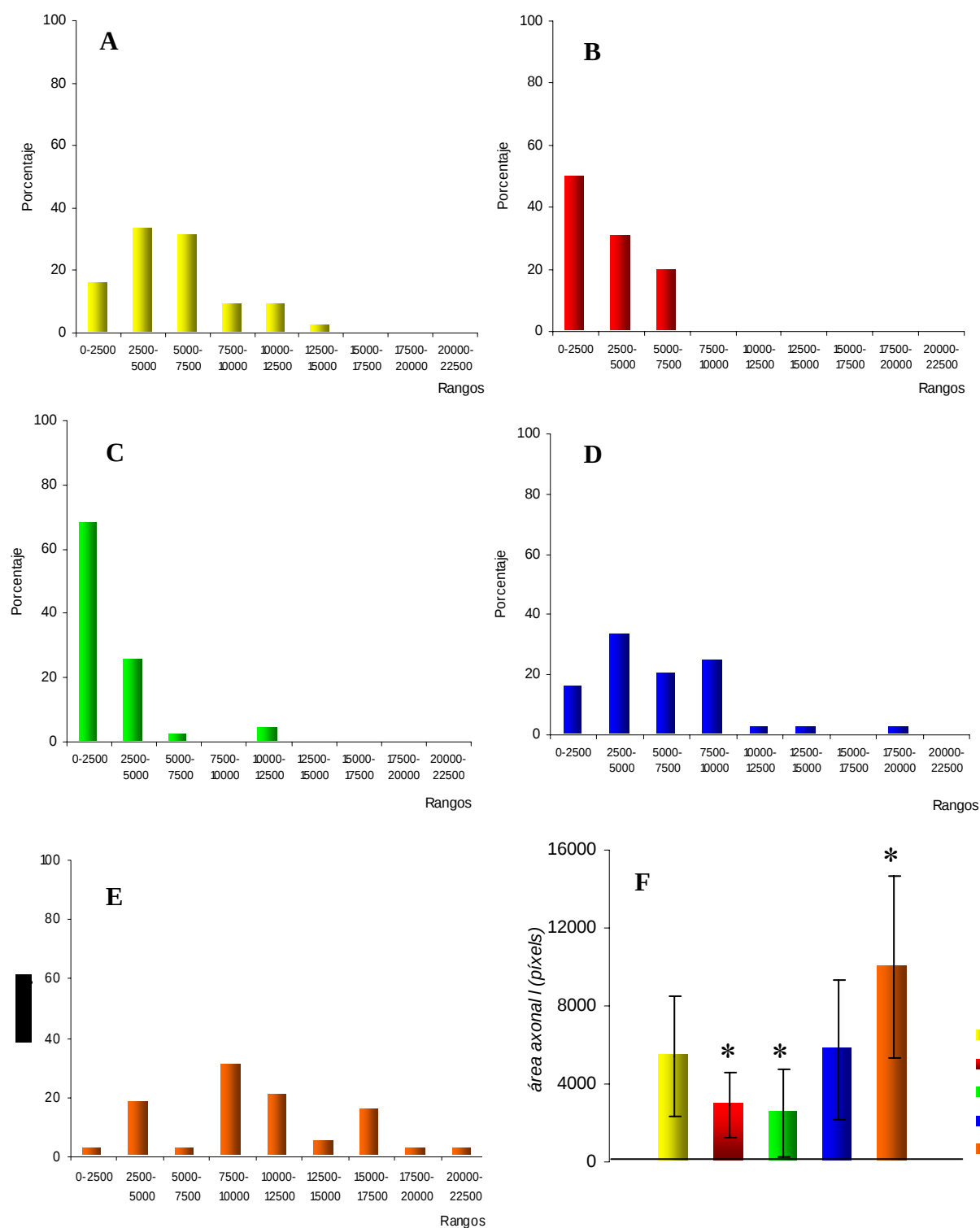


Figura 28. Valores de frecuencias expresadas en porcentaje y promedios de las áreas axonales para cuatro pacientes CMT y un control. (A-E) Se grafican el porcentaje de fibras control (A) y de cada uno de los pacientes (B-E), en función de la distribución por rangos para el área axonal. La figura F representa el área axonal promedio con sus respectivos desvíos estándar para el control y los pacientes CMT. Los * representan diferencias significativas según el test Kolmogorov-Smirnov de los pacientes CMT (p-valor<0,02) vs grupo control.

Con respecto a los datos obtenidos para el paciente 4 y 8, estos no presentan pérdida de fibras mielinicas de gran Calibre axonal, el paciente 8 posee los axones de mayor calibre calculado respecto a todos los demás pacientes CMT, superiores incluso a la muestra control.

El grosor de la mielina promedio obtenido se representa en el grafico de la (Figura 29). El gráfico evidencia una disminución del grosor mielinico promedio correspondiente a todos los pacientes CMT estudiados en comparación con el grupo control (Kolmogorov-Smirnov; $p < 0,01$). Los resultados obtenidos para el paciente 8, indican que este posee el menor grosor mielinico respecto de los restantes pacientes, apoyando resultados previos obtenidos para el cálculo de factor-g. A partir de estos resultados, podemos concluir que el paciente 8 es el que presenta los signos más significativos de hipomielinización dentro de todos lo pacientes CMT evaluados en el presente análisis morfométrico.

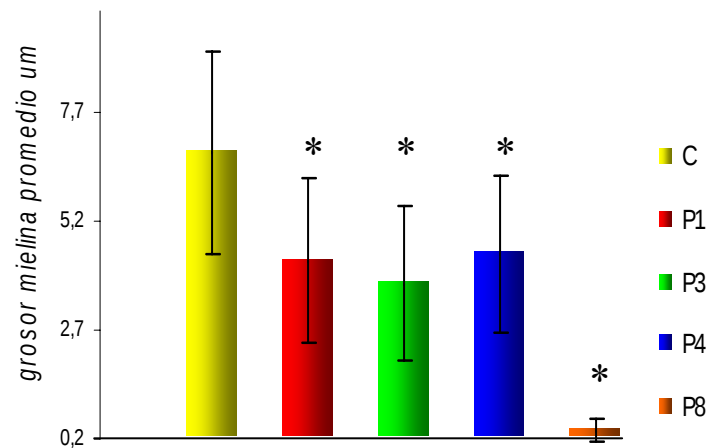


Figura 29. Grosor mielinico promedio calculado para cuatro pacientes CMT y un control. La figura representa el grosor mielinico promedio $\pm$ desvío estándar, calculado para cada uno de los pacientes y el grupo control. Todos los pacientes CMT estudiados presentan reducciones significativas (*) en el grosor mielinico con respecto al grupo control según Kolmogorov-Smirnov, ($p < 0,01$). El paciente 8 presenta la mayor reducción mielinica obtenida.

En cuanto a la densidad de fibras promedio por fascículo calculado usando el método de tres ventanas (Chentanez *et al.*, 2006; Agthong, S *et al.*, 2008), los pacientes 3 y 4 presentan una notoria reducción del número de fibras por fascículo respecto al grupo control y al resto de los pacientes (Figura 30). Este resultado concuerda con lo observado en los cortes histológicos transversales de nervio sural correspondientes a estos dos pacientes (Figura 31). Por otro lado, los promedios correspondientes a los pacientes 1 y 8 parecen ser levemente superiores a los obtenidos para el grupo control, aunque para confirmar este resultado sería necesario aumentar el número de las muestras observadas.

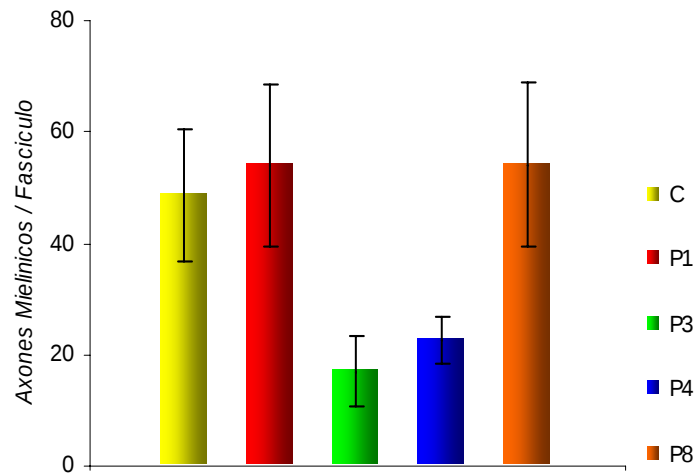


Figura 30. Conteo de densidad de fibras mielinicas promedio por fascículo en cuatro pacientes CMT y un humano control. Se cuantifico la cantidad de fibras mielinicas promedio según (Chentanez *et al.*, 2006; Agthong *et al.*, 2008) mediante el método de tres ventanas. Los resultados obtenidos indican que los pacientes 3 y 4 presentan una menor densidad de fibras mielinicas por fascículo.

9.3 Análisis Histológico y clínico

Las imágenes de la (Figura 31) representan secciones semifinas de los fascículos correspondientes a la muestra control y las muestras de pacientes CMT estudiados utilizadas en el análisis morfométrico observado a 40X.

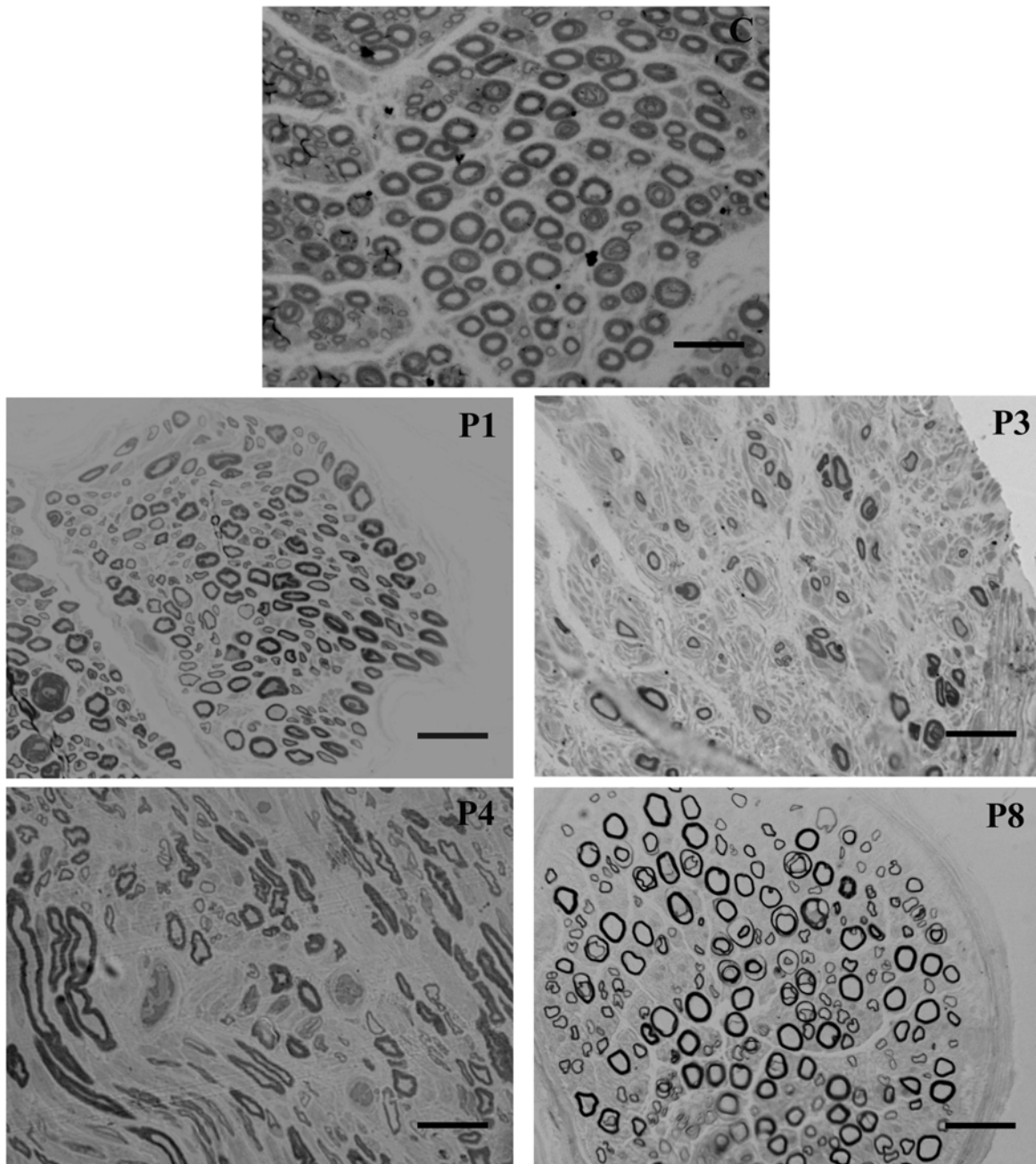


Figura 31. Imágenes de las secciones semifinas transversales de nervios sural de humano teñidas con OsO4 y azul de toluidina utilizadas en el presente estudio observadas a 40X. Desde este tipo de imágenes se inicia todo el proceso de captura y análisis informático. Los datos morfométricos son calculados sobre imágenes obtenidas a 100X. (Referencias: C, Control; P1, Paciente 1; P3, Paciente 3; P4, Paciente 4; P8, Paciente 8. Barra=30μm.

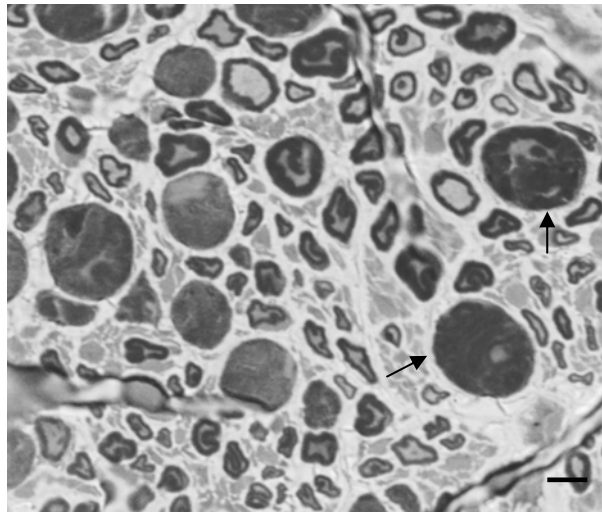


Figura 32. Sección semifina transversal de nervio sural perteneciente al paciente 1. La misma evidencia axones hipermielinados rodeados de redundancias mielinicas (flechas). Se evidencian axones en avanzado estado de degeneración (cabeza flecha). Barra=5 μ m.

Las imágenes correspondientes a los pacientes 1, 3, 4 y 8 presentaron alteraciones histológicas importantes producto de la neuropatía periférica. Se evidenció la presencia de regiones en “bulbos de cebolla” tanto para los pacientes 1 y 3, con pérdida de fibras mielinicas de gran calibre. En el paciente 3 se constato una importante pérdida de fibras mielinicas apoyando los datos obtenidos para el cálculo de la cantidad de axones por fascículo. Son notorias las formaciones en “bulbos de cebolla” presentes en el paciente 3 (ver Figura 33).

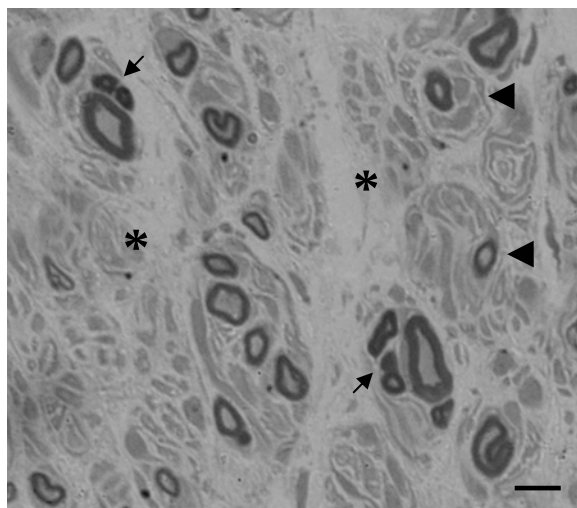


Figura 33. Sección semifina transversal de nervio sural correspondiente al paciente 3. Se evidencia una gran pérdida axonal (*), formaciones en “bulbo de cebolla” (cabeza de flecha) acompañado de regiones “clusters” de regeneración axonal (flechas). Barra=5 μ m.

Para el paciente 4, se observo una importante perdida de axones. Se observaron algunas fibras en estado de degeneración, así como un espectro de espesores mielínicos variables desde fibras hipermielinadas a fibras hipomielinadas. Se evidencian regiones de adelgazamiento axonal y redundancias mielínicas hacia la luz axonal (Figura 34).

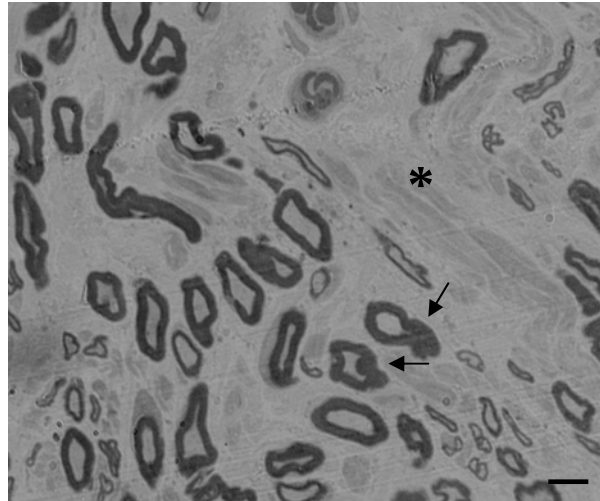


Figura 34. Sección semifina transversal de nervio sural perteneciente al paciente 4. Se observan regiones de degradación glial y perdida axonal (*). Las redundancias mielínicas son frecuentes en este paciente (flechas) y variación en sus niveles de mielinización. Barra=5 μ m.

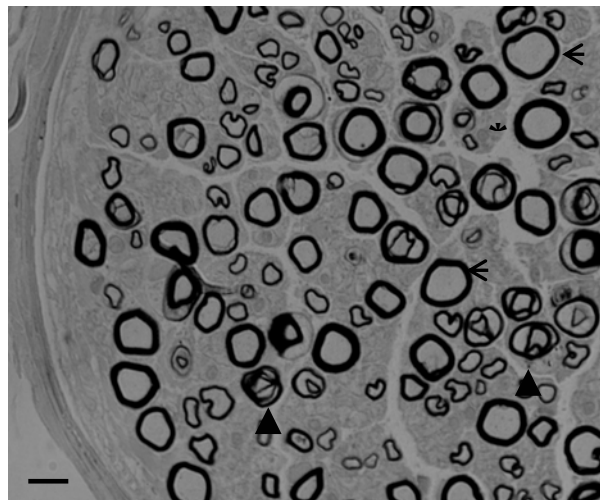


Figura 35. Sección semifina transversal se nervio sural correspondiente al paciente 8. La imagen destaca fibras que poseen vainas de mielina delgadas que parecen no corresponder con el calibre del axón que rodean (flechas). Se evidencian también complejas invasiones mielínicas hacia la región axonal (cabeza de flecha), así como también una gran cantidad de axones hipomielinizados asociados a clusters de regeneración axonal (*).

Tabla 2. Registro clínico y velocidad de conducción nerviosa (VCN) para los pacientes estudiados. Registro realizado por el equipo medico de neurólogos del Hospital de Clínicas, Montevideo-Uruguay

<i>Nº Paciente</i>	<i>Edad</i>	<i>Inicio aprox. de la enfermedad.</i>	<i>Pie Cavo</i>	<i>Diagnóstico Motor</i>	<i>Diagnóstico Sensitivo</i>	<i>VCN(% de reducción)</i>
<i>P1</i>	<i>28</i>	<i>6 años</i>	<i>si</i>	<i>Amiotrofia, hipotonía, paresia distal de los 4 miembros, y arreflexia.</i>	<i>Hipoparestesia distal de los 4 miembros</i>	<i>35</i>
<i>P3</i>	<i>40</i>	<i>10 años</i>	<i>si</i>	<i>Hipotonía, a miotrofia distal, paresia de los 4 miembros y a arreflexia.</i>	<i>Hipoalgésia, hipoparestesia, hipoestesia distal en miembros inferiores</i>	<i>52</i>
<i>P4</i>	<i>17</i>	<i>9 años</i>	<i>si</i>	<i>Hipotonía y paresia distal, reflejos normales</i>	<i>Hipoparestesia en miembros inferiores.</i>	<i>0</i>
<i>P8</i>	<i>18</i>	<i>6 años</i>	<i>si</i>	<i>Normal</i>	<i>Relata parestesia pero examen SP.</i>	<i>0</i>

La tabla 2 detalla los datos clínicos realizados a los pacientes durante el estudio neurológico de rutina. Para cada uno de los casos se aporta la edad del paciente al momento de realizado el estudio, así como también la presencia de pie cavo, el cual es una manifestación fenotípica característica asociada a la enfermedad CMT. Se realizo un estudio a nivel motor y sensitivo a cada uno de los pacientes así como también el examen de velocidad de conducción nerviosa (VCN) el cual se representa en porcentaje de reducción con respecto a valores normales. Los pacientes 4 y 8 no presentaron reducción en VCN. En contraste, el paciente 1 y 3 evidencian VCNs con un índice de reducción respecto del normal de un 35% y 52% respectivamente.

9.4 Análisis inmuno-citoquímico

A continuación se muestran las imágenes obtenidas por microscopia confocal de secciones transversales de nervio sural incluidas en LWR procesadas tratadas con anticuerpos específicos correspondientes a un humano normal como control y los pacientes CMT 4 y 8.

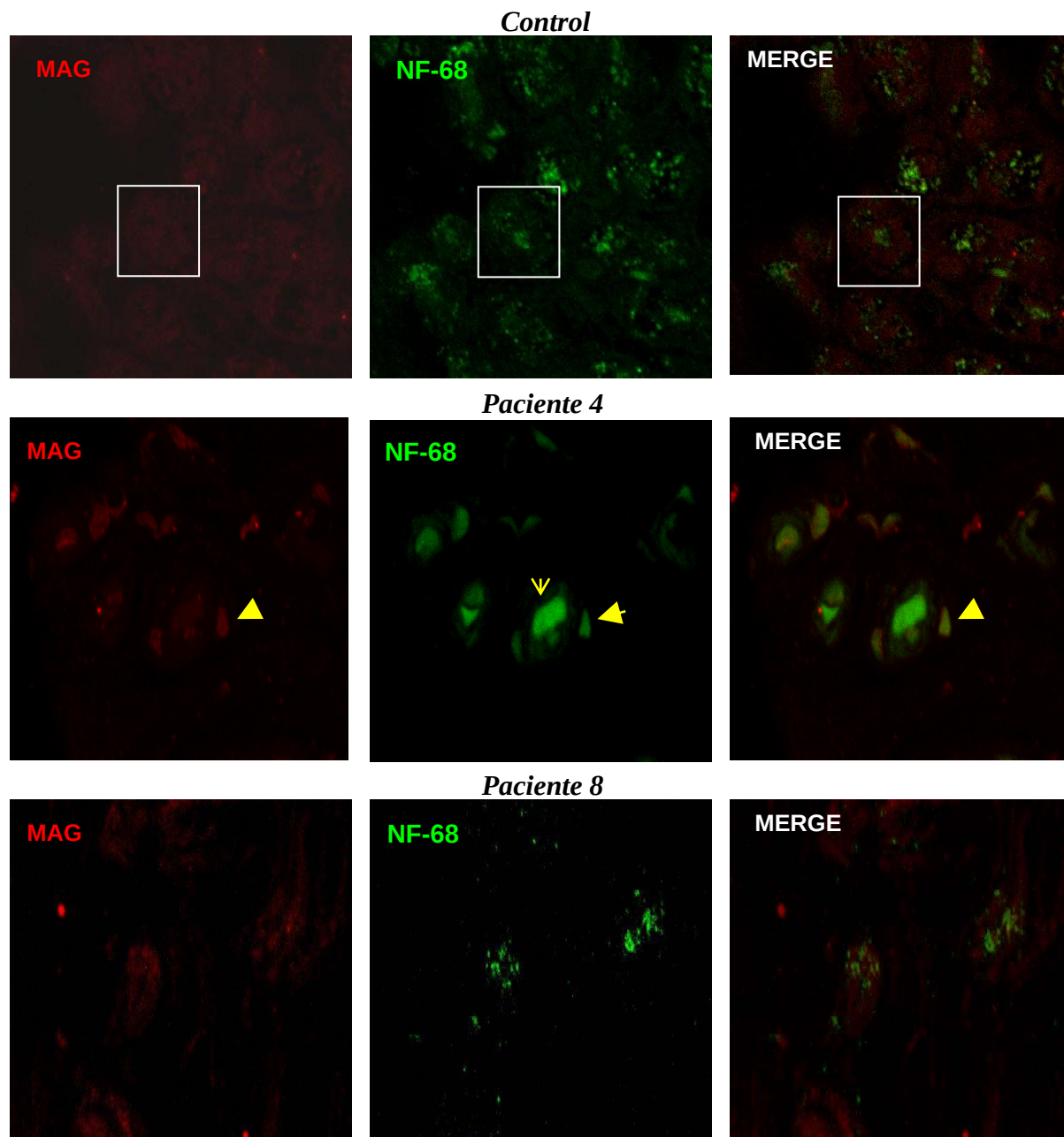


Figura 36. Inmunomicroscopía confocal de secciones transversales de nervio sural correspondiente a un control normal y los pacientes CMT 4 y 8 tratadas con los anticuerpos anti MAG y NF-68. En la muestra *control* (recuadro blanco), la localización de MAG (rojo) es periaxonal, rodeando el axón marcado con NF-68 (verde). *Paciente 4*- las imágenes correspondientes al presentan signos de brotamiento axonal (cabeza de flecha) en torno al axón principal (flecha). Se evidencia regiones de colocalización parcial entre MAG y NF-68 en algunos axones. *Paciente 8*- las imágenes evidencian una leve marcación para NF-68 y una distribución difusa e irregular de MAG en torno a los axones.

Los resultados obtenidos a partir de estos experimentos sugieren que la distribución de los marcadores empleados, tanto MAG como NF-68, es específicamente distinta a la observada en la muestra normal.

La inmunotinción obtenida en fibras sanas, empleadas como control coincide con datos experimentales que muestran una distribución de la proteína glial MAG en las capas de la mielina rodeando al axón estableciendo así un correcto mecanismo de señalización y control bidireccional en ambos tipo celulares. La marcación obtenida para NF-68 en el control se distribuye de manera compacta y estructurada dentro del territorio axonal, rodeada por regiones positivas para MAG (ver recuadro figura 36), de origen glial. Esta disposición molecular es esperable, pues la subunidad menor de los neurofilamentos (NF-68 kDa) es el corazón estructural del heteropolímero, que posee una amplia distribución citoplasmática, fundamental en la organización del citoesqueleto axonal.

Sin embargo, en los pacientes 4 y 8, la marcación con el anticuerpo axonal NF-68, evidenció la presencia de clusters de regeneración y una distribución general no homogénea de la señal axoplásmica (más difusos en el paciente 8). La distribución de MAG, a su vez, parece colocalizar con regiones positivas para NF-68 tanto en el paciente 4 como en el paciente 8. En este último, es notoria la presencia de acumulos o agregados proteicos de NF-68 dentro del axón, claramente rodeados de señales positivas para MAG.

10. Discusión

El análisis histológico y morfométrico de los nervios periféricos es esencial para el diagnóstico patológico en ciertos tipos de neuropatías. Según el presente estudio, se pudo determinar mediante análisis histológico alteraciones patológicas en muestras de tejido nervioso humano y variaciones morfométricas en ciertos parámetros, al comparar las muestras de pacientes CMT contra sus homólogas normales.

10.1 Factor-g, área axonal, grosor mielinico y densidad de fibras por fascículo.

Según el cálculo del factor-g [(área axonal / área axonal + mielina)], los pacientes 4 y 8 presentaron diferencias significativas ($p < 0,005$) al compararlos contra el grupo control. Por el contrario, los pacientes 1 y 3, no presentaron diferencias significativas al ser comparados contra el grupo control según este parámetro. Estos valores obtenidos, ponen de manifiesto una reducción en el grosor mielinico promedio para los pacientes 4 y 8, no así para los pacientes 1 y 3 al someter las muestras al cálculo del factor-g.

En lo que respecta al cálculo del grosor mielinico promedio calculado para cada uno de los pacientes CMT y el control normal, observamos que los pacientes poseen todos ellos una reducción mielinica significativa ($p < 0,01$), cuando se comparan contra el grupo control. La reducción mielinica más notoria la presenta el paciente 8 (Figura 29). Esto último refleja como el factor-g, es un parámetro ambiguo y riesgoso si se considera como único elemento morfométrico. El factor g es menos sensible y aporta menos datos en el análisis morfométrico que el cálculo del grosor mielinico promedio, pues este último deja al descubierto parte de la alteración no revelada por el factor-g. Así el factor-g, puede enmascarar ciertos resultados relevantes para el diagnóstico de la neuropatía y ser menos eficiente al momento de revelar las alteraciones morfométricas subyacentes.

El cálculo del área axonal, sólo arrojó diferencias significativas para los pacientes 1, 3 y 8 ($p < 0,02$), al ser comparados contra el control. En cuanto a los pacientes 1 y 3, estos poseen una pérdida importante de axones de gran calibre y un enriquecimiento en fibras de pequeño calibre. Este parámetro morfométrico se confirma en las alteraciones histológicas observadas en las secciones transversales de nervios correspondientes a estos mismos pacientes. El paciente 4 mostró un área axonal promedio similar al grupo control en tanto que el paciente 8 tuvo un promedio axonal por encima del control y del resto de los pacientes CMT. El factor-g no fue capaz de dar cuenta de esta diferencia, es decir no presenta sensibilidad para variaciones morfométricas axonales evidenciadas a través del diámetro axonal.

El cálculo del grosor mielinico y del área axonal parecen ser más sensibles, precisos y eficaces en el análisis morfométrico de muestras provenientes de pacientes CMT, aunque serán necesarias más evaluaciones que permitirán reafirmarlo.

Los resultados electrofisiológicos concuerdan con un fenotipo CMT1 para los pacientes 1 y 3, y CMT2 para los pacientes 4 y quizás 8, dado que estos últimos no presentan disminución significativa en las velocidades de conducción nerviosa. Por otro lado, debemos tener en cuenta que la velocidad de conducción nerviosa, por sí sola, no define un fenotipo particular de CMT, pero aporta información que junto a otros elementos clínicos, es de relevante importancia en el diagnóstico. Así, fue puesto en evidencia claramente en los pacientes 4 y 8, los cuales poseen un grosor mielinico reducido, axones de

normal y gran calibre respectivamente y una velocidad de conducción nerviosa cercana a la normal, además de no presentar pérdida de axones de gran calibre. Este conjunto de características observadas podría dar como resultado fisiológico velocidades de conducción nerviosa muy cercanas a las normales, que podrían enmascarar la patología. Sin embargo, la contradicción morfológica-funcional subyacente fue develada gracias a los análisis morfométricos alternativos empleados (área axonal y grosor mielínico). Este incremento en el calibre y áreas axonales podría compensar los efectos de reducción mielínica, resultando en un fenotipo electrofisiológico cercano al normal.

Según el cálculo de densidad de fibras mielínicas promedio por fascículo, son claramente los pacientes 3 y 4 los que presentan la menor cantidad de fibras mielínicas. El método de tres ventanas empleado por (Chentanez *et al.*, 2006) en nervios normales se adaptó satisfactoriamente a lo esperado para este estudio, cumplió con las expectativas siendo capaz de detectar variaciones al ser aplicado en secciones histológicas provenientes de pacientes CMT. Así, afirmando estos resultados, los cortes histológicos de las secciones transversales correspondientes a estos mismos pacientes, evidencian claramente regiones o zonas dentro del fascículo en las cuales ha ocurrido una pérdida importante de axones mielínicos.

Los análisis morfométricos empleados para evaluar las alteraciones en estos pacientes, han permitido a develar aspectos importantes que contribuirán a un diagnóstico más certero de cada subtipo dentro del síndrome CMT. Con la ayuda de un número mayor de muestras y de datos, podremos determinar con más exactitud la aplicabilidad de estos parámetros a otros pacientes CMT, o incluso a pacientes con otros tipos de neuropatías, para contribuir al diagnóstico de estas graves afecciones.

10.2 Inmunocitoquímica

Las imágenes obtenidas por microscopía óptica confocal, sugieren que los marcadores empleados, tanto MAG como la cadena liviana de los neurofilamentos NF-68, que forma el corazón o “core” del citoesqueleto de neurofilamentos, se distribuyen de forma distinta en los pacientes 4 y 8 en comparación con el normal. El uso de anticuerpos axonales (NF-68), permitió, con mayor claridad en el caso del paciente 4, detectar la presencia de clusters de regeneración (brotamientos axonales), acompañados de regiones en las cuales MAG parece invadir el territorio axonal. Es probable que el desarreglo estructural producto de la enfermedad conlleve a que esta proteína glial sea transportada hacia el axón, pero desconocemos con exactitud el rol o la función que esta molécula podría tener a este nivel. De todas formas el esclarecimiento de los dominios celulares involucrados deberá confirmarse obligatoriamente a nivel ultraestructural. Por otro lado, se sabe que MAG se encuentra involucrada en el desarrollo y mantenimiento de las fibras mielínicas, así como promoviendo el correcto ensamblaje de las vainas más adaxonales de las capas de mielina en contacto con el axón. Además, en el SNP, MAG promueve el mantenimiento y regulación del calibre axonal, a través de un mecanismo de transducción de señales, desde la glía, que daría como resultado la fosforilación de las cadenas medianas y pesadas de los neurofilamentos. Este mecanismo de regulación parece involucrar ciertas quinasas de la familia Cdk5 y ERK (1 y 2) axonales, reguladas por señales provenientes de las células de Schwann. Una posible explicación a esta particular distribución de MAG colocalizando con los neurofilamentos, radica en el control del calibre axonal que ejerce, ya que este podría ser necesario en las proyecciones en crecimiento. Los brotamientos axonales parecen responder, al menos en parte, a alteraciones en las células de Schwann, tanto en las mielinopatías (dilatación en “bulbos de cebollas”) como en las axonopatías (reducción del espesor mielínico), provocando un mismo resultado: los brotamientos axonales. Así se pone en evidencia un

mecanismo común en ambos tipos de CMT, que revela la importancia de la relación estructural y funcional existente entre células de Schwann y axones en el SNP. El rol que MAG quizá establezca en estas regiones o dominios mielínicos, sería regular el calibre axonal de los propios brotamientos axonales, contribuyendo a compensar el desarreglo y controlando el crecimiento y supervivencia celular en respuesta al daño producto de la enfermedad. Serán necesarios nuevos experimentos para confirmar el papel de MAG, su distribución exacta en los dominios celulares involucrados, así como también su función en este tipo de neuropatías.

Las imágenes presentadas del paciente 8 revelan como el citoesqueleto axonal de neurofilamentos se encuentra alterado. La organización normal del complejo polimérico que forma el eje de la subunidad menor de los neurofilamentos pequeños (NF-68 kDa), se encuentra desestructurado presentando acumulos o gránulos que forman agregados discretos dentro del axón. Dichos acumulos de neurofilamentos evidencian quizás alteraciones del citoesqueleto axonal producto de una deficiencia neuronal. Serán necesarios los análisis genéticos correspondientes en este paciente para determinar si esta singular distribución de neurofilamentos se corresponde con mutaciones en su gen o en otros genes correspondientes a proteínas axonales, generando un fenotipo particular que se corresponda con una axonopatía.

Este tipo de análisis, retrospectivo, en el cual tenemos idea de lo que ocurre en una estrecha ventana de tiempo, nos provee de una imagen instantánea del proceso patológico, en el que conviven la degeneración y la regeneración axonal y mielínica. Dadas las características de este tipo de neuropatía, en la cual, en la mayoría de los casos, los ritmos a los que opera son diversos, según se considere un contexto uní o multifactorial, es difícil un diagnóstico en base a un único parámetro (datos clínicos, análisis morfométrico, reducción de la velocidad de conducción nerviosa, factor g, análisis moleculares de expresión, etc.). Por esta razón, creemos que es el estudio integrado de las diferentes variables aquí analizadas y el de otras que eventualmente puedan agregarse, lo que contribuirá a un diagnóstico más ajustado para la comprensión de la patología. El análisis genotípico de estos pacientes permitirá, a corto plazo, un estudio más profundo de la relación genotipo/fenotipo.

Por otro lado, aunque clásicamente se ha asociado a cada CMT la presencia de una única mutación, estudios de expresión génica más complejos (microarrays, por ejemplo) podrían enfocar con mayor nitidez este aspecto y quizás revelar interacciones entre grupos de genes, efectos oligo o poligénicos, responsables del fenotipo neuropatológico resultante.

10.3 Conclusiones

- El factor-g es un parámetro apropiado para el diagnóstico histológico-morfométrico de algunos subtipos de neuropatías hereditarias periféricas CMT, pero carece de aporte informativo al ser aplicado en determinados subtipos.
- Otros parámetros morfométricos utilizados en el presente trabajo fueron más eficientes en revelar las alteraciones subyacentes en algunos pacientes. En particular, el paciente 8, cuyo diagnóstico definitivo era controversial, mostró en el análisis histológico-morfométrico e inmunocitoquímico, una alteración en el grosor mielínico y en el área axonal, que lo diferenció claramente del control.
- El Método de Tres Ventanas pone en evidencia alteraciones en la organización general del conjunto de las fibras, que constituyen los fascículos, un método antes no empleado en pacientes CMT. Esta visión panorámica aporta elementos de comprensión morfométrica, estructural y funcional del desarrollo de la patología a nivel del nervio en su conjunto.

- La integración de distintas herramientas y enfoques científicos (tanto moleculares como genéticos, fisiológicos, histológicos, morfométricos, inmunocitoquímicos, básicos y clínicos), posibilitarán una mejor comprensión de los procesos patológicos en este tipo de neuropatías.

Es importante mencionar que el presente trabajo constituye la conjunción y el aporte de enfoques básicos y aplicados, que afortunadamente revelaron datos más que interesantes que contribuyen al estudio de este tipo de afecciones.

11. Bibliografía

A

Agthong S, Chentanez V, Koonam J, Kaewsema A. Comparable morphometric data of pathological nerve obtained using the three-window sampling method and total fiber quantification. *Microsc Res Tech.* 2008 Aug;71(8):585-7.

Auer RN. Automated nerve fibre size and myelin sheath measurement using microcomputer-based digital image analysis: theory, method and results. *J Neurosci Methods.* 1994 Mar;51(2):229-38.

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

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

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

Aruga J, Okano H, Mikoshiba K. Identification of the new isoforms of mouse myelin basic protein: the existence of exon 5a. *J Neurochem.* 1991 Apr;56(4):1222-6.

B

Berger BL, Gupta R. Demyelination secondary to chronic nerve compression injury alters Schmidt-Lanterman incisures. *J Anat.* 2006 Jul;209(1):111-8.

Blakemore, W. F., and Smith, K. J. (1983). Node-like axonal specializations along demyelinated

central nerve fibers: Ultrastructural observations. *Acta Neuropathol* 60, 291–296.

Bhat MA, Rios JC, Lu Y, Garcia-Fresco GP, Ching W, St Martin M, Li J, Einheber S, Chesler M, Rosenbluth J, Salzer JL, Bellen HJ. Axon-glia interactions and the domain organization of myelinated axons requires neurexin IV/Caspr/Paranodin. *Neuron.* 2001 May;30(2):369-83.

Boyle ME, Berglund EO, Murai KK, Weber L, Peles E, Ranscht B. Contactin orchestrates assembly of the septate-like junctions at the paranode in myelinated peripheral nerve. *Neuron.* 2001 May;30(2):385-97.

Berghs S, Aggujaro D, Dirx R Jr, Maksimova E, Stabach P, Hermel JM, Zhang JP, Philbrick W, Slepnev V, Ort T, Solimena M. betaIV spectrin, a new spectrin localized at axon initial segments and nodes of ranvier in the central and peripheral nervous system. *J Cell Biol.* 2000 Nov 27;151(5):985-1002.

Bouley M, Tian MZ, Paisley K, Shen YC, Malhotra JD, Hortsch M. The L1-type cell adhesion molecule neuroglian influences the stability of neural ankyrin in the Drosophila embryo but not its axonal localization. *J Neurosci.* 2000 Jun 15; 20(12):4515-23.

Berglund EO, Murai KK, Fredette B, Sekerková G, Marturano B, Weber L, Mugnaini E, Ranscht B. Ataxia and abnormal cerebellar microorganization in mice with ablated contactin gene expression. *Neuron.* 1999 Nov;24(3):739-50.

Boiko T, Rasband MN, Levinson SR, Caldwell JH, Mandel G, Trimmer JS, Matthews G. Compact myelin dictates the differential targeting of two

sodium channel isoforms in the same axon. *Neuron*. 2001 Apr;30(1):91-104.

BUNGE MB, BUNGE RP, PAPPAS GD. Electron microscopic demonstration of connections between glia and myelin sheaths in the developing mammalian central nervous system. *J Cell Biol*. 1962 Feb;12:448-53.

Boerkoel CF, Takashima H, Stankiewicz P, Garcia CA, Leber SM, Rhee-Morris L, Lupski JR (2000). Periaxin mutations cause recessive Dejerine-Sottas neuropathy. *Am J Hum Genet* 68: 325–333.

Britsch, S. The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev*. 15, 66–78 (2001).

Bunge MB (1993). Schwann Cell Regulation of Extracellular Matrix Biosynthesis and Assembly. In: *Peripheral Neuropathy*. Dyck PJ, Thomas PK, Low PA, Poduslo JF (Eds). W.B. Saunders, Philadelphia, Vol. 1, pp 229–316.

Bruce Alberts. Molecular biology of the cell tercera edición, 2004.

C

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

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

Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*. 2000 Apr;26(1):13-25.

Campagnoni AT, Skoff RP. The pathobiology of myelin mutants reveal novel biological functions of the MBP and PLP genes. *Brain Pathol*. 2001 Jan;11(1):74-91.

Chentanez V, Cha-oumphol P, Kaewsema A, Agthong S, Huanmanop T. Morphometric data of normal sural nerve in Thai adults. *J Med Assoc Thai*. 2006 May;89(5):670-4.

Chentanez V, Cha-oumphol P, Kaewsema A, Agthong S, Huanmanop T. Accuracy of the three-window sampling method in morphometric analysis of human sural nerve. *J Neurosci Methods*. 2006 Oct 15;157(1):154-7. Epub 2006 May 15.

Cornbrooks CJ, Carey DJ, McDonald JA, Timpl R, Bunge RP. In vivo and in vitro observations on laminin production by Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 Jun;80(12):3850-4.

Carruthers A, Carey EM. UDP-galactose:ceramide galactosyl transferase of isolated oligodendroglia. *J Neurochem*. 1983 Jul;41(1):22-9.

Carnow TB, Carson JH, Brostoff SW, Hogan EL. Myelin basic protein gene expression in quaking, jimpy, and myelin synthesis-deficient mice. *Dev Biol*. 1984 Nov;106(1):38-44.

Cole JS, Messing A, Trojanowski JQ, Lee VM. Modulation of axon diameter and neurofilaments by hypomyelinating Schwann cells in transgenic mice. *J Neurosci*. 1994 Nov;14(11 Pt 2):6956-66.

Comi G, Ciafaloni E, de Silva HAR, Prella A, Bardoni A, Rigoletto C, Robotti M, Bresolin N, Moggio M, Fortunato F, Ciscato P, Turconi A, Roses AD, Scarlato G (1995). A G¹→A transversion at the 5 splice site of intron 69 of the dystrophin gene causing the absence of peripheral nerve Dp116 and severe clinical involvement in a DMD patient. *Hum Mol Gen* 4: 2171–2174..

D

Dashiell SM, Tanner SL, Pant HC, Quarles RH. Myelin-associated glycoprotein modulates expression and phosphorylation of neuronal cytoskeletal elements and their associated kinases. *J Neurochem.* 2002 Jun;81(6):1263-72.

Dore JJ, Crotty KL, Birren SJ. Inhibition of glial maturation by bone morphogenetic protein 2 in a neural crest-derived cell line. *Dev Neurosci.* 2005 Jan-Feb;27(1):37-48.

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

deWaegh SM, Lee VM, Brady ST. Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. *Cell.* 1992 Feb 7;68(3):451-63.

E

Einheber S, Hannocks MJ, Metz CN, Rifkin DB, Salzer JL. Transforming growth factor-beta 1 regulates axon/Schwann cell interactions. *J Cell Biol.* 1995 Apr;129(2):443-58.

Erb M, Flueck B, Kern F, Erne B, Steck AJ, Schaeren-Wiemers N. Unraveling the differential expression of the two isoforms of myelin-associated glycoprotein in a mouse expressing GFP-tagged S-MAG specifically regulated and targeted into the different myelin compartments. *Mol Cell Neurosci.* 2006 Apr;31(4):613-27. Epub 2006 Jan 25.

Einheber S, Milner T, Giancotti F, Salzer J (1993). Axonal regulation of Schwann cell integrin expression suggests a role for $\gamma 6^L4$ in myelination. *J Cell Biol* 123:625–638..

F

Fraher JP. A quantitative study of anterior root fibres during early myelination. II. Longitudinal variation in sheath thickness and axon circumference. *J Anat.* 1973 Sep;115(Pt 3):421-44.

Feng JM, Fernandes AO, Campagnoni CW, Hu YH, Campagnoni AT. The golli-myelin basic protein negatively regulates signal transduction in T lymphocytes. *J Neuroimmunol.* 2004 Jul;152(1-2):57-66.

Frei R, Mötzing S, Kinkelin I, Schachner M, Koltzenburg M, Martini R. Loss of distal axons and sensory Merkel cells and features indicative of muscle denervation in hindlimbs of P0-deficient mice. *J Neurosci.* 1999 Jul 15;19(14):6058-67.

FERNANDEZ-MORAN H, FINEAN JB. Electron microscope and low-angle x-ray diffraction studies of the nerve myelin sheath. *J Biophys Biochem Cytol.* 1957 Sep 25;3(5):725-48.

Feltri ML, Scherer SS, Nemni R, Kamholz J, Vogelbacker H, Oronzi-Scott M, Canal N, Quaranta V, Wrabetz L (1994). $\gamma 4$ integrin expression in myelinating Schwann cells is axonally polarized, developmentally-regulated, and axonally-dependent. *Development* 120:1287–1301.

G

Germanà G, Muglia U, Santoro M, Abbate F, Laurà R, Gugliotta MA, Vita G, Ciriaco E. Morphometric analysis of sciatic nerve and its main branches in the rabbit. *Biol Struct Morphog.* 1992;4(1):11-5.

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

Garrido JJ, Giraud P, Carlier E, Fernandes F, Moussif A, Fache MP, Debanne D, Dargent B. A targeting motif involved in sodium channel

clustering at the axonal initial segment. *Science*. 2003 Jun 27;300(5628):2091-4.

Greenfield S, Brostoff S, Eylar EH, Morell P. Protein composition of myelin of the peripheral nervous system. *J Neurochem*. 1973 Apr;20(4):1207-16.

Geren BB, Schmitt FO. THE STRUCTURE OF THE SCHWANN CELL AND ITS RELATION TO THE AXON IN CERTAIN INVERTEBRATE NERVE FIBERS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1954 Sep;40(9):863-70.

Griffin CA, Kalinyak JE, Sechi LA, Don BR, Tavangar K, Kraemer FB, Hoffman AR, Schambelan MJ Am Soc Nephrol. The renin-angiotensin system in streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat *J Am Soc Nephrol*. 1993 Dec;4(6):1337-45.

Guilbot A, Williams A, Ravise N, Verny C, Brice A, Sherman DL, Brophy PJ, LeGuern E, Delague V, Bareil C, Megarbane A, Claustres M (2001). A mutation in periaxin is responsible for CMT4F, an autosomal recessive form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Mol Genet* 10:415–421.

H
Hall SM, Williams PL. Studies on the "incisures" of Schmidt and Lanterman. *J Cell Sci*. 1970 May;6(3):767-91.

Hall SM, Williams PL. The distribution of electron-dense tracers in peripheral nerve fibres. *J Cell Sci*. 1971 Mar;8(2):541-55.

Hisanaga S, Hirokawa N. Structure of the peripheral domains of neurofilaments revealed by low angle rotary shadowing. *J Mol Biol*. 1988 Jul 20;202(2):297-305.

I
Isom LL. The role of sodium channels in cell adhesion. *Front Biosci*. 2002 Jan 1;7:12-23.

J
Julien JP, Côté F, Beaudet L, Sidky M, Flavell D, Grosveld F, Mushynski W. Sequence and structure of the mouse gene coding for the largest neurofilament subunit. *Gene*. 1988 Sep 7;68(2):307-14.

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

John H. Martin, *Neuroanatomía Segunda Edición.*

Jessen KR, Mirsky R. Schwann cells: early lineage, regulation of proliferation and control of myelin formation. *Curr Opin Neurobiol*. 1992 Oct;2(5):575-81.

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

Kirschner DA, Hollingshead CJ. Processing for electron microscopy alters membrane structure and packing in myelin. *J Ultrastruct Res*. 1980 Nov;73(2):211-32.

Kirschner DA, Sidman RL. X-ray diffraction study of myelin structure in immature and mutant mice. *Biochim Biophys Acta*. 1976 Sep 21;448(1):73-87.

Kandel. *Principles of neural science.*

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

L
Landon, D. N., and Hall, S. (1976). The myelinated nerve fiber. In "The Peripheral

Nerve" (D. N. Landon, ed.), pp. 1–105. Chapman and Hall, London.

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

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

Ledeen RW, Golly F, Haley JE. Axon-myelin transfer of phospholipids and phospholipid precursors. Labeling of myelin phosphoinositides through axonal transport. *Mol Neurobiol.* 1992 Summer-Fall;6(2-3):179-90.

Liem RK, Yen SH, Salomon GD, Shelanski ML. Intermediate filaments in nervous tissues. *J Cell Biol.* 1978 Dec;79(3):637-45.

M

Mugnaini E, Osen KK, Schnapp B, Friedrich VL Jr. Distribution of Schwann cell cytoplasm and plasmalemmal vesicles (caveolae) in peripheral myelin sheaths. An electron microscopic study with thin sections and freeze-fracturing. *J Neurocytol.* 1977 Dec;6(6):647-68.

Mezin P, Tenaud C, Bosson JL, Stoebner P. Morphometric analysis of the peripheral nerve: advantages of the semi-automated interactive method. *J Neurosci Methods.* 1994 Mar;51(2):163-9.

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

Melendez-Vasquez CV, Rios JC, Zanazzi G, Lambert S, Bretscher A, Salzer JL. Nodes of

Ranvier form in association with ezrin-radixin-moesin (ERM)-positive Schwann cell processes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jan 30;98(3):1235-40.

McDonald WI, Ohlrich GD. Quantitative anatomical measurements on single isolated fibres from the cat spinal cord. *J Anat.* 1971 Nov;110(Pt 2):191-202.

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

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

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

Mason JL, Toews A, Hostettler JD, Morell P, Suzuki K, Goldman JE, Matsushima GK. Oligodendrocytes and progenitors become progressively depleted within chronically demyelinated lesions. *Am J Pathol.* 2004 May;164(5):1673-82.

Martini R, Mohajeri MH, Kasper S, Giese KP, Schachner M. Mice doubly deficient in the genes for P0 and myelin basic protein show that both proteins contribute to the formation of the major dense line in peripheral nerve myelin. *J Neurosci.* 1995 Jun;15(6):4488-95.

Mukhopadhyay R, Kumar S, Hoh JH. Molecular mechanisms for organizing the neuronal cytoskeleton. *Bioessays.* 2004 Sep;26(9):1017-25.

Mezin P, Tenaud C, Bosson JL, Stoebner P. Morphometric analysis of the peripheral nerve: advantages of the semi-automated interactive

method. J Neurosci Methods. 1994 Mar;51(2):163-9.

Morrison, S. J. Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. Cell 101, 499–510 (2000). Shows that in vitro Notch inhibits neurogenesis and promotes gliogenesis in cells isolated from embryonic rat peripheral nerves.

Mirsky R, Jessen KR. Schwann cell development, differentiation and myelination. Curr Opin Neurobiol. 1996 Feb;6(1):89-96.

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

Martin J H. *Neuroanatomía segunda edición. 2004.*

Matsumura K, Yamada H, Saito F, Sunada Y, Shimizu T (1997). Peripheral nerve involvement in merosin-deficient congenital muscular dystrophy and dy mouse. Neuromuscular Disord 7:7–12.

Mikol DD, Hong HL, Cheng HL, Feldman EL. Caveolin-1 expression in Schwann cells. Glia. 1999 Jul;27(1):39-52.

N

Nobbio L, Mancardi G, Grandis M, Levi G, Suter U, Nave KA, Windebank AJ, Abbruzzese M, Schenone A. PMP22 transgenic dorsal root ganglia cultures show myelin abnormalities similar to those of human CMT1A. Ann Neurol. 2001 Jul;50(1):47-55.

Nielsen JA, Berndt JA, Hudson LD, Armstrong RC. Myelin transcription factor 1 (Myt1) modulates the proliferation and differentiation of oligodendrocyte lineage cells. Mol Cell Neurosci. 2004 Jan;25(1):111-23.

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

P

Peters, A., Palay, S. L., and Webster, H. d. “The Fine Structure of the Nervous System: Neurons and their Supporting Cells.” Oxford University Press, New York 1991.

PINNER B, DAVISON JF, CAMPBELL JB. PHOSPHATASE IN PERIPHERAL NERVES. Science. 1964 Aug 28;145:936-8. ALKALINE.

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

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

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

Pedraza L, Huang JK, Colman DR. Organizing principles of the axoglial apparatus. Neuron. 2001 May;30(2):335-44.

Patel PI, Roa BB, Welcher AA, Schoener-Scott R, Trask BJ, Pentao L, Snipes GJ, Garcia CA, Francke U, Shooter EM, Lupski JR, Suter U. The gene for the peripheral myelin protein PMP-22 is a candidate for Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. Nat Genet. 1992 Jun;1(3):159-65.

Q

Quarles RH. Myelin Formation, Structure and Biochemistry. Capitulo 4. 2006.

R

Romero E, Cuisenaire O, Denef JF, Delbeke J, Macq B, Veraart C. Automatic morphometry of nerve histological sections. *J Neurosci Methods*. 2000 Apr 15;97(2):111-22.

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

ROBERTSON JD. The unit membrane of cells and mechanisms of myelin formation. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*. 1962;40:94-158.

ROBERTSON JD. The ultrastructure of Schmidt-Lanterman clefts and related shearing defects of the myelin sheath. *J Biophys Biochem Cytol*. 1958 Jan 25;4(1):39-46.

Romero E, Cuisenaire O, Denef JF, Delbeke J, Macq B, Veraart C. Automatic morphometry of nerve histological sections. *J Neurosci Methods*. 2000 Apr 15;97(2):111-22.

Rosenbluth J. Intramembranous particle distribution at the node of Ranvier and adjacent axolemma in myelinated axons of the frog brain. *J Neurocytol*. 1976 Dec;5(6):731-45.

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

Ratcliffe CF, Westenbroek RE, Curtis R, Catterall WA. Sodium channel $\beta 1$ and $\beta 3$ subunits associate with neurofascin through their extracellular immunoglobulin-like domain. *J Cell Biol*. 2001 Jul 23;154(2):427-34.

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

Rambukkana A (2001). Molecular basis for the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Curr Opin Microbiol* 4:21–27.

S

Sancho S, Magyar JP, Aguzzi A, Suter U. Distal axonopathy in peripheral nerves of PMP22-mutant mice. *Brain*. 1999 Aug;122 (Pt 8):1563-77.

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

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

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

SOTNIKOV OS. DATA ON THE STATICS AND DYNAMICS OF STRUCTURE OF THE SCHMIDT-LANTERMANN INCISURES. *Arkh Anat Gistol Embriol*. 1965 Mar;48:31-42.

Singer M, Salpeter MM. Transport of tritium-labelled L-histidine through the Schwann and myelin sheaths into the axon of peripheral nerves. *Nature*. 1966 Jun 18;210(5042):1225-7.

Singer M, Green MR. Autoradiographic studies of uridine incorporation in peripheral nerve of the

newt, Triturus. *J Morphol.* 1968 Mar;124(3):321-44.

Smart JL, McCammon JA. *Biophys J.* 1998 Oct;75(4):1679-88. Analysis of synaptic transmission in the neuromuscular junction using a continuum finite element model.

Stolinski C, Breathnach AS. Freeze-fracture replication and surface sublimation of frozen collagen fibrils. *J Cell Sci.* 1977 Feb;23:325-34.

Stolinski C, Breathnach AS, Martin B, Thomas PK, King RH, Gabriel G. Associated particle aggregates in juxtaparanodal axolemma and adaxonal Schwann cell membrane of rat peripheral nerve. *J Neurocytol.* 1981 Aug;10(4):679-91.

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

Sedzik J, Toews AD, Blaurock AE, Morell P. Resistance to disruption of multilamellar fragments of central nervous system myelin. *J Neurochem.* 1984 Nov;43(5):1415-20.

Shneidman PS, Carden MJ, Lees JF, Lazzarini RA. The structure of the largest murine neurofilament protein (NF-H) as revealed by cDNA and genomic sequences *Brain Res.* 1988 Nov;464(3):217-31.

Stolt, C.C. et al. (2003). The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. *Genes Dev.* 17, 1677–1689

Shibuya Y, Mizoguchi A, Takeichi M, Shimada K, Ide C. Localization of N-cadherin in the normal and regenerating nerve fibers of the chicken

peripheral nervous system. *Neuroscience.* 1995 Jul;67(1):253-61.

Shorer Z, Philpot J, Muntoni F, Sewry C, Dubowitz V. Demyelinating peripheral neuropathy in merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *J Child Neurol.* 1995 Nov;10(6):472-5.

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

T

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

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

Traka M, Dupree JL, Popko B, Karagogeos D. The neuronal adhesion protein TAG-1 is expressed by Schwann cells and oligodendrocytes and is localized to the juxtaparanodal region of myelinated fibers. *J Neurosci.* 2002 Apr 15;22(8):3016-24.

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

V

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

Vonasek E, Mateu L, Luzzati V, Marquez G, Vargas R, Céspedes G, Cotúa M, Borges J. A reversible abnormal form of myelin: an X-ray scattering study of human sural and rat sciatic nerves. *Eur Biophys J.* 2001;30(1):11-6

Vita G, Muglia U, Santoro M, Abbate F, Laurà R, Gugliotta MA, Germanà G, Ciriaco. Morphometric analysis of sciatic nerve and its main branches in the rabbit. *EBiol Struct Morphog.* 1992;4(1):11-5.

W

Woodhoo, A., Dean, C. H., Droggiti, A., Mirsky, R. & Jessen, K. R. The trunk neural crest and its early glial derivatives: a study of survival responses, developmental schedules and autocrine mechanisms. *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 30–41 (2004).

X

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

Y

Yu FH, Westenbroek RE, Silos-Santiago I, McCormick KA, Lawson D, Ge P, Ferriera H, Lilly J, DiStefano PS, Catterall WA, Scheuer T, Curtis R. Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2. *J Neurosci.* 2003 Aug 20;23(20):7577-85.

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

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

Z

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

A n e x o 1

Gliogénesis en el Sistema Nervioso

A continuación detallamos brevemente los principales factores que participan en la formación de células gliales y su rol en el proceso de mielinización.

12. Introducción.

Antes de comenzar la gliogénesis, las células del neuroepitelio en la medula espinal del ratón comienzan a expresar Sox9 y Sox8 en presencia de las proteínas SoxB1 (Stolt, C.C. *et al.*, 2003).

En comparación con Sox9, Sox8 es expresada a bajos niveles y con un breve retardo temporal, estas dos proteínas, Sox8 y Sox9 conforman junto con Sox 10 el grupo de proteínas SoxE dentro de los vertebrados. En contraste con las proteínas SoxB1, la presencia de las proteínas del grupo SoxE resulta no esencial para la supervivencia o la autorenovación de los precursores neuroepiteliales, esto indica que la redundancia funcional entre proteínas Sox poco relacionadas entre los distintos grupos es probablemente limitada. La delección de Sox9 interfiere con el desarrollo de oligodendrocitos y astrocitos. Además la ausencia de Sox9 no solo disminuye el número de células macrogliales sino que además incrementa la generación de varios subtipos neuronales. Sox9 y Sox8 provocan cambios en las células progenitoras neuroepiteliales en la medula espinal estimulando a estas a diferenciarse en células macrogliales. De esta forma, Sox9 es el primer ejemplo de un factor de transcripción involucrado en alterar el potencial de las células madre del sistema nervioso central, promoviendo el desarrollo de fenotipos gliogénicos, a partir de fenotipos neurogénicos.

Factores implicados en el control temprano de la gliogénesis y mielinogénesis en el SNP

12.1 Sox10

Durante el desarrollo del SNP los factores de transcripción Soxs también juegan un papel determinante. El factor de transcripción Sox10 controla la expresión de una gran cantidad de genes involucrados en la síntesis de mielina tales como los que codifican la proteína básica de mielina (MBP) y otras proteínas proteolipídicas. En el caso de MBP, la regulación parece tener un rol netamente directo debido a la proximidad del promotor de dicha proteína al sitio de unión y activación de Sox10.

Los factores de transcripción SoxB1 no son esenciales en los estadios más tempranos del desarrollo del sistema nervioso periférico en las células de la cresta neural, y adquieren roles poco significativos en etapas posteriores. En tanto Sox2, es expresado de manera transitoria en el linaje de las células de Schwann en los estadios precursores y en las células de Schwann inmaduras, previniendo la diferenciación terminal.

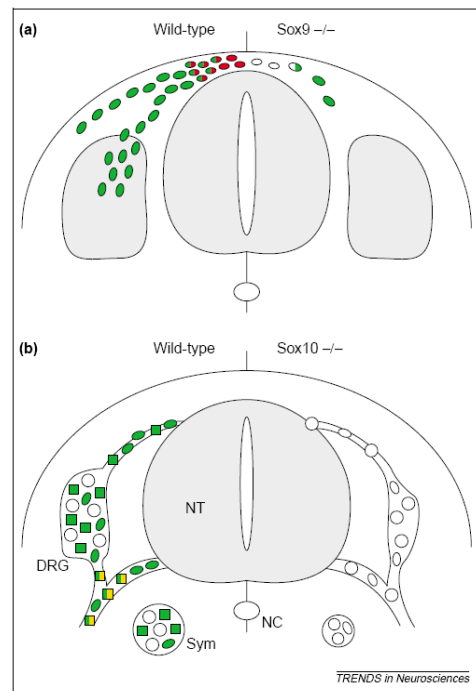
Dentro de las proteínas del grupo SoxE, Sox9 comienza a expresarse antes que Sox10 en las células progenitoras de la cresta neural (Figura 2). La expresión de Sox9 es transitoria en la mayoría de las regiones de la cresta neural, y la expresión de Sox10 continua en las células madre de la cresta neural en migración, donde asegura la

supervivencia de estas, manteniendo la pluripotencialidad y suprimiendo la diferenciación neuronal.

Cuando las células de la cresta neural han alcanzado su destino final luego de la migración durante el desarrollo del sistema nervioso periférico, Sox10 puede adquirir dos estados posibles. En células determinadas a adquirir un fenotipo neuronal, Sox10 no es expresado, el gen se encuentra reprimido luego de una fase de transición en la cual se co-expresan genes pro-neurales. En células destinadas a transformarse en glías, Sox10 continua expresándose independientemente de si el desarrollo de estas tenga como finalidad los ganglios (en forma de células satélite), los nervios periféricos (como células de Schwann) o en el plexo intestinal (como glia entérica), (Figura 2b).

Figura2- Proteínas Sox durante el desarrollo del SNP.

(a) En las células premigratorias de la cresta neural del tronco (9.5 días de embriogenesis en ratón), Sox9 (rojo) es expresado antes que Sox10 (verde). Las células madre de la cresta neural (elipses), migran en forma ventral y dorsal pero no expresan Sox9, pero continúan expresando Sox10. En ausencia de Sox9, la mayoría de las células premigratorias de la cresta neural sufre apoptosis. (b) Una vez que las células de la cresta neural de la región ventral alcanzan su destino (12,5 días de embriogenesis en ratón), estas se convierten en neuronas (círculos), las cuales ya no expresan Sox10. Las células precursoras de Schwann a lo largo de los nervios expresan además Sox2 (amarillo). La región derecha de la figura muestra como la ausencia de Sox10 conduce a la no formación de glia.



A modo de resumen, Sox10 es requerido para el desarrollo y especificación de todas las células gliales del sistema nervioso periférico, esto queda demostrado cuando ocurre una completa ausencia de este factor en ratones mutantes (Figura 2b).

Bajo el control de Sox10, se encuentra el gen Krox-20, el cual regula muchos aspectos de la mielinización de las células de Schwann. Además, un diverso número de genes mielínicos del sistema nervioso periférico tales como Conexina-32 y P0 se encuentran directamente inducidos por Sox10. Experimentos en los cuales se realizan mutaciones en el sitio de unión de Sox10 al promotor del gen que codifica para Conexina-32, tiene como efecto una neuropatía periférica conocida como Charcot-Marie-Tooth de tipo 1.

Una función importante llevada a cabo por Sox10, es mantener a las células gliales en desarrollo aptas para responder al factor Neuregulin-1 (NRG1). Las proteínas Sox se encuentran involucradas en numerosos procesos, incluidos el mantenimiento de la pluripotencialidad de las células madre, en eventos específicos como la progresión y la diferenciación terminal de ciertos linajes celulares.

Este grupo de proteínas son factores reguladores de extrema flexibilidad que funcionan en un contexto determinado, interaccionando con otros factores transcripcionales (Brn-2 con SoxB1 en el sistema nervioso central y Krox-20 junto con Sox10 en las células de Schwann en diferenciación). Existen otros grupos de proteínas Sox cuyo rol durante el desarrollo del sistema nervioso no ha sido aun aclarado.

12.2 Neuroregulina 1 (NRG1) y receptores ErbB.

Esta molécula posee una excepcional variedad de funciones dentro de la biología celular de las células de Schwann, estando vinculada a procesos de generación, proliferación y supervivencia. Se encuentra expresada dentro de un linaje específico en las células de la cresta neural y demuestra ser esencial para la supervivencia de las células precursoras de Schwann (SCPs).

En nervios postnatales en desarrollo, NRG1 actúa como regulador positivo controlando el grosor de la mielina. Dentro de las funciones atribuibles a NRG1, se incluye el desarrollo de placas motoras, migración de interneuronas, sinaptogénesis y plasticidad sináptica en el SNC. Muchas de las neuronas que expresan NRG1, además expresan transcritos para NRG2 y NRG3, dos factores estructuralmente relacionados con el dominio de tipo-EGF de señalización, pero se desconoce aun su función.

Existen más de 15 isoformas proteicas de NRG1, los genes que codifican esta familia proteínas mapean en el cromosoma humano 8p22, y en el cromosoma 8A3 en el ratón. En la (Figura 9), se esquematizan las estructuras de las isoformas principales dentro del sistema nervioso. Para cada una de estas isoformas existen variantes generadas por splicing alternativo las cuales carecen del dominio transmembrana y son secretadas.

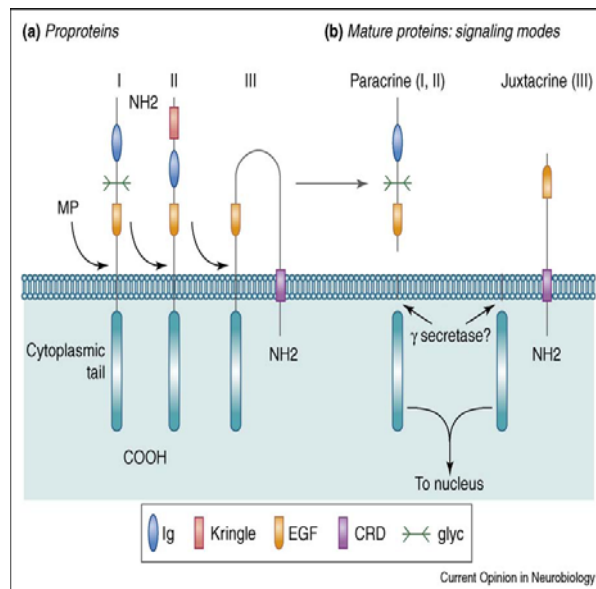


Figura 3. Disposición en la membrana y señalización de las isoformas NRG1. (a) Tipos I y II son sintetizadas como moléculas transmembrana de pasaje único, el tipo III posee dos dominios transmembrana. (b) Representación tras el clivaje con metaloproteinasas (MP), tipos I y II señales paracrinas, tipo III permanece unida a la membrana por el dominio rico en cisteínas CRD (cysteine-rich-domain por sus siglas en ingles), desencadena señal juxtacrina. Este clivaje es desencadenado por neurotrofinas liberadas por las células de Schwann. El dominio citoplasmático luego del clivaje estimulado por la unión del receptor ErbB a NRG1, desencadena la translocación hacia el núcleo. *Imagen tomada de (Nave and Salzer, Current Opinion in Neurobiology 2006).*

El dominio perteneciente al factor de crecimiento epidérmico (EGF), es encontrado en todas las isoformas biológicamente activas de NGF1 y es necesario y suficiente para la activación del receptor de tipo kinasa ErbB. Durante el desarrollo embrionario en ratones, la ausencia de NRG1 o de sus receptores (Erb2, Erb3 o Erb4) resulta letal, pues la señal NRG1-Erb es esencial para el desarrollo cardíaco (Nave & Salzer, 2006). Las isoformas de tipo I y III son las mas abundantes en el sistema nervioso y han sido detectadas en numerosas neuronas en proyección, en motoneuronas de la medula espinal y en neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG) además de la glia.

NRG1 posee alta afinidad de unión por dos tipos de receptores, ErbB3 y ErbB4, mientras que una proteína relacionada, ErbB2 actúa como co-receptor heterodimerizando en complejos ErbB3-ErbB2 y ErbB4-ErbB2. ErbB2 además de poseer un dominio de tipo kinasa, es incapaz de unirse directamente a NRG1. La acción determinada por la isoforma NRG1 tipo III en la membrana axonal, en sinergia con ErbB3-ErbB2 en las células de Schwann en desarrollo, es probablemente la mejor señal molecular establecida entre neuronas y glia dentro del sistema nervioso periférico (Jessen and Mirsky, 2005). Al unirse NRG1 a ErbB3-ErbB2 formando un heterodímero, ocurre la fosforilación de este receptor, se reclutan moléculas adaptadoras SH3 desencadenando la activación de una cascada de señalización intracelular hacia el núcleo activando la transcripción de determinados genes.

12.3 Notch.

En el linaje que conduce a las células de Schwann existen muchas similitudes entre la acción de Notch y NRG1. La activación de Notch es capaz de inhibir la generación de neuronas en cultivos celulares en los cuales crecen células de la cresta neural, además incrementa el número de células de Schwann GFAP⁺. Existen algunas evidencias (A. Woodhoo, R.M. & K.R.J) de que la activación de Notch, tal como NRG1, estimula la formación de las células de Schwann desde SCPs y estimula la proliferación de las células de Schwann. Interacciones de forma cooperativa entre Notch y NRG1 han sido descriptas previamente en el desarrollo de astrocitos. No está claro todavía cómo actúa Notch brindando instrucciones a las células de la cresta neural para promover la gliogénesis; probablemente algunas explicaciones surgen de un efecto indirecto provocado por la inhibición de la neurogénesis, la estimulación del pasaje SCPs a células de Schwann y su posterior proliferación. Así de esta manera Notch, provoca mediante su activación un cambio irreversible en las células de la cresta neural estimulando la transición desde la neurogénesis hacia la gliogénesis. (Morrison, S.J *et al.*, 2000).

12.4 BMP2 y BMP4 (*Bone morphogenetic protein*).

Las proteínas BMPs regulan el desarrollo y decisiones celulares tanto en linajes neurales como no neurales.

Estos dos factores (BMP2 y BMP4), son importantes para la generación de neuronas simpáticas *in vivo* y estimulan la formación de neuronas en cultivos de células de la cresta neural. Estos factores *in vitro* son poderosos bloqueadores de la diferenciación glial a partir de células de la cresta neural. BMP2 previene la adquisición de fenotipos maduros de células de Schwann, bloquea la expresión de genes de expresión tardía y mantiene la expresión de varios marcadores gliales tempranos. Las BMPs actúan como inhibidores de la diferenciación glial en el SNP y podrían regular el tiempo de desarrollo en la maduración de las células gliales (Justin. J. Dore & S. J. Birren, *Developmental Neuroscience Vol 27 N°1 2005*).

A n e x o II
***Clasificación de subtipos CMT y sus
mutaciones asociadas***

Tabla 3. Clasificación de las neuropatías hereditarias según MIM(619H<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>). Tomado de Lazzarini et al, *Myelin Biology and Disorders* 2003.

Disease (MIM)	Linkage	Affected gene	References
CMT1 (autosomal or X-linked dominant demyelinating)			
HNPP (MIM 162500)	17p11	<i>PMP22</i>	See text
CMT1A (MIM 118220)	17p11	<i>PMP22</i> (MIM 601097)	See text
CMT1B (MIM 118200)	1q22-23	<i>MPZ</i> (MIM 159440)	See text
CMT1C (MIM 601098)	16p13.1-12.3	<i>LITAF/SIMPLE</i>	See text
CMT1	10q21	<i>EGR2</i> (MIM 129010)	See text
CMT1X (MIM 302800)	Xq13.1	<i>GJB1</i> (MIM 304040)	See text
Intermediate CMT (I-CMT; autosomal dominant)			
I-CMT1	10q24.1-25.1	Outside <i>EGR2</i> and HSMN-R loci	(Verhoeven et al., 2001; Villanova et al., 1998)
I-CMT2	19p12-13.2		(Kennerson et al., 2001)
CMT2 (autosomal dominant axonal/neuronal)			
CMT2A (MIM 118210)	1p35-36	<i>KIF1Bβ</i> (MIM 605995)	See text
CMT2B (MIM 600882)	3q13-22	<i>RAB7</i>	(Verhoeven et al., 2003)
CMT2B-not linked to 3q13-22 (no MIM)			(Auer-Grumbach et al., 2000b)
CMT2C (with vocal cord paresis) (MIM 606071)	12q23-24		Klein et al., 2003
CMT2D (MIM 601472) May be allelic to distal SMA/ HMN-V (MIM 600794)	7p14	<i>GARS</i>	Antonellis et al., 2003
CMT2E (MIM 162280)	8p21	<i>NEFL</i>	See text
CMT2F (no MIM)	7q11-21		(Ismailov et al., 2001)
CMT2G (MIM 604484) (proximal, Okinawa type, HSMNP or HSMNO)	3q13.1		(Takashima et al., 1997; Takashima et al., 1999)
CMT2-P ₀ (MIM 118200)	1q22-23	<i>MPZ</i>	See text
Severe demyelinating, autosomal dominant or recessive phenotypes ("CMT3")			
Dejerine-Sottas Disease/HMSN-III (MIM 145900)	17p11	<i>PMP22</i>	See text
	1p22-23	<i>MPZ</i>	See text
	Xq13.1	<i>GJB1</i> (F235C)	See text
	10q21	<i>EGR2</i>	See text
	19q13.1	<i>PRX</i>	See text
	8p21	<i>NEFL</i>	See text
Congenital Hypomyelinating Neuropathy (CHN) (MIM 605253); see also CMT4E	10q21	<i>EGR2</i> ,	See text
	17p11	<i>PMP22</i>	See text
	1p22-23	<i>MPZ</i>	See text
	11q22	<i>MTMR2</i>	See text
Autosomal recessive demyelinating neuropathy ("CMT4")			
CMT4A (MIM 214400)	8q13-q21.1	<i>GDAP1</i>	See text
CMT4B-1 (MIM 601382)	11q22	<i>MTMR2</i> (MIM 603557)	See text
CMT4B-2 (MIM 604563)	11p15	<i>MTMR13</i>	See text
CMT4C (MIM 601596)	5q32		(Guilbot et al., 1999; Le Guern et al., 1996)

(Continues)

Disease (MIM)	Linkage	Affected gene	References
CMT4D (Lom) (MIM 601455)	8q24	<i>NDRG1</i> (MIM 605626)	See text
CMT4E; same as AR CHN			See text
CMT4F (MIM 605260)	19q13	<i>PRX</i> (periaxin) (MIM 605725)	See text
HMSN-R (Russe type) (MIM 605285)	10q23.2	(<i>EGR2</i> excluded)	(Rogers <i>et al.</i> , 2000)
Autosomal recessive axonal neuropathy ("AR-CMT2")			
AR-CMT2A (CMT2B1) (MIM 605588)	1q21.2-1q21.3	<i>LMNA</i>	(Chaouch <i>et al.</i> , 2003; De Sandre-Giovannoli <i>et al.</i> , 2002)
AR-CMT2B (CMT2B2) (MIM 605589)	19q13.3		(Leal <i>et al.</i> , 2001)
Early onset AR-CMT2			(Gabreels-Festen <i>et al.</i> , 1991; Ouvrier <i>et al.</i> , 1981)
Congenital AR axonal neuropathy	5q deletion (SMA area)		(Korinthenberg <i>et al.</i> , 1997)
Lethal neonatal AR-axonal neuropathy (MIM 604431)			(Vedanarayanan <i>et al.</i> , 1998; Wilmshurst <i>et al.</i> , 2001)
X-linked recessive CMT			
CMTX2 (MIM 302801)	Xp22.2		(Ionasescu <i>et al.</i> , 1991, 1992)
CMTX3 (MIM 302802)	Xq26		(Ionasescu <i>et al.</i> , 1991, 1992)
Cowchock syndrome (MIM 310490)	Xq13		(Cowchock <i>et al.</i> , 1985; Fischbeck <i>et al.</i> , 1986)
Hereditary sensory (and autonomic) neuropathies (HSN or HSAN)			
HSN-1 (MIM 162400)	9q22.1-22.3 (dominant)	<i>SPTLC1</i>	(Bejaoui <i>et al.</i> , 2001; Dawkins <i>et al.</i> , 2001)
HSN-2			(Ohta <i>et al.</i> , 1973)
HSN 3 (Riley-Day) (MIM 223900)	9q31 (recessive)	<i>IKBKAP</i>	(Anderson <i>et al.</i> , 2001; Slaugenhaupt <i>et al.</i> , 2001)
HSN 4 (CIPA) (MIM 256800)	1q21-q22, recessive	<i>TRKA</i> /NGF receptor	(Indo, 2001)
Hereditary motor neuropathies (HMN or "distal SMA")			
HMN 1 (MIM 182960) (early adulthood onset, AD or AR)			(Nelson and Amick, 1966)
HMN 2 (MIM 158590) (also SMA-IV)	12q24		(Irobi <i>et al.</i> , 2000, 2002)
HMN 5 (MIM 600794)	7p	<i>GARS</i>	Antonellis, <i>et al.</i> , 2003
HMN 7 (MIM 158580) (distal HMN with vocal paralysis-DHMNVP)	2q14		(McEntagart <i>et al.</i> , 2001)
Distal infantile spinal muscular atrophy with diaphragm paralysis (SMARD1) (MIM 604320)	11q13.2-4	<i>IGHMBP2</i> (MIM 600502)	(Grohmann <i>et al.</i> , 1999, 2001)
Distal hereditary motor neuropathy, Jerash type (HMN.J) (MIM 605726)	9p21.1-p12		(Christodoulou <i>et al.</i> , 2000)

Please note the following: HNPP is included with CMT1; dominant *EGR2* mutations that cause a CMT1 phenotype are not given as separate name (such as CMT1D); recessive *EGR2* mutations are not listed under CMT4; CMT4E is the same as autosomal recessive CHN. For abbreviations see text.