



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

***LOCALIZACIÓN DE LA ACUAPORINA 1 (AQP1) EN EL
NERVIO CIÁTICO DE LA RATA.***

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

P R E S E N T A

EDITH SEGURA ANAYA

**TUTOR ACADÉMICO
DRA. MYRNA ALEXANDRA ROBERTA DENT**

**TUTOR INTERNO
DR. ALEJANDRO MARTÍNEZ GÓMEZ**

**TUTOR EXTERNO
DR. ROLANDO HERNÁNDEZ MUÑOZ**

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx), con financiamiento UAEMéx proyecto 3215/2021CHT a cargo de la Dra. Myrna Dent.

Los estudios de posgrado en el programa de Maestría en Ciencias de la Salud fueron apoyados por una beca otorgada por CONACYT con número 412647/266697.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo integrado por:

Dra. Myrna Dent	Facultad de Medicina, UAEMéx
Dr. Alejandro Martínez Gómez	Facultad de Medicina, UAEMéx
Dr. Rolando Hernández Muñoz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM

a mis Papis y hermanos con todo cariño

a mi amiga Lau

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Myrna Dent, por compartir sus conocimientos, por su apoyo, confianza, paciencia, por el tiempo que me dedico para que este trabajo culminara exitosamente, mi agradecimiento sincero.

Al Dr. Rolando Hernández Muñoz y Dr. Alejandro Martínez Gómez, miembros del comité tutorial, por su apoyo y sugerencias durante la realización de la este trabajo.

Al Dr. Armando Aranda Anzaldo, por su valioso apoyo, por ser ejemplo en mi formación académica.

A la Dra. Claudia Rivera Cerecedo, IFC-UNAM, por la donación de animales para experimentación.

A todos los miembros del laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias de la UAEMéx, por su apoyo, consejo, compañerismo y amistad.

A Racifp y Armando, por todo su apoyo, cariño y confianza.

A Victor por su valiosa amistad.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Generalidades del sistema nervioso	5
1.1.1. Clasificación anatómica y origen: sistema nervioso central y periférico	5
1.2. Nervio periférico	6
1.3. Formación y función de la vaina de mielina	8
1.3.1. Composición y organización de la mielina	10
1.3.1.1. Mielina compacta	11
1.3.1.2. Mielina no compacta	11
1.4. Estructura del axón miélinico	12
1.4.1. Polarización radial	12
1.4.2. Polarización longitudinal	13
1.4.2.1. Nodo de Ranvier	13
1.4.2.2. Paranodo	14
1.4.2.3. Juxtaparanodo	15
1.4.2.4. Internodo	16
1.4.2.5. Incisuras de Schmidt-Lanterman	16
1.5 Acuaporinas	18
1.5.1 Estructura	18
1.5.2 Regulación	21
1.5.3 Distribución	22
1.5.4 Acuaporinas en el sistema nervioso	24
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27

III. JUSTIFICACIÓN	27
IV. HIPÓTESIS	28
V. OBJETIVO GENERAL	28
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES	28
VI. IMPLICACIONES ÉTICAS	29
VII. TIPO DE ESTUDIO	29
METODOLOGÍA	30
8.1 <i>Material biológico</i>	30
8.2 <i>Extracción de tejidos</i>	30
8.3 <i>Extracción de RNA</i>	30
8.4 <i>Diseño de primers</i>	31
8.5 <i>Amplificación de RNA por RT-PCR</i>	31
8.6 <i>Extracción de Proteínas</i>	32
8.7 <i>Cuantificación de proteínas</i>	32
8.8 <i>Electroforesis en gel de poliacrilamida</i>	32
8.9 <i>Transferencia</i>	33
9.0 <i>Tinción con azul de Coomassie</i>	33
9.1 <i>Western Blot</i>	33
9.2 <i>Inmunohistoquímica</i>	34
9.3 <i>Doble inmunofluorescencia</i>	35
9.4 <i>Toma de fotografías y análisis de imágenes</i>	35
IX. RESULTADOS	36
9.1 <i>Carta de envío</i>	36
9.2 <i>Manuscrito</i>	37
<i>Resumen</i>	37
<i>Abstract</i>	38
1. <i>Introducción</i>	39

<i>2. Materiales y métodos</i>	40
<i>3. Resultados</i>	43
<i>4. Discusión</i>	47
<i>5. Conclusiones</i>	49
<i>6. Agradecimientos</i>	49
<i>7. Bibliografía</i>	50
<i>8. Tablas</i>	53
<i>9. Pies de figura</i>	54
<i>10. Figuras</i>	56
IX. CONCLUSIONES	61
XI. BIBLIOGRAFÍA	62

RESUMEN

Las acuaporinas (AQPs) son una familia de proteínas de membrana que forman canales de agua, se encuentran ampliamente distribuidos en mamíferos, plantas y organismos inferiores. Consisten en tres subfamilias: acuaporinas, acuagliceroporinas y S-acuaporinas. Las AQPs son permeables específicamente a agua (AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6 y AQP8); las acuagliceroporinas son permeables al agua y a pequeños solutos como el glicerol y la urea (AQP3, AQP7, AQP9 y AQP10) y las S-acuaporinas o superacuaporinas (AQP11 y AQP12). En las membranas biológicas, las AQPs forman tetrámeros que contienen 4 poros acuosos independientes.

El transporte de agua y de solutos es bidireccional. Esta movido por la diferencia de presión osmótica e hidráulica, o por las diferencia de concentración de solutos entre el espacio intra y extracelular. La permeabilidad de cada canal y su abundancia en la membrana celular también pueden ser regulados por diversos mecanismos. Uno por regulación a corto plazo mediado por cambios conformacionales o de apertura del canal; y en otro por la regulación a largo plazo la cual esta mediada por cambios en la síntesis de RNA mensajero y/o proteína, así como la tasa de degradación de éstos.

Al menos 13 tipos de AQPs se han descrito en mamíferos, las cuales tienen una distribución diferente en los tejidos, con múltiples papeles fisiológicos. En el sistema nervioso central se han descrito seis AQPS (AQP1, AQP3, AQP4, AQP5, AQP8 y AQP9), siendo tres las más estudiadas AQP1, AQP4 y AQP9. En contraste la expresión y función de las AQPs en el sistema nervioso periférico (SNP) ha sido menos investigado, hasta la fecha se ha reportado la expresión de tres AQPs que incluyen a la AQP1, AQP2 y AQP4 que se han localizado en neuronas y células gliales en el ganglio trigémino, en terminaciones periodontales de Ruffini, el ganglio de la raíz dorsal y el sistema nervioso entérico. Dos estudios inmunohistológicos describieron brevemente la expresión de AQP1 en el nervio ciático. Oshio et al. (2006) y Gao et al. (2006) demostraron la inmunolocalización de AQP1 en cortes de nervio ciático de ratones y humanos respectivamente, pero no se ha encontrado AQP4 y AQP9. Sin embargo, ningún estudio muestra datos claros de colocalización con marcadores neuronas o de células gliales,

por lo que se desconoce si AQP1 se expresa en las de células de Schwann (CS) o en las fibras nerviosas.

Las CS son las principales células gliales y se dividen en dos tipos, CS que forman mielina y las que no forman. Las CS que forman mielina envuelven al axón de neuronas motoras y sensoriales para formar la mielina. La mielina del SNP contiene capas de membrana altamente compactadas y regiones no compactadas con citoplasma. En las regiones no compactadas se encuentran las incisuras de Schmidt-Lanterman, que son una estructura en forma de tubo cónico que atraviesa la mielina compacta y los bucles de mielina en la región paranodal. Dado que estas regiones no compactadas conectan el cuerpo de la célula de Schwann y el citoplasma periaxonal se cree que actúan como carreteras para el transporte de moléculas grandes, organelos extracelulares ó vesículas hacia el interior del mesoaxón, aunque a la fecha no hay evidencia experimental directa que muestre cómo se transportan en las ISL. En este trabajo se mostró que AQP1 se expresa en el nervio ciático de la rata, tanto a nivel de ARNm como de proteína. AQP1 se localiza tanto en las CS que forman y no forman mielina. En las CS que forman mielina se localiza en las incisuras de Schmidt-Lanterman, así como en la región paranodal, sugiriendo que la AQP1 debe tener un papel importante en el mantenimiento de la vaina de mielina y posiblemente en la propagación del impulso nervioso.

ABSTRACT

The aquaporins (AQPs) are a family of water-transporting widely distributed in mammals, plants and lower organisms. The AQPs include three subfamilies: aquaporins, aquaglyceroporins and S-aquaporins. The aquaporins are water selective or specific water channels (AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6 and AQP8); the aquaglyceroporins are permeable to water, but also to other molecules like glycerol and urea (AQP3, AQP7, AQP9 y AQP10) and the third subfamily S-aquaporins also named supraaquaporins (AQP11 and AQP12). Water and solute transport via AQPs is bidirectional. It is driven by osmotic and hydraulic pressure difference, or by the solute concentration difference, between the intracellular and extracellular space. The intensity of the transport is also determined by the single channel permeability of AQPs and by the cell membrane. Regulation of AQPs occurs by two major mechanisms: by a short-term regulation that can be mediated by conformational changes or gating of the channel or by long-term regulation mediated by changes in AQP mRNA and/or protein synthesis and/or degradation rate.

At least 13 mammalian members expressed in diverse fluid transporting tissues where multiple physiological roles have been demonstrated. Studies of the expression and function of AQPs in the central nervous system have been a major focus in the AQP field. Studies from many laboratories have shown the expression of six (AQPs AQP1, AQP3, AQP4, AQP5, AQP8 and AQP9), the most studied are AQP1, AQP4 and AQP9. In contrast, the distribution and functional significance of AQPs in the peripheral nervous system (PNS) are less investigated. To date, three AQPs (AQP1, AQP2 and AQP4) have been localized to neurons or glial cells in trigeminal ganglia, periodontal Ruffini endings, dorsal root ganglia and the enteric nervous system. Two immunohistological studies briefly described AQP1 expression in sciatic nerves. Oshio et al. (2006) and Gao et al. (2006) showed immunolabeling of AQP1 in mouse and human sciatic nerve respectively. Therefore, it is not known whether AQP1 expression is in Schwann cell (SC) or in nerve fibers. SC are the principal glia of the PNS There are two types of SC, myelinating and nonmyelinating. Myelinating Schwann cells wrap around axons of motor and sensory neurons to form the myelin sheath. The PNS myelin contains highly compacted membrane layers and noncompact regions with cytoplasm. One type of

cytoplasm-containing compartment is called a Schmidt–Lanterman incisure, which is a conical tubelike structure that crosses the compact myelin. Another type is called paranodal myelin loops, which are found in bilateral ends of myelin. These loops form paranodal axo-glial junctions to inhibit the lateral movement of axonal proteins including voltage-gated ion channels. Since these noncompacted regions connect the Schwann cell body and the periaxonal cytoplasm, they are thought to act as highways for transport of metabolic substances. In the present study, the expression and localization of AQP1 was studied in rat sciatic nerves. AQP1 was abundantly expressed within these nerves at both the protein and mRNA levels, and it was concentrated in Schmidt–Lanterman incisures as well as in the paranodal region, suggesting that AQP1 might have an important role in the maintenance of the myelin sheath and possibly in the propagation of nerve impulses.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del sistema nervioso

El Sistema Nervioso (SN) constituye uno de los sistemas más complejos y relevantes de nuestro organismo. Es definido como un conjunto de órganos constituido por una red de tejidos nerviosos de origen ectodérmico, su unidad básica es la neurona, la cual se especializa en la generación, integración y conducción de estados de excitación. Las células gliales, que acompañan a las anteriores, se encuentran en mayor proporción y cumplen funciones de soporte, tróficas, control del medio, generación de la envoltura de mielina, reparación de daños, neurogénesis y participación en vías metabólicas de producción de neurotransmisores (Brodal,1992), además son considerados precursores neuronales (Kriegstein y Noctor, 2004). Su principal función es recibir e integrar rápidamente las señales procedentes de los distintos órganos sensoriales, ejerciendo control y coordinación sobre los demás órganos para lograr una oportuna y eficaz interacción con el medio ambiente. Ésta, le permite reaccionar a la información de forma adecuada y mantener la homeostasis del organismo. Las principales células gliales del sistema nervioso central (SNC) son: astrocitos, oligodendrocitos y microglia que en conjunto constituyen la neuroglia. Mientras que en el sistema nervioso periférico (SNP) se han descrito dos tipos de células de Schwann (CS), las que forman mielina (CSFM) y las que no forman mielina (CSNFM).

1.1.1. Clasificación anatómica y origen: sistema nervioso central y periférico

El SN de los vertebrados se divide desde el punto de vista anatómico en componentes centrales y periféricos. Así, el SNC comprende: encéfalo (hemisferios cerebrales, diencefalo, cerebelo y tronco encefálico) y médula espinal; y el SNP implica neuronas sensitivas que conectan los receptores sensitivos con circuitos de procesamiento en el SNC y una porción motora. El origen del SN vertebrado deriva principalmente de las células de tubo neural que darán lugar al SNC y las células de la cresta neural que dan origen a las células neuronales y gliales del SNP. Los dos tipos de CS, las CSFM y las CSNFM tienen diferencias morfológicas,

moleculares y estructurales ya que cada una de ellas expresa proteínas específicas que las caracterizan (Jessen y Mirsky, 2005). Las CSFM son las responsables de la mielinización de los axones en el SNP. La formación de la mielina sobre un axón requiere que este último envíe señales adecuadas hacia las CS y viceversa modificando estas su perfil génico, posibilitando desarrollar el fenotipo miélinico en una serie de eventos de compleja comunicación entre glías y axones. 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 mielina es un determinante clave para la correcta propagación del impulso nervioso que llega a ser de 100 m/s. Las CSNFM, envuelven a uno o varios axones de diámetros pequeños (menores de 1 micra). La conformación de las fibras nerviosas no mielinizadas varía continuamente debido a la reagrupación de los procesos celulares de las CSNFM y los axones, además no se han descrito uniones celulares o regiones especializadas en este tipo de células (Bray et al., 1981; Griffin y Thompson, 2008).

1.2. Nervio periférico

Los nervios se componen de varios fascículos o fibras nerviosas que comunican los centros nerviosos con el resto de los órganos del cuerpo. Todos los axones del SNP están asociados a CS, la mayoría de los nervios periféricos son mixtos, con axones motores y sensitivos. Las fibras pueden ser mielínicas y estar formadas por el axón y la mielina, o amielínicas permaneciendo en surcos de las CS (Fig.1).

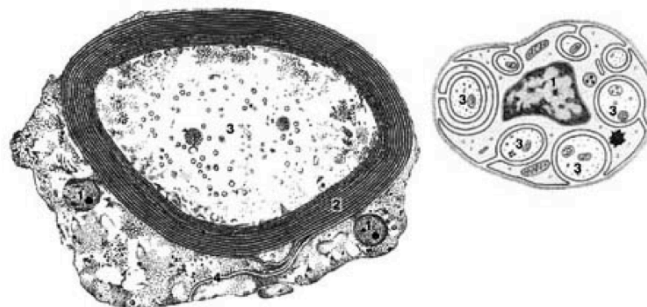


Figura 1. Microscopía electrónica de fibras amielínicas y mielínicas. La imagen de la izquierda muestra un axón (3) rodeado por una CSFM. En la imagen de la derecha se observa una fibra amielínica donde varios axones están rodeados por una misma CS, que no los mieliniza.

Las CS tienen un origen embrionario ectodérmico a partir de la cresta neural y se desarrollan en 3 etapas embrionarias (Fig. 2), primero como precursores de las CS, las cuales conforman la glía embrionaria de los días (E) 14-15 de nervios de rata (ratón E 12-13), posteriormente estos precursores originarán las CS inmaduras que se desarrollan a partir de E15-17 en ratas (ratón E13-15), las cuales durante el desarrollo postnatal se diferencian en CSFM y CSNFM (Jessen y Mirsky, 1999). 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 (Jessen y Mirsky, 2005).

El desarrollo postnatal de estas células es determinada al azar, el factor crítico que determina el destino de la CS inmadura es el diámetro del axón envuelto por dicha CS, no existe evidencia de que la CS inmaduras o las CS desdiferenciadas posterior a una lesión de nervio periférico estén ya comprometidas a formar CSFM o CSNFM en manera específica (Griffin y Thompson, 2008).

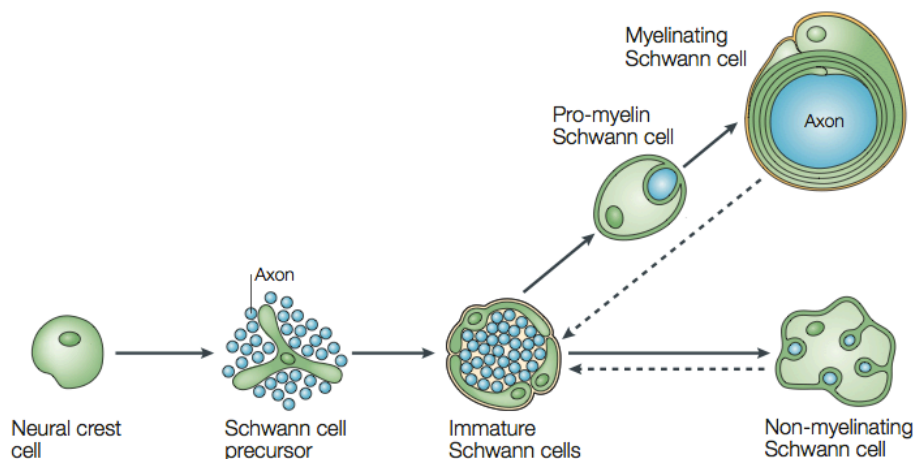


Figura 2. Desarrollo de las células de Schwann. Las células de Schwann sufren tres transiciones principales en su desarrollo: I) La formación de los precursores de las CS a partir de las células de la cresta neural, II) la formación de CS inmaduras, y III) la formación de CS que forman y que no forman mielina. Jessen y Mirsky, 2005.

El determinante de esta diferenciación es la cantidad de Neuroregulina 1 tipo III expresada por el axón y no el diámetro axonal per se. Esta proteína funciona como una señal de sobrevivencia y proliferación para los precursores de las CS y ajusta el número de CS en función de número de axones que serán mielinizados (Simons y Trotter, 2007). Inicialmente las CS inmaduras encierran grupos de axones, entre los que se seleccionarán aquellos con los que eventualmente se establecerá la típica relación 1:1 propia de las CS mielinizantes en el SNP (Jessen y Mirsky, 2005). Este proceso puede ocurrir únicamente después de que la CS haya producido su lámina basal, cuya función es iniciar la asimetría celular y establecer un eje de polaridad glial, imprescindible en la espiralización de su membrana, al mielinizar el axón. El axón y todas las CS que lo acompañan en su trayectoria constituyen la fibra nerviosa, la cual es rodeada por el endoneuro formado por fibras reticulares. Varias fibras nerviosas conforman un fascículo nervioso. Por afuera de él se encuentra el perineuro constituido por capas concéntricas de tejido conjuntivo. Finalmente la conjunción de fascículos nerviosos rodeados por epineuro constituye un nervio. El epineuro se compone de células de tejido conectivo, fibras de colágenas y células adiposas.

1.3. Formación y función de la vaina de mielina

La mielinización es un proceso de múltiples pasos en el que una CS adhiere a un axón, lo rodea y posteriormente se pliega entorno a él. La membrana de la CS forma repliegues concéntricos y espiralados rodeando el axón de 10-100 veces. El diámetro del axón está en relación con el espesor de esta vaina, es decir, con el número de vueltas de láminas de membrana de la CS e induce y promueve el crecimiento radial del axón. Esta relación es aproximadamente constante: el diámetro del axón es 0,6 veces el diámetro de la fibra. Comienza con el establecimiento de la polaridad celular por señales extrínsecas proporcionadas por el axón. El complejo Par-3, un miembro de la familia Par de proteínas adaptadoras, se localiza en la membrana glial interna adyacente al axón y actúa después de la adhesión al axón (Simons y Trotter, 2007). Señales axonales regulan la proliferación, supervivencia y diferenciación de CS, y participan en la determinación del grosor mielínico. Señales gliales afectan al citoesqueleto y al transporte axonal, y son requeridas para su

supervivencia (Poliak y Peles, 2003). Como fue propuesto en los primeros estudios por microscopía electrónica (Geren y Schmitt, 1954), la vaina de mielina crece ajustando su membrana interna a la circunferencia del axón, extendiéndose longitudinal y radialmente a medida que avanza el desarrollo. El espiral de membranas gliales es posteriormente compactado mediante la extrusión de citoplasma (con excepción de los bordes), lo que resulta en la organización multilaminar propia de la envoltura mielínica (Webster, 1993) (Fig. 3). El grado de compactación de la fibra mielínica, contribuye a aislar al axón para una eficiente transmisión del impulso nervioso. De esta forma, un axón mielínico ocupa un volumen 100 veces menor que un axón amielínico (Cowan *et al.*, 1997). La mielinización se produce durante un período prolongado en las tres primeras semanas de vida en los roedores, y en los seres humanos durante un período que se inicia en la vida embrionaria y termina con la pubertad (Berthold *et al.*, 2005).

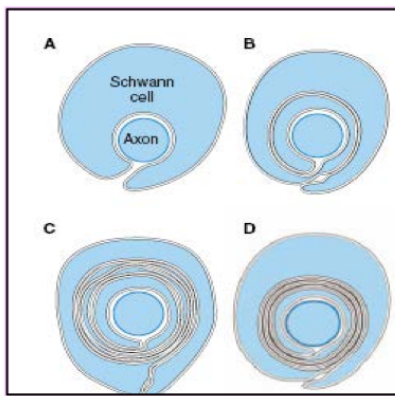


Figura 3. Formación de la vaina de mielina en SNP. El axón es internalizado en una invaginación de la CS (A). Sin embargo sus superficies externas no se han fusionado. La CS entra en contacto con el axón fusionándose al mesaxón y comienza a envolverla en forma espiralada (B). En etapas posteriores unas pocas capas de mielina se han formado pero aún no se compactaron (C) y finalmente ocurre la compactación quedando el citoplasma de la CS confinado a un anillo externo y otro interno (D). Quarles *et al.*, 2006.

A nivel ultraestructural, la mielina aparece como una estructura laminar que al microscopio electrónico se observa como líneas oscuras (electrondensas) y claras (translúcidas) alternadas que se disponen en espiral alrededor del axón. Esta asimetría estaría dada por la distribución de las proteínas en la membrana de las CS (Fig. 4).

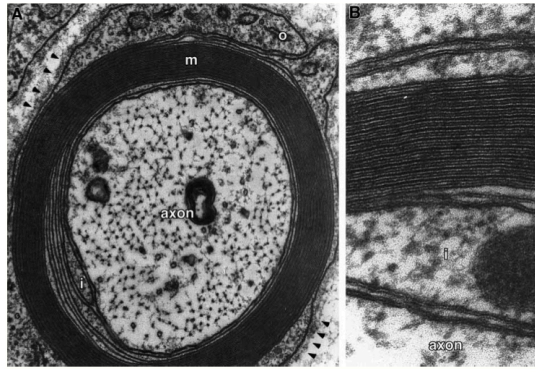


Figura 4. Ultraestructura de la mielina. (A) Micrografía electrónica de una fibra periférica. Se observa al axón rodeado por una estructura laminar, la mielina (m). (B) Ampliación, se observa la serie de líneas electrón-densas y lúcidas, así como las interlíneas. Quarles *et al.*, 2006.

La principal función de la mielina es funcionar como un aislante y facilitar la propagación de la señal a través del axón, conservando la energía y el espacio. Los potenciales de acción generados en el segmento inicial del axón se regeneran en los nodos, lo cual resulta en un mecanismo más rápido y eficiente desde el punto de vista energético para la propagación del impulso (Salzer JL. 1997). Al mismo tiempo cumple un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad axonal, regula el diámetro axonal, el espaciamiento de los NF, y agrupa los canales de Na^+ en el nodo de Ranvier (Poliak y Peles, 2003). Igualmente, a pesar de la íntima relación con los axones, también presenta la capacidad de interactuar con otras células, como lo demuestra su capacidad de comunicarse con las células del sistema inmune a través de la expresión de moléculas MHC de clase II (Armati *et al.*, 1990; Armati y Pollard, 1996).

1.3.1. Composición y organización de la mielina

Según el grado de compactación la vaina de mielina puede ser dividida en dos regiones estructural y funcionalmente distintas, constituyendo así dos subdominios: mielina compacta y mielina no compacta. La primera región, cuya función es el aislamiento, inhibe completamente el intercambio de iones durante la conducción nerviosa. Esta ocupa regiones internodales comprendidas entre dos juxtapanodos de una misma CS y constituye la mayor

proporción mielínica. Las ISL y los paranodos son los representantes periféricos de regiones de mielina no compacta y se encuentran recorriendo longitudinal y transversalmente la mielina compacta.

1.3.1.1. Mielina compacta

La mielina compacta tiene una composición que incluye principalmente colesterol y esfingolípidos así como algunos lípidos especializados tales como galactocerebrosido y sulfátido (Suter y Sherer, 2003). Una proporción menor se compone de proteínas, y su composición proteica es distinta a la presente en la mielina central. La glicoproteína P0 (Proteína Zero) es una proteína integral de membrana de 28 kDa que constituye la mitad de las proteínas totales en el SNP (Greenfield *et al.*, 1973), no se encuentra en el SNC. A través de sus dominios extracelulares tipo inmunoglobulina (IgG) promueve adhesiones homofílicas y autotípicas formando tetrámeros. Estos cumplirían la función de unir las láminas mielínicas adyacentes a intervalos espaciales regulares. PLP o proteína proteolípida es el mayor constituyente de la mielina del SNC y se encuentra en bajos niveles en la periférica. Otras dos proteínas la caracterizan: la proteína básica de mielina (MBP, por sus siglas en inglés *Myelin Basic Protein*), que se ubica en la cara citosólica de la membrana glial y representa entre 10 y 30% del total de las proteínas mielínicas y la proteína mielínica periférica 22 (PMP-22), una proteína integral que alcanza el 5% del total de las proteínas mielínicas (Cowan *et al.*, 1997; Oguievetskaia *et al.*, 2005). P2, al igual que MBP, se asocia a la superficie citosólica de la membrana de la CS.

1.3.1.2. Mielina no compacta

La mielina no compacta representan la minoría en cuanto a proporción de la mielina total y está caracterizada por la presencia de las incisuras de Schmidt-Lanterman (ISL), los bucles de mielina en la región paranodal, el mexoaxón externo, uniones autotípicas adherentes, uniones estrechas y uniones comunicantes entre las membranas plasmáticas de las CSFM (REF). Las uniones adherentes, tanto en los contactos entre bucles paranodales con el axón como en las ISL, están constituidas por complejos transmembranales ϵ -Cadherina/ β -Catenina en estrecha asociación con el citoesqueleto de actina.

1.4. Estructura del axón mielínico

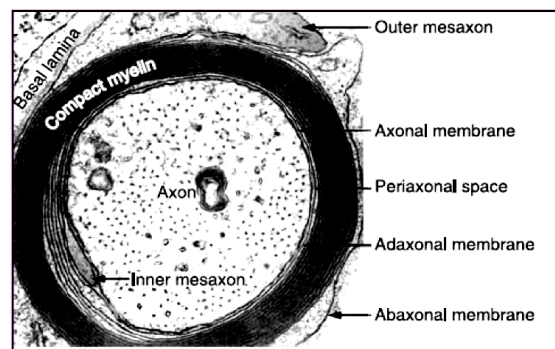
En el SNP adulto de vertebrados, los contactos intercelulares entre las CSFM y las neuronas, generan sub-dominios axo-gliales con características funcionales y estructurales específicas. Estos subdominios se sustentan por la formación de complejos multi-proteicos transcelulares y estructuran una polarización longitudinal y radial, frecuentemente en asociación con elementos del citoesqueleto cortical sub-membranoso.

1.4.1. Polarización radial

La fibra nerviosa mielínica es reconocida típicamente por su polaridad longitudinal. Sin embargo, existe igualmente una polarización radial, determinada por la ubicación precisa de distintos marcadores moleculares en dominios gliales y axonales específicos, correlacionados transversalmente, en torno a la cercanía a la membrana axonal. La envoltura de mielina se compone de varias capas de la membrana de la CS, espiralada en torno al axón. El núcleo glial se ubica en la parte exterior de la misma. Persiste un escaso citoplasma en el exterior (el compartimiento abaxonal) y rodeando al axón (el compartimiento adaxonal), un espacio periaxonal separa la membrana glial mas interna del axón (Fig. 6). En la membrana abaxonal se encuentran receptores de matriz extracelular y en la adaxonal, moléculas de adhesión que median las interacciones con el axón, en particular, MAG (por sus siglas en inglés *Myelin Associated Glycoprotein*) (Salzer *et al.*, 2003). Además, se presenta una lámina basal bien definida asociada al exterior de la CS cuyo papel es fundamental en la formación de la mielina en el SNP (Bunge *et al.*, 1982).

Figura 6. Sección transversal de un axón mielinado.

A través de la micrografía electrónica se observan las múltiples láminas de mielina formando la mielina compacta. La membrana abaxonal contacta con la lámina basal. El espacio periaxonal separa la membrana adaxonal de la membrana axonal. The Biology of Schwann Cells Development, Differentiation and Immunomodulation, 2007.



1.4.2. Polarización longitudinal

La polarización longitudinal se centra alrededor de los nodos de Ranvier, los cuales determinan distintos dominios: la región nodal, paranodal, juxtapanodal y la región internodal, mantenidos por complejas interacciones moleculares formados por moléculas de adhesión, canales iónicos, y moléculas de anclaje al citoesqueleto. Esta segregación en dominios longitudinales es evidente en las fibras completamente mielinizadas y son críticas para la habilidad de conducir impulsos nerviosos de forma saltatoria (Salzer et al., 2003). A continuación se detallará la composición de cada dominio longitudinal.

1.4.2.1. Nodo de Ranvier

Los nodos de Ranvier o complejos nodales, descubiertos por el anatomista y patólogo Francés Louis- Antoine Ranvier (1835-1922), son leves constricciones del diámetro axonal de alrededor de 1 μm de longitud ubicados entre cada internodo, donde el axón contacta con las microvellosidades de dos CS contiguas. Su principal función es permitir la rápida propagación del impulso nervioso (Salzer, 1997) En el axolema se insertan una gran densidad de canales de Na^+ dependientes de voltaje ($> 1500/\mu\text{m}^2$), predominando, en el estado adulto, las subunidades $\text{Nav } 1.6\alpha$ (Fig. 7; Caldwell *et al.*, 2000; Tzoumaka *et al.*, 2000). Los canales de Na^+ dependientes de voltaje son complejos heterotriméricos, con una subunidad α que forma el canal y dos subunidades β transmembranales, (Figura 15B; Catterall, 2000). Los canales de Na^+ forman parte de un complejo multiprotéico en el segmento inicial del axón y en los nodos de Ranvier (Peles y Salzer, 2000). Cada subunidad β del canal de Na^+ contiene un dominio similar al de las inmunoglobulinas que fomenta la adhesión homofílica; e interacciona con componentes de la matriz extracelular (Isom, 2002), con la Neurofascina y Nr-CAM (componentes de la superfamilia de moléculas de adhesión L1CAM). Estas interacciones contribuyen a la organización del complejo nodal. Un componente clave de este complejo $\text{Na}^+/\text{NrCAM}/\text{Neurofascina}$ es la proteína Ankirina G (Ank G) que se une a los canales de Na^+ (Davis et al., 1996; Bennett y Lambert, 1999; Garrido et al., 2003). La familia ankirina

presenta una región de repeticiones de dominios ANK que median el reconocimiento de un gran número de proteínas entre las que se encuentran factores de transcripción y proteínas NFKappa/IKappaB (Cramer y Muller, 1999). La Ank G, a su vez, se une a la espectrina IV β , una isoforma de espectrina que se localiza en los nodos (Berghs et al., 2000; Komada y Soriano, 2002). La espectrina IV β proporciona la unión entre el complejo del canal y el citoesqueleto de actina (Bennett y Gilligan, 1993, Komada y Soriano, 2002). A nivel axonal, el citoplasma de esta zona se encuentra enriquecido en mitocondrias, vesículas, y neurofilamentos (NF). Los nodos se comunican con las microvellosidades interdigitales que se proyectan desde el extremo de la CS, en ellas se localizan: Ezrina, Radixina y Moesina (ERMs), así como la proteína de unión a Ezrina EBP50 y Rho-GTPasa A, las cuales se encargan de vincular las microvellosidades ricas en actina con proteínas integrales de membrana axonales. Además varias proteínas de la matriz extracelular (ECM), están presentes bajo la lámina basal en el espacio nodal, incluyendo Versicano (ácido hialurónico de unión de proteoglicanos), Tenascina-C y el proteoglicano NG2 (Poliak y Peles, 2003).

1.4.2.2. Paranodo

La región más próxima al nodo corresponde a la región paranodal, donde se ubican los bucles paranodales. Esta región es el sitio donde ocurre la mayor aproximación entre la membrana del axón (axolema) y la célula glial. Los lazos paranodales más externos cercanos al nodo, se aproximan estrechamente e invaginan en el axolema. En la unión axoglial la membrana axonal contiene un complejo de dos moléculas de reconocimiento celular: Contactina y proteína asociada a Contactina (Caspr 1, miembro de la familia CASPR) (Fig. 7). Estas proteínas se unen a través de sus dominios extracelulares a varias NCAM y por sus dominios intracelulares a 4.1B, la cual presenta un dominio de unión a actina-espectrina, que podría inmovilizar Caspr 2 (y por lo tanto Contactina) fijándola al citoesqueleto y determinando su localización. La unión paranodal tiene el objetivo de fijar la mielina al axón, lo cual permite separar la actividad eléctrica del nodo de Ranvier de la región intermodal, así funciona como una barrera que limita la difusión lateral de las proteínas del axolema, particularmente las nodales (Poliak y Peles, 2003). Estos complejos transcelulares paranodales son conocidos como uniones de

tipo septo, en alusión a las uniones septadas de invertebrados. Las uniones paranodales son lo suficientemente estrechas que interconectan el espacio periaxonal con el espacio perinodal de tal manera que permite la lenta difusión de metabolitos hacia el axón y viceversa (Rosenbluth, 2009).

1.4.2.3. Juxtapanodo

El juxtapanodo, ubicado debajo de la mielina compacta inmediatamente adyacente a la región paranodal, tiene canales de K^+ dependientes de voltaje (Kv1.1 y Kv1.2) distribuidos con un gradiente de concentración que va en sentido decreciente desde el paranodo hacia el internodo. En el axolema juxtapanodal estos canales crean un complejo con Caspr2 (Fig. 7). Otras proteínas allí presentes son la glicoproteína transitoria-1 (Tag-1), una molécula de adhesión celular anclada a GPI que se ubica del lado glial. Este último se relaciona con Contactina y Caspr2 en el axón. Caspr2 y Tag1 formarían un andamio que permite el posicionamiento de los canales iónicos en sitios específicos (Fig 8). La función de los canales de K^+ en esta región es ser un amortiguador activo de la excitación reentrante contribuyendo así a mantener el potencial de reposo en el internodo, además de mediar la comunicación axoglial (Poliak y Peles, 2003).

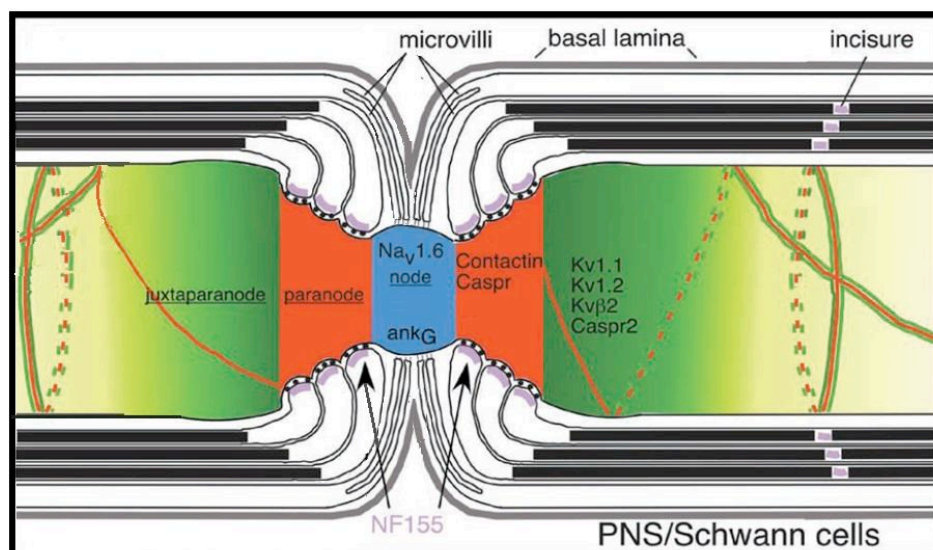


Figura 7. Polarización longitudinal. Se observa el nodo de Ranvier (azul) donde se ilustra la presencia de canales dependientes de voltaje y Anquirina G, los lazos paranodales (rojo), y la región juxtapanodal (verde). Scherer y Arroyo, 2002.

1.4.2.4. Internodo

Los segmentos de mielina que se extienden desde un juxtapanodo a otro se conocen como internodos. El internodo es el dominio más extenso de las fibras mielínicas y se corresponde con la porción del axón localizada bajo la mielina compacta. A lo largo de él, la membrana interna de la CS se encuentra uniformemente separada del axón por medio de un espacio denominado espacio periaxonal. La membrana internodal en contacto con las ISL y el mesaxón interno contiene complejos proteicos característicos de regiones paranodales y juxtapanodales (Peles y Salzer, 2000). La caracterización de las interacciones transcelulares en este dominio es escasa. En él se puede encontrar un variado set de proteínas CAM que median las interacciones entre el axón y la CS, incluyendo la familia de las Nectinas (Necl por su sigla en inglés *Nectin like proteins*) involucradas en la adhesión celular. Necl-1 y Necl-2 se expresan en el internodo axonal y promueven la adhesión y el mantenimiento del espacio periaxonal a lo largo de este por medio de su unión con Necl-4 (y probablemente Necl-2) en la membrana interna de la CS. Estas proteínas se encuentran además en las ISL promoviendo interacciones entre sus componentes y la mielina no compacta. Otra proteína muy expresada en esta región es MAG la cual interactúa con componentes axonales y al igual que las Necl, se acumula en las ISL al madurar la mielina (Trapp, 1990).

1.4.2.5. Incisuras de Schmidt-Lanterman

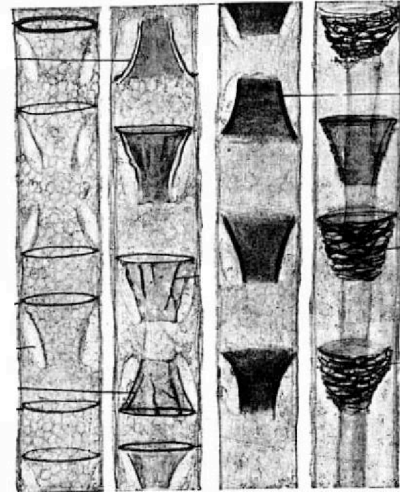
Como parte de los estudios y reportes morfológicos en axones mielínicos del SNP, tanto Schmidt (1874) como Lanterman (1877), de manera independiente, describieron una serie de hendiduras o incisuras con forma de “embudo” que interrumpían la apariencia densa de la mielina. Estas hendiduras, se denominaron incisuras de Schmidt-Lanterman (ISL) (Fig. 8) Dichas estructuras fueron observadas además por Ranvier (1878) y Ramón y Cajal (1928). Éste último las describió como segmentos cónico-cilíndricos de longitud variable que comienzan debajo del protoplasma de las CS y se extienden por el axón (incisiones infundibuliformes) (Ramón y Cajal, 1928; revisado en May 1991). En el SNP las ISL son propias de las regiones internodales y muy abundantes entre las regiones perinuclear y

paranodal. El número total de incisuras se incrementa con el grosor de la mielina, la longitud internodal (Hiscoe, 1947; Ghabriel y Allt, 1980), y en respuesta a numerosos estímulos como lesión axonal o el daño por compresión, así como también en nervios en regeneración (Berger y Gupta, 2006).

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 microscopía electrónica. Cuando se examina la ultraestructura en secciones longitudinales, las ISL aparecen como una serie de aberturas citoplasmáticas de la mielina compacta (Ghabriel y Allt, 1981; Peters *et al.*, 1991), orientadas tanto de manera longitudinal como transversal. Las membranas de las ISL se distinguen de la mielina compacta por la presencia de citoplasma de la CS, la presencia de microtúbulos, desmosomas, filamentos de actina, organelos tipo mitocondrias y algo de retículo endoplásmico (Blakemore, 1969; Singer, 1968, Landon y 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 (Trapp *et al.* 1979; Schober *et al.*, 1981; Xu *et al.*, 2000).

La función de las ISL, aún no ha sido 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) sugieren que las ISL cumplen alguna función en el mantenimiento y metabolismo de la mielina. Otras hipótesis, sugiere que las incisuras actúan como “un atajo” citoplasmático para sustancias que atraviesan la vainas de mielina desde las regiones más externas hacia las más internas hasta alcanzar el axón (Balice-Gordon *et al.*, 1998). El papel 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 *et al.*, 2007).

Figura 8. Incisuras Schmidt-Lanterman. Se observa un dibujo de Ramón y Cajal (1928) mostrando el arreglo tipo “embudo” de las incisuras en una fibra mielínica del SNP.



1.5 Acuaporinas

El agua es el componente predominante de todos los organismos vivos y por tal razón interviene en la regulación de la mayor parte de los procesos biológicos. Es conocida la elevada permeabilidad al agua de la mayoría de las membranas biológicas en respuesta a mínimas diferencias osmóticas que permiten que los compartimentos intra y extra celulares mantengan su isotonicidad, necesaria para la homeostasis intracelular. El agua puede atravesar la membrana por difusión simple o a través de poros o canales acuosos conocidos como acuaporinas (AQPs).

1.5.1 Estructura

Las AQPs son una familia de proteínas de membrana que forman canales de agua, son proteínas pequeñas con pesos moleculares entre 26 y 35 kDa que presentan similitudes estructurales. La secuencia primaria (Fig. 9) forma dos repeticiones en tandem, cada una de las cuales tiene tres dominios de α -hélices transmembranales (numerados de 1 a 6), conectados por cuatro asas (A, B, C, D), con sus terminales amino y carboxilo orientados hacia el citoplasma. Las asas B (citoplásmica) y D (extracelular) contienen un motivo aminoacídico distintivo y altamente conservado en la familia de las acuaporinas, Asn-Pro-Ala (NPA) que se embeben en la membrana y darán origen al primer filtro de selectividad. La estructura que resulta es una constricción angosta que se abre más ampliamente a los lados extra e intracelular de la membrana y que se llama el “modelo en reloj de arena” (Fig. 10). En las

membranas biológicas, las AQPs forman tetrámeros que contienen 4 poros acuosos independientes (Fig. 11; Zelenina, 2010). Este arreglo tetramérico da a cada monómero una conformación muy estable dentro del entorno lipídico de la membrana (Walz et al. 1997).

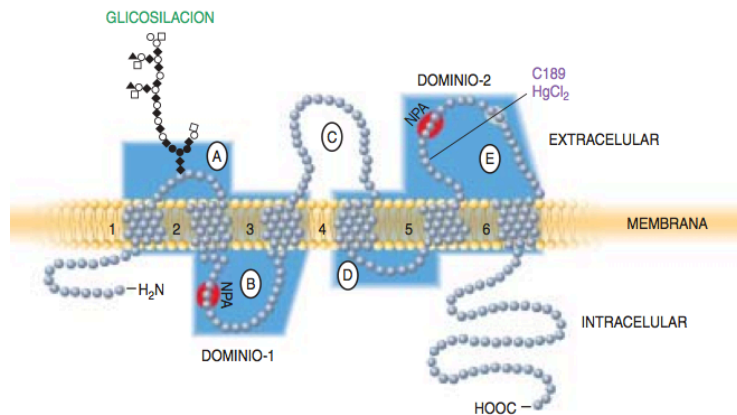


Figura 9. Estructura molecular de las AQPs. Las AQPs se componen de dos grandes dominios, imagen especular uno del otro. Se organizan en seis segmentos de estructura α -hélice (1-6) que atraviesan la membrana de lado a lado; están unidos por cinco lazos conectores (A-E). El lazo intracelular B y el extracelular E son portadores de un triplete NPA. Esta duplicación del triplete NPA es característica de todas las acuaporinas.

Figura 10. Reloj de arena. El lazo B y E se pliegan hacia la membrana para formar el poro o canal acuoso de la proteína. La estructura resultante encierra una zona central estrecha que se ensancha abriéndose hacia ambos lados de la membrana. Se denominó “reloj de arena”, por su semejanza con éste. En el sitio más estrecho del poro acuoso se ponen en contacto los tripletes NPA.

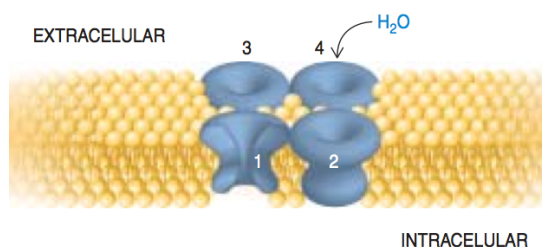
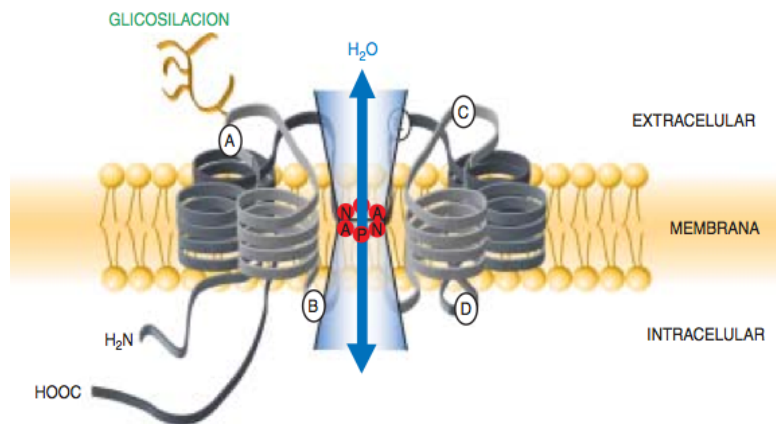


Figura 11. Arreglo tetramérico. Aunque cada acuaporina forma por sí sola un canal, en la membrana celular estas proteínas se ensamblan en grupos de cuatro

Las AQPs se encuentran ampliamente distribuidas en mamíferos, plantas y organismos inferiores (Carbrey y Agre, 2009). En mamíferos se han identificado hasta ahora 13 canales de agua (de la 0 a la 12), que pueden clasificarse en subgrupos: *las acuaporinas*, que son permeables específicamente para agua (AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6 y AQP8), con excepción de AQP6, tales acuaporinas se muestran impermeables a solutos dotados de carga eléctrica e iones, *las acuagliceroporinas*, que son permeables al agua y a pequeños solutos como el glicerol y la urea (AQP3, AQP7, AQP9 y AQP10) y las *superaquaporinas*, AQPs subcelulares o también llamadas “no ortodoxas AQPs” ya que poseen un motivo inusual NPA (Asn-Pro-Ala) (Magni et al, 2006; Benga. 2009; Benga. 2012). AQP11 y AQP12 proteínas de 271 y 295 aminoácidos respectivamente conservan el segundo motivo NPA, pero en AQP11 el primero es sustituido por Asn-Pro-Cys (NPC) mientras que AQP12 es sustituido por Asn-Pro-Thr (NPT) (Rojek et al, 2008; Itoh et al, 2005).

Su permeabilidad al agua es alta, en el orden de 3×10^9 moléculas de agua por segundo para AQP1, y cifras cercanas para casi todas las demás (Zeidel ML et al., 1994). Éstas son altamente selectivas al paso del agua impidiendo incluso el paso de protones; la estructura del poro acuoso impide que el agua protonada (H_3O^+) sea capaz de atravesar la barrera formada por el residuo de Arg-195, el cual está conservado en todos los miembros de la familia y ocupa una posición preponderante en el poro (De Groot BL et al., 2001). Existe una segunda barrera en el paso de protones, formada por un fuerte dipolo en el centro del poro constituido por dos segmentos que contiene la secuencia NPA, el cual reorienta a las moléculas de agua al pasar, disruptiendo las interacciones entre una molécula y la siguiente (Murata K et al., 2000 y Tajkhorsidh M et al., 2002), lo cual elimina la posibilidad del transporte de protones simultáneamente. En general, estos canales de agua tampoco permiten el paso de otros iones porque el tamaño del poro es aproximadamente de 2.8 Å, el cual es mucho menor que el diámetro de cualquier ión hidratado. La presencia de un residuo de ácido aspártico (D) cerca del segundo motivo NPA está asociado con un diámetro de poro mayor, como sucede en las acuagliceroporinas (Ishibashi et al., 2011) lo cual permite el paso de glicerol y urea. El transporte de agua y solutos en las AQPs es bidireccional. Está movido por la diferencia de presión osmótica e hidráulica, o por la diferencia de concentración de solutos entre el espacio

intracelular y extracelular. La permeabilidad de cada canal y su abundancia en la membrana celular también determina la intensidad del transporte los cuales pueden ser regulados por diferentes mecanismos (Carbrey y Agre, 2009).

1.5.2 Regulación

La regulación de la actividad de las acuaporinas puede ocurrir a través de diversos mecanismos ya sea a corto plazo en el cual la permeabilidad y la abundancia de los canales de AQPs puede cambiar en segundos o minutos, que lleva a cambios inmediatos en la permeabilidad de la membrana ó a largo plazo produciendo cambios que pueden durar horas o días (Zelenina, 2010).

A continuación se describen cuatro mecanismos de regulación estudiados:

- Regulación transcripcional y cambios de expresión ocurre en horas o días. Las acuaporinas, como cualquier otro gen pueden regularse a nivel transcripcional. De esta forma, hay acuaporinas que se expresan constitutivamente y otras inducen o inhiben su expresión ante un estímulo determinado. Este mecanismo de regulación ha sido muy explorado mediante microarreglos (Zelenina, 2010).
- Reubicación por relocalización, *targeting o trafficking* ocurre en minutos. Tanto en plantas como en animales, la dinámica de la localización subcelular de las acuaporinas, representa un aspecto clave en su regulación y función. Algunas acuaporinas de mamíferos, son llevadas desde vesículas intracelulares hasta la membrana plasmática y viceversa en función de niveles hormonales o estímulo de segundos mensajeros (Beitz, *et al.*, 2006; Noda, *et al.*, 2005; Tietz, *et al.*, 2006). Por ejemplo en las células renales el control del ajuste fino de la homeostasis está regulado por AQP3 y AQP4 expresadas en forma constitutiva en la membrana plasmática basolateral y AQP2, cuya localización a la membrana plasmática se encuentra regulada por AVP (arginina-vasopresina) mediante la activación de la redistribución de las vesículas intracelulares a la membrana plasmática; los mecanismos a través de los cuales ocurre son complejos e involucran varias proteínas (Nedvetsky *et al.*, 2009). Otro caso destacado ocurre en hepatocitos donde en condiciones normales AQP8 se localiza en vesículas intracelulares (Calamita *et al.*, 2001) y en mitocondrias (Ferri *et al.*,

2003); sin embargo cuando se estimula con la hormona glucagón o el segundo mensajero AMPc, la AQP8 intracelular se redistribuye a la membrana plasmática; esta traslocación está mediada por la activación de PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) (Gradilone *et al.*, 2005).

- Regulación directa de la actividad de transporte que ocurre en minutos. La vía directa de regulación de acuaporinas se entiende como las modificaciones conformacionales que promueven la apertura o cierre del poro llamado *gating*. Las modificaciones pueden ser por eventos de fosforilación/desfosforilación, por acción de protones o por acción de cationes divalentes.
- Regulación mediada por PKC (*Protein kinase K*) y calcio la cual ocurre en segundos. Un estímulo hipotónico directamente induce el calcio intracelular a través de un receptor potencial que desencadena la translocación de AQP1 a la membrana. Esta translocación, la cual tiene un papel directo en la regulación del volumen celular, ocurre en 30s y es dependiente de la activación de calmodulina y la fosforilación de AQP1 en sus dos residuos de treonina por PKC (Conner *et al.*, 2012).

1.5.3 Distribución

Las AQPs están distribuidas ampliamente las cuales tienen una distribución diferente en los tejidos, con múltiples papeles fisiológicos (Zelenina, 2005; Verkmann, 2002; Cuadro 1).

AQP1 es la más abundante en las membranas animales. Ha sido la AQP prototipo dado que fue la primera en ser descrita y por tanto es la más estudiada hasta el momento, lo cual a su vez ha permitido conocer a todas las demás. Fue descubierta inicialmente en eritrocitos, pero su presencia se ha demostrado en la mayor parte de los epitelios, sobre todo en el túbulo proximal renal y el segmento descendente delgado del asa de Henle en el riñón, en todos los tipos del endotelio y en los epitelios de cristalino y córnea. Existen otros epitelios en los cuales se ha demostrado su ausencia como en la nefrona distal y las glándulas salivales. Sin embargo, parece estar presente en la mayoría de las membranas, aunque en muchas de ellas su papel funcional permanezca sin ser dilucidado. Es la responsable de la alta permeabilidad al agua del

asa de Henle, en los cuales es una de las proteínas más abundantes tanto en la membrana apical como en la basolateral (Nielsen et al. 1993).

Frecuentemente hay más de una AQP en los órganos típicamente diseñados para transportar grandes volúmenes de agua como el riñón. La distribución de cada AQP es muy particular: algunas son ubicuas (AQP1, 3 8 y 9), mientras otras se expresan sólo en un tejido (AQP0 y AQP2). Numerosos estudios han demostrado que las AQPs son importantes en la homeostasis y señalización neuronal.

Cuadro 1
Localización de las AQPs en tejidos y el sistema nervioso de mamíferos.

ACUAPORINAS	TEJIDO	SISTEMA NERVIOSO
AQP0	Cristalino	
AQP1	Eritrocitos, riñón, intestino , cerebro	SNC y SNP
AQP2	Riñón	SNP
AQP3	Piel, colon, pulmón, Cerebro y riñón	SNC
AQP4	Cerebro, médula espinal, riñón, intestino, ojo, pulmón.	SNC y SNP
AQP5	Glándulas secretoras, cerebro, pulmón y ojo	SNC
AQP6	Riñón	
AQP7	Ovario, testículo, riñón y tejido adiposo	
AQP8	Colon, placenta, cerebro, páncreas, hígado y corazón.	SNC
AQP9	Cerebro, hígado, testículos y bazo	SNC
AQP10	Intestino delgado.	
AQP11	Hepatocitos, intestino, glándulas salivales, testículo	
AQP12	Páncreas	

1.5.4 Acuaporinas en el sistema nervioso

Ha habido un creciente interés en la localización y el potencial papel de las acuaporinas en el SN en los últimos años. Gran parte de la información proviene de estudios sobre AQP4, uno de los primeros subtipos descritos y el más abundantemente expresado en el SNC. Sin embargo, otros cinco miembros de la familia de las acuaporinas (AQP1, AQP3, AQP5, AQP8 y AQP9) se han identificado hasta ahora en el cerebro de roedores, siendo tres las más estudiadas: AQP4, que es la forma predominante en el cerebro, la médula espinal y el nervio óptico. Se expresa en astrocitos y en células endoteliales, AQP1 se expresa en las células epiteliales y en el plexo coroideo, y la AQP9 que está implicada en la formación de edemas cerebrales y en remover los iones de K^+ que se liberan durante la actividad neuronal. AQP1 juega un papel en la formación del fluido cerebroespinal y en la médula espinal posiblemente tenga un papel en la remodelación y plasticidad axonal que es necesario para los procesos sensoriales normales (Nesic et al, 2008) y la AQP9 posiblemente juega un papel en el metabolismo energético. Las tres AQPs en el cerebro se regulan a la alta en astrocitos reactivos (en respuesta a una lesión), así como en tumores cerebrales (Zelenina, 2010). También se ha visto que los ratones que no expresan AQP4 están protegidos del edema cerebral citotóxico que ocurre cuando el agua se introduce de las porciones intersticiales del cerebro a las células (Papadopoulos y Verkman 2007).

En el SNC la AQP1 se expresa selectivamente en las microvellosidades de la membrana apical del epitelio coroideo lateral de los ventrículos tercero y cuarto (Verkman 2002). Las células epiteliales del plexo coroideo ventricular son las responsables de secretar el fluido cerebroespinal a los ventrículos del cerebro. Estas células están polarizadas, expresan diferentes transportadores iónicos en la membrana apical y basolateral, creando un gradiente osmótico que dirige el flujo unidireccional de agua. Por ello, se cree que son las AQPs las que regulan el movimiento del agua en la formación del fluido cerebroespinal (Speake et al., 2003; Lehmann et al., 2004). La delección de la AQP1 genera una reducción en la producción del fluido cerebroespinal, así como una reducción en la presión intracraneal de cerca del 50% (Oshio, 2005). Curiosamente un pequeño número de personas han sido identificadas con una severa o total deficiencia de AQP1. Sorprendentemente, estas personas son sanas

generalmente, pero muestran un defecto en la capacidad de concentrar solutos en la orina y de conservar agua cuando se les impide tomarla. Ratones con AQP1^{-/-} también muestran deficiencia en la conservación del agua debido a la incapacidad de concentrar solutos en la médula del riñón (Carbrey y Agre, 2009). También existen evidencias de que la AQP1 se expresa en los astrocitos reactivos del cerebro en condiciones patológicas. Por ejemplo se ha visto que la AQP1 se acumula cuando se generan contusiones, en hemorragias subaracnoideas, en la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob, en infartos cerebrales y en la esclerosis múltiple. También se ha descrito en los astrocitos corticales durante las etapas tempranas de la enfermedad de Alzheimer (Albertini y Bianchi, 2010).

En la médula espinal posiblemente la AQP1 tenga un papel importante en el crecimiento axonal durante la embriogénesis, así como en la remodelación y plasticidad sináptica que se requiere para los procesos sensoriales normales. También se expresa en las células endodurales de la médula espinal alrededor del canal central y en las fibras sensoriales de la lámina superficial del asta dorsal (Oshio et al., 2006). Cuando se genera una lesión en la médula espinal los astrocitos reactivos y las células endodurales que se encuentran alrededor de la lesión incrementan la expresión de AQP1 (Nesic et al., 2008) y los axones sensoriales incrementan su expresión durante los primeros 11 meses después de la lesión. También se ha visto que tanto en la médula espinal sin lesionar como en la lesionada, la AQP1 co-localiza con GAP-43, que es una molécula localizada en los conos de crecimiento de las neuritas, en particular en las fibras nerviosas no mielinizadas (Albertini y Bianchi, 2010).

En el SNP la AQP1 se describió por primera vez en los ganglios sensoriales craneales (Matsumoto et al., 2004), y trabajos posteriores mostraron la presencia específica del RNA mensajero en el núcleo caudalis del nervio trigémino, así como en pequeñas neuronas amielínicas y fibras nerviosas del ganglio de la raíz dorsal (GRD), las cuales son regiones donde se procesa la información de dolor (Oshio et al., 2006). Algunos estudios han mostrado evidencia indirecta de que la ósmosis contribuye a la percepción del dolor. Hace más de cuarenta años Hitchcock (1969) mostró que cuando se les inyectaba intratecalmente salina fría a pacientes con dolor intratable se generaba un alivio inmediato. Posteriormente se reportó la colocalización de la AQP1 con la sustancia P y los receptores de capsaicina en GRD, esto

sugirió que la AQP1 se expresa en las neuronas nociceptivas y que posiblemente contribuye al proceso de señales de dolor (Oshio et al., 2006). Un trabajo más extensivo con ratones AQP1^{-/-} mostraron una reducción en la respuesta al dolor por frío comparados con los normales (Oshio, 2006; Zhang y Verkman, 2010), sugiriendo que las acuaporinas deben jugar un papel importante en la vía del dolor. También se ha reportado la presencia de AQP1 en el sistema entérico humano, en los ganglios pancreáticos y en el nervio ciático (Gao et al., 2006). Sin embargo, estudios recientes muestran que AQP1 se expresa en las neuronas entéricas pero no en las mientéricas, y no la detectan en células gliales del plexo submucosal (Arciszewski et al., 2011).

En los tumores cerebrales, la expresión de AQP1 se incrementa en correlación con el grado de malignidad (Albertini y Bianchi, 2010). La AQP1 que normalmente se encuentra restringida al epitelio coroideo, se expresa altamente en los glioblastomas humanos, sugiriendo un papel patológico importante. Los tumores cerebrales tienen la tendencia de causar edema en los tejidos adyacentes y en los astrocitomas la AQP1 se encuentra en las células endoteliales y en los astrocitos neoplásicos, mientras que en los carcinomas metastáticos se observa en las células endoteliales y los astrocitos reactivos (Lehmann et al., 2004). También se ha propuesto que la AQP1 tenga un papel en la migración celular. En ratones AQP1^{-/-} los tumores crecen más lentamente y contienen menos vasos sanguíneos que los tumores que sí la expresan (Saadoun et al., 2005). Estudios posteriores mostraron que las AQPs incrementan la migración celular independientemente del tipo de AQP que sea o del tipo de célula que esté involucrada (Tait et al., 2007). Sin embargo, no se sabe la relevancia de la AQP1 en humanos, dado que los humanos nulos para AQP1 no parece que sufran un decremento en la angiogenesis y al menos una de estas personas ha muerto de cáncer (Carbrey y Agre, 2009).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aunque numerosos estudios han reportado la localización y función de AQP en el SNC, poco se sabe sobre su expresión y función en el SNP. En particular ha habido controversia sobre la localización de las AQPs en este último. Se ha reportado la expresión de la AQP-1 en el sistema nervioso entérico, también en los ganglios dorsales, en el trigémino, en los nodosos y en los nervios periféricos. También recientemente la AQP-2 se ha reportado en las células de Schwann de los ganglios dorsales y trigéminos durante condiciones de dolor (Albertini y Bianchi 2010).

Por lo tanto, con el fin de profundizar en el estudio de las AQPs en el SNP, el presente proyecto tiene el propósito de estudiar la expresión de la AQP1 en el nervio ciático de la rata determinando la localización celular de la misma. Estudios preliminares en el laboratorio muestran que la AQP-1 se expresa en el nervio ciático, por lo que se establecerá la localización precisa de esta acuaporina en condiciones normales.

III. JUSTIFICACIÓN

La evidencia actual indica la importancia de las AQPs en el mantenimiento de un medio ambiente osmótico interno estable, el cual es esencial para la actividad cerebral normal. Sin embargo, se sabe poco sobre la expresión y función de las AQPs en las células gliales del SNP. Con el fin de conocer el papel que juegan las AQPs en el SNP primero es importante determinar la localización de éstas para después tratar de definir su función. Por eso se llevará a cabo la localización de la AQP1 en el nervio ciático normal. Una vez definida su localización se puede tratar de inferir y estudiar la función de la AQP1 en las diferentes regiones en que se expresa esta acuaporina en los nervios periféricos.

IV. HIPÓTESIS

Dada la importancia de las acuaporinas en la regulación del agua para una homeostasis celular, es posible que la AQP1 presente patrones de distribución y localización polarizadas tanto en las CSFM como en las CSNFM.

V. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la expresión y localización de la AQP-1 en el sistema nervioso periférico del nervio ciático de la rata.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la expresión de AQP1, AQP2, AQP4 y AQP9 en el nervio ciático mediante RT-PCR.
- Determinar la localización de la AQP1 en las CSFM y CSNFM utilizando anticuerpos específicos para cada una de estas células haciendo dobles inmunohistoquímicas; esto con el fin de establecer si la AQP1 se expresa en las CSFM o en las CSNFM o en ambas.
- Dado que las CSFM son células polarizadas se determinará la expresión de AQP-1 en estas células realizando dobles inmunohistoquímicas utilizando anticuerpos específicos para cada una de las regiones presentes en las CSFM.

VI. IMPLICACIONES ÉTICAS

En el campo de la investigación se manejan criterios éticos bien establecidos a nivel internacional tanto científicos y biológicos inherentes a la investigación, destacando el respecto hacia los seres vivos involucrados en el trabajo experimental y la honestidad en la obtención de los resultados que serán dados a conocer a través de una publicación.

En este proyecto se respetarán las características que deben acompañar a toda investigación. El manejo honesto de los resultados obtenidos tanto en la observación como en la experimentación en harás de proporcionar información confiable sobre el conocimiento de las AQPs en el sistema nervioso.

Por otro lado, no se debe olvidar que la investigación en biología emplea modelos animales, encaminada a elucidar los mecanismos que controlan los procesos vitales del desarrollo, la función y el comportamiento e interacción de los seres vivos. Para poder emplear a los animales en el laboratorio es indispensable regular su manipulación ya que se trata de seres vivos.

VII. TIPO DE ESTUDIO

Experimental, descriptivo y prospectivo.

VIII. METODOLOGÍA

8.1 Material biológico

Se emplearon ratas Wistar macho de 200 a 300 g. Los animales fueron proporcionados por el bioterio del Instituto de Fisiología de la UNAM. Éstas fueron manejados de acuerdo con la norma oficial mexicana **NOM-062-ZOO-1999**.

8.2 Extracción de tejidos

El nervio ciático fue extraído en condiciones asépticas después de sacrificar al animal mediante la inhalación prolongada de éter etílico. Se cortó el nervio ciático por sus extremos tratando de que éste fuera lo más largo posible y evitando cortar una vena para no derramar sangre en el área. El nervio se colocó en una solución de PBS (2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 136.9 mM NaCl, 1.45 mM Na₂HPO₄ pH 7.4) para la extracción de RNA, proteínas y para la realización de laminillas usadas en inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

8.3 Extracción de RNA

El RNA de los tejidos (nervio ciático, riñón, pulmón, hígado y cerebro) se extrajo utilizando TRIZOL (GIBCO-BRL). Se colocó de 50-100 mg de tejido fresco de rata en 1 mL de TRizol, y se homogenizó perfectamente; se transfirió a un tubo limpio y se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4°C. El sobrenadante se incubó por 5 min de 15-30 °C. Posteriormente se adicionaron 0.2 mL de cloroformo alcohol isoamílico 24:1, se agitó vigorosamente, se incubó de 15-30 °C por 3 min y se centrifugó a 12,000 g por 15 min a 4 °C. La fase acuosa se transfirió a un tubo limpio y se agregaron 0.5mL de alcohol isopropílico, se incubó de 15-30°C por 10min y se centrifugó durante 5 min a 7,500 g a 4°C. Se decantó el sobrenadante y el precipitado de RNA se dejó secar de 5-10 min a temperatura ambiente. El precipitado se disolvió en 0.1 mL de agua ultrapura libre de RNasas y se incubó por 10 min a 55-60°C. La concentración de RNA de cada muestra se determinó por espectrofotometría a 750 nm. El RNA se almacenó a -70 °C hasta su uso.

8.4 Diseño de primers

Se diseñaron pares de oligonucleótidos o “primers” para efectuar la amplificación de AQP1, AQP2, AQP4 y AQP9 en el nervio ciático así como en otros tejidos. Los primers se diseñaron con el programa *Vector NTI advance*™ a partir de la secuencia de RNAm de cada AQP. La longitud de los primers fue de 20-25 pb, con un contenido de G-C de 50-55 %, temperatura de fusión (T_m) de 55-60 °C, diferencia en T_m menor de 2.0°C y en G-C menor de 5% para cada par de oligos. Los oligos diseñados tenían una longitud promedio de 200-500 pb. Además, se evitaron todos aquellos que formaran dímeros o estructuras secundarias con valores de energía libre menor a -2.0 Kcal/mol y 1.0 Kcal/mol respectivamente. Todos estos parámetros se tomaron en cuenta para obtener oligos que amplificaran de manera eficiente bajo las condiciones de PCR. Finalmente, se probó la especificidad de cada oligo utilizando el algoritmo de búsqueda de alineamiento de NCBI (Blast, Basic Local Alignment Search Tool) y se eligió únicamente el que presentó el coeficiente de alineamiento más alto.

8.5 Amplificación de RNA por RT-PCR

El RNA obtenido se empleó para realizar los ensayos de RT-PCR. Para realizar la conversión de RNA a DNA complementario (cDNA) se utilizó 1µl de *primers* y 500 ng de RNA. Las muestras se incubaron a 94 °C por 5 min. Posteriormente se adicionó la mezcla de reacción, la cual contiene 4 µl de buffer de RT (250mM Tris-HCL pH 8.3, 375mM KCl, 15 mM MgCl₂), 2µl de ditiotritol 0,1M (DTT), 0.9µl de transcriptasa reversa (40U/µl superScript II de GIBCO-BRL) y 0.7 µl de dNTPs 10mM. La secuencia de amplificación fue de 25 °C por 10 min, 42 °C durante 60 min y finalmente 70 °C por 15 min. EL cDNA se incubó durante 20 min con 0.8µl de ribonucleasa H (RNasa H 2U/µl, Invitrogen) a 37 °C para degradar las cadenas híbridas. Se emplearon 2 µl de cDNA para el ensayo de PCR con las condiciones de amplificación: 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 4 min, alineamiento a 56 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min. Las secuencias amplificadas se corrieron en un gel de agarosa al 2% teñidos con 0.5 µg/ml de EtBr. La visualización de los productos amplificados se realizó utilizando el programa *Kodak 1D Image Analysis Software 3.5 system* utilizando los parámetros estándar del programa. Los amplicones específicos fueron corroborados por

análisis de restricción empleando diferentes endonucleasas PsT1, Hinf I y Ava II (10U/ μ l, Promega,) a 37 °C.

8.6 Extracción de Proteínas

Se extrajeron proteínas totales de diferentes tejidos: riñón, nervio ciático, corteza cerebral, cerebelo, nervio óptico. Cada muestra se homogenizó con buffer de extracción de proteínas (2% SDS, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA y 5 mM Tris, pH 7.2) e inhibidores de proteasas (aprotinina, inhibidor de tripsina, leupetina (10 μ g/ml) y PMSF (100 μ M). Los tejidos fueron macerados 20 veces en un homogenizador, el homogenado se transfirió a un tubo de 1.5 ml y se hirvió durante 5 min. Una vez hervidas las muestras se centrifugaron a 10 000 rpm (9,600 g), 10 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Las proteínas se almacenaron a -70°C hasta su uso.

8.7 Cuantificación de proteínas

Para cuantificar las proteínas se empleó el kit Dc Protein Assay (Bio-Rad). Se realizó una curva estándar de concentraciones graduales de 0, 0.5, 1, 1.5 y 2 mg/ml de albúmina. Se tomaron 10 μ l de cada dilución, así como de cada una de las muestras y se agregaron 50 μ l del reactivo A' (20 μ l del reactivo S en 1 ml de reactivo A) y 400 μ l de reactivo B y se dejó reaccionar durante 15 min. Se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro SmartSpec™ Plus (Bio-Rad). Con las absorbancias obtenidas de la curva estándar se realizó una regresión lineal para obtener una curva que permitió calcular la concentración de proteína obtenida en cada una de las diferentes muestras. Se emplearon concentraciones de 5, 25 y 40 μ g.

8.8 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Para realizar la electroforesis se preparó un gel de poliacrilamida al 10%. Se colocaron 10 ml de “resolving gel” (10% acrilamida, 0.375 M Tris pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% AMPS y 0.04% TEMED) en la cámara de electroforesis. Una vez polimerizado se colocaron 2 ml de “stacking gel” al 4% (4% acrilamida, 0.126 M Tris pH 6.8 ,0.1% SDS, 0.1% AMPS 0.01% TEMED). En

seguida se colocó el peine de 10 pozos y se dejó polimerizar otros 20 min. Se colocó el buffer de corrida (0.025M Tris, 0.192M Glicina, 0.1% SDS, pH 8.5-8.7) y se cargaron las diferentes muestra en los pozos colocando las proteínas más el buffer de carga (0.125M Tris, 4% SDS, Glicerol, 10% mercaptoetanol) en cada uno, se corrieron a 40 mA durante 1 h.

8.9 Transferencia

Las proteínas fueron transferidas electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa Hybond–ECL (Amersham Biosciences) donde quedan inmovilizadas. El gel y la membrana se colocan entre papel filtro saturado de buffer de transferencia (0.025M Tris, 0.192M glicina, 20% metanol). Este “sándwich” se trasladó al equipo ECL Semi-Dry Transfer Unit (Amersham Biosciences) y se aplicaron 30V durante 60 min. Para asegurar la eficacia de la transferencia, la membrana fue teñida por 3 min con Rojo Ponceau S al 0.1 % en ácido tricloro acético.

9.0 Tinción con azul de Coomassie

La tinción con Coomassie (0.06% azul de Coomassie R-250, 30% metanol y 10% ácido acético) se llevó a cabo para teñir el gel después de haber realizado la transferencia y comprobar los residuos de proteína en éste. El gel permaneció con el colorante durante toda la noche y posteriormente se lavó con solución desteñidora (10% ácido acético) en un intervalo de 2 a 4 h y con agua corriente.

9.1 Western Blot

Después de la transferencia, la membrana se incubó en leche al 10% en TBST (10 mM Tris, 150 mM NaCl y 0.05% Tween, pH 8.0) durante toda la noche. Se colocó el anticuerpo primario conejo anti-AQP1 (1:300, Proteintech group) en TBST durante 3 hrs. Después la membrana se incubó con biotina anti-conejo (1:3000, Vector) en TBST durante 1h. Se incubó la membrana con el reactivo AB (Vectastain ABC kit, Vector), durante 30 min. Después de cada incubación se realizaron 3 lavados con TBST por 5 min. Para revelar la membrana, ésta se extendió entre dos acetatos y se colocó sobre la membrana el reactivo de Amersham ECL

(GE Healthcare) durante 2 min protegido de la luz. Posteriormente se coloca sobre el acetato una película de Hyperfilm ECL (GE Healthcare) por 3 min de exposición, para capturar la señal del anticuerpo. Después de retirar la película, se sumerge en un revelador “Kodak GBX Developer and replenisher” durante 1 min, se lava con agua 1 min, con fijador 1 min y finalmente con agua. Todo el procedimiento de revelado se realizó en un cuarto oscuro. Finalmente la membrana fue reutilizada, previo tratamiento con solución para desnudar membrana (10mM β -mercaptoetanol, 5mM Tris-HCl, SDS 2%), 30min a 50°C con anticuerpo primario ratón anti-actina (1:40.000, Millipore) y biotina anti-ratón (1:300) para normalización.

9.2 Inmunohistoquímica

En portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina se realizaron extensiones de nervio ciático con la finalidad de separar los nervios. Las laminillas preparadas con el tejido se dejaron secar al menos una hora y posteriormente se fijaron durante 10 min con metanol (Sigma-Aldrich) ó 15 min con paraformaldehído 4% (PF 4%) en buffer de fosfatos (0.1M NaH₂PO₄ y 0.1M Na₂HPO₄, pH 7.4). Se bloquearon con leche al 10% en PBS a 4 °C durante 3h. Posteriormente se colocó el primer anticuerpo conejo anti-AQP1 (1:500, Proteintech group) diluido en PBS, con 10 μ l de leche al 10% y 1.5 μ l de Tween 20 (Sigma), en cámara húmeda toda la noche a 4°C. Se colocó el reactivo AB (durante 30 min en cámara húmeda y posteriormente se reveló el marcaje con DAB (3,3'-diaminobenzidina, Sigma) durante 7 min. Después de cada incubación se realizan 3 lavados con PBS por 5 min. Las muestras fueron contrateñidas con Tionina (Sigma-Aldrich). Se colocaron en agua ultrapura durante un minuto y luego se tiñeron con tionina 1.3% durante 3.5 min. Después de dos lavados con agua ultrapura se colocaron en alcohol al 50%, 70%, 80%, 90% y alcohol absoluto cada uno durante un min, finalmente se colocaron en Xilol durante 2 min. Las muestras se montaron con Permout (Fisher Chemical) y se observaron en el microscopio óptico Olympus BX60.

9.3 Doble inmunofluorescencia

Para realizar dobles inmunofluorescencia se realizaron los mismos pasos que con la inmunohistoquímica descritos en la sección anterior hasta la incubación con el primer anticuerpo anti-AQP1. Posteriormente se colocó conejo anti-biotina (1:300) por 1 h y fluoresceína (1:1000) por 30 min. También se realizó el marcaje con ratón anti-GFAP (Proteína ácida fibrilar glial, 1:1500, Sigma-Aldrich), ratón anti-MBP (proteína básica de mielina, 1:500, Calbiochem), ratón anti-Ankirina G (1:300) y ratón anti-actina (1:1500, Sigma-Aldrich) todos se incubaron de 2-3 horas ó toda la noche en cámara húmeda, y posteriormente se colocó Alexa rojo 568 (1:3000, Invitrogen) incubado 1 h en frío, después de lavar con PBS se marcaron los núcleos con Hoechst 1X por 7 min, se lavó 3 veces con PBS y se montaron con VectaShield (Vector) para su observación en el microscopio de fluorescencia. Para el control negativo no se colocó el primer anticuerpo.

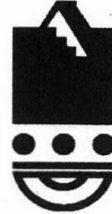
9.4 Toma de fotografías y análisis de imágenes

Para tomar las fotografías de los campos observados en el microscopio óptico de fluorescencia se utiliza una cámara Q Imaginig (QI Click) y las imágenes se analizan con el programa Q-Capture e Image J para Mac XO. Para los Western Blots se emplea una cámara Kodak DC290 ZOOM y las imágenes se analizan con el programa Kodak 1D versión 3.5.

IX. RESULTADOS

9.1 Carta de envío

CIENCIA
ergo sum



Revista Científica Multidisciplinaria de Prospectiva de la Universidad Autónoma del Estado de México

Toluca, México, 25 de Septiembre de 2013

PROFA. EDITH SEGURA ANAYA
PROF. ALEJANDRO MARTÍNEZ GÓMEZ
PROFA. MYRNA A. R. DENT
FACULTAD DE MEDICINA, UAEM
P R E S E N T E

Acuso recibo de su artículo "La AQPI se localiza en las incisuras de Schmidt-Lanterman y en la región paranodal del nervio ciático de la rata", registrado en esta dirección editorial en el expediente CES/12/2013. Su trabajo será turnado al comité editorial para su revisión, tan pronto tengamos alguna respuesta la haremos de su conocimiento.

Al someter su trabajo a CIENCIA *ergo sum* damos por entendido que no ha sido publicado y no será sometido a otra publicación antes de saber la decisión del Comité Editorial de nuestra revista. En cumplimiento de la norma ISO 9001-2008 les informamos que puede consultar el "Proceso de edición de revistas" que seguirá su colaboración desde este momento en el siguiente enlace:

http://ergosum.uaemex.mx/PROCEDIMIENTO_REVISTAS.pdf

Les agradezco su confianza en la revista y hago propicia la ocasión para enviarles un cordial saludo.

ATENTAMENTE

PATRIA, CIENCIA Y TRABAJO

"2013, 50 Aniversario Luctuoso del Poeta Heriberto Echeverría"



DIRECCION DE
DIVULGACION CULTURAL

DR. EDUARDO NORIA DE
EDITOR

c.c.p. Expediente.

Revista CIENCIA *ergo sum*, Secretaría de Difusión Cultural, UAEM
Instituto Literario 215, Col. 5 de Mayo, Toluca, México. C.P. 50090. Teléfonos y fax: 277 38 35 y 277 38 36

Correo electrónico: ciencia.ergosum@yahoo.com.mx Twitter: @CIENCIA_ergo sum <http://ergosum.uaemex.mx>

9.2 Manuscrito

La AQP1 se localiza en las incisuras de Schmidt-Lanterman y en la región paranodal del nervio ciático de la rata.

Edith Segura-Anaya^{1,2}, Alejandro Martínez-Gómez¹, Myrna Dent¹.

¹Laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México. Apartado Postal 428, C.P. 50000, Toluca, Edo. Méx., México.

²Programa de Maestría en Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma del Estado de México.

RESUMEN

Las acuaporinas (AQPs) son una familia de proteínas de membrana que forman canales de agua. Existen 13 tipos de acuaporinas, las cuales tienen una distribución diferente en los tejidos, con múltiples papeles fisiológicos. AQP1, AQP2, AQP4 y AQP9 se han encontrado en el sistema nervioso y están principalmente involucrados en el movimiento de agua del tejido nervioso. AQP1 se expresa principalmente en el plexo coroideo, AQP2 se encuentra en las fibras nerviosas, mientras que AQP4 y AQP9 están ampliamente localizados en las células astrogiales en el cerebro y la médula espinal. La expresión de acuaporinas en el sistema nervioso periférico ha sido poco estudiada. En este trabajo se mostró que AQP1 se expresa en el nervio ciático de la rata, tanto a nivel de ARNm como de proteína, pero no AQP2, AQP4 y AQP9. Mediante inmunohistoquímica AQP1 fue localizada tanto en las células de Schwann que forman mielina como en las que no forman. En las células de Schwann que forman mielina se localiza en las incisuras de Schmidt-Lanterman, así como en la región paranodal. Estos resultados sugieren que AQP1 se encuentra polarizada en el nervio ciático y podría tener un papel importante en el mantenimiento de la vaina de mielina y posiblemente en la propagación del impulso nervioso.

Palabras clave: Acuaporinas, células de Schwann, mielina.

ABSTRACT

The aquaporins (AQPs) are a family of water channels proteins. There are 13 types of aquaporins, which have a different distribution in tissues with multiple physiological roles. AQP1, AQP2, AQP4 and AQP9 have been found in the nervous system and are involved mainly in the water movement of the nervous tissue. AQP1 is mainly expressed in the choroid plexus, AQP2 is found in the nerve fibers while AQP4 and AQP9 are broadly localized in astroglial cells in brain and spinal cord. Aquaporins expression in the peripheral nervous system has been poorly studied. In the present study, the expression and localization of AQP1 was studied in the rat sciatic nerves. AQP1 was abundantly expressed within these nerves at both the protein and mRNA while AQP2, 4 y 9 were not found. Immunohistological analyses showed that AQP1 is localized in myelinating and nonmyelinating Schwann. In myelinating Schwann cells AQP1 is localized in the Schmidt-Lanterman Incisures (SLI) and in the paranodal region of the nodes of Ranvier. These results suggest that AQP1 is polarized in the sciatic nerve suggesting that AQP1 might play an important role in the maintenance of the myelin sheath and possibly in the propagation of the nerve impulse.

Key words: Aquaporin, Schwann cells, myelin

Correspondencia:

Prof. Myrna Dent M.D., Ph.D.
Laboratorio de Neurociencias
Facultad de Medicina Universidad Autónoma del Estado de México
Apartado Postal 428
C.P. 50000 Toluca, Edo. Méx.,
México
Tel: +52-722-2702899 ext: 222
Fax: +52-722-2174142
E-mail: mdent6@gmail.com

1. INTRODUCCIÓN

Las acuaporinas (AQPs) son una familia de proteínas de membrana que facilitan la difusión de agua a través de la membrana, expresadas en epitelios, endotelios y en muchos otros tipos celulares donde juegan un papel fisiológico muy importante (Verkman, 2008; Carbrey y Agre, 2009). En mamíferos se han descrito hasta el momento 13 AQPS (AQP 0-12) (Agre et al., 2002). En el cerebro y en la médula espinal se han reportado seis AQPs que incluyen AQP1, AQP3, AQP4, AQP5, AQP8 y AQP9 (Tait et al., 2008). Estudios en animales transgénicos revelan importantes funciones de AQP1 en la secreción del líquido cefalorraquídeo y en la sensación del dolor (Oshio et al., 2005; Zhang y Verkman, 2010). La AQP4, principal AQP en el SNC, participa principalmente en la formación del edema cerebral, la migración de astrocitos y la neuroexcitación (Papadopoulos y Verkman, 2013), mientras que la AQP9 se encuentra involucrada con el metabolismo energético (Zelenina, 2010).

En contraste, la expresión y función de las AQPs en el sistema nervioso periférico (SNP) ha sido menos estudiado. Mobasher y Marples (2004) reportaron la expresión de AQP1 en el SNP de humanos, mientras que Matsumoto *et al.* (2004) describieron la expresión de RNAm de AQP1 en el ganglio trigémino, ambos empleando microarreglos. (Mobasher y Marples, 2004). A la fecha se ha reportado la expresión de tres AQPs que incluyen AQP1, AQP2 y AQP4 localizadas en las neuronas o células gliales en los ganglios del trigémino, terminaciones periodontales de Ruffini, ganglios de la raíz dorsal, y el sistema nervioso entérico (Tonghui et al., 2012). Oshio et al. (2006) y Gao et al. (2006) demostraron la inmunolocalización de AQP1 en cortes de nervio ciático en humanos y en ratones respectivamente. Sin embargo, ningún estudio muestra datos claros de colocación con marcadores de neuronas o de células gliales, por lo que se desconoce si AQP1 se expresa en las de células de Schwann (CS) o en las fibras nerviosas. En el SNP se describen dos tipos de células gliales, células de Schwann (CS) que forman mielina (CSFM) y las que no forman mielina (CSNFM). Las CSFM se encuentran polarizadas ya que tienen adaptaciones estructurales y moleculares únicas que promueven la conducción saltatoria. La mielina del SNP contiene capas de membrana compacta, regiones con citoplasma de mielina no compacta,

la membrana abaxonal (externa), la membrana adaxonal (interna) y las regiones del nodo de Ranvier (Salzer et al., 2008). Los internodos también contienen una serie de canales citoplasmáticos conocidas como incisuras de Schmidt-Lanterman (ISL), que son una estructura cónica como embudo que atraviesa la mielina compacta. La arquitectura subcelular y molecular del nodo de Ranvier contiene regiones altamente diferenciadas (Salzer et al., 2008). En el presente estudio, se determinó por RT-PCR la expresión de la AQP1, AQP2, AQP4 y AQP9 en el nervio ciático de la rata mostrando que únicamente AQP1 se expresa en el nervio ciático tanto a nivel de RNAm como de proteína. Mediante inmunohistoquímica AQP1 se localiza tanto en las CSFM, como en las CSNFM. En las CSFM se expresa en forma polarizada, principalmente en las ISL y en los nodos de Ranvier, posiblemente en los paranodos, sugiriendo que AQP1 debe tener un papel importante en el mantenimiento de la vaina de mielina y posiblemente en la propagación del impulso nervioso.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon ratas Wistar macho de 200 a 300 g para obtener diferentes tejidos. Éstas fueron manejadas de acuerdo con la norma oficial mexicana para la producción, uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

Obtención de nervio ciático

El nervio ciático (NC) fue extraído en condiciones asépticas después de sacrificar al animal mediante la inhalación prolongada de éter etílico. El nervio se colocó en una solución de PBS (2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 136.9 mM NaCl, 1.45 mM Na₂HPO₄ pH 7.4) para la extracción de RNA, proteínas y para la realización de laminillas usadas en inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

RT PCR

El RNA total de los tejidos (nervio ciático, riñón, pulmón, hígado y cerebro) fue aislado utilizando TRIZOL (GIBCO-BRL). El DNA complementario (cDNA) fue generado a partir de 500 ng de RNA usando transcriptasa reversa (Superscript II, GIBCO-BRL) antes de ser

amplificado por PCR. Los *primers* usados en este estudio se encuentran en la Tabla 1. Se emplearon 2 μ l de cDNA de cada muestra la amplificación con cada par de primers. Se usó PCR estándar con el siguiente programa de amplificación: 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 4 min, alineamiento a 56 °C por 1min y extensión a 72 °C por 1 min. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa al 2% y visualizaron bajo luz UV. Los fragmentos obtenidos se digirieron empleando las endonucleasas (10U/ μ l, Promega) que se muestran en la Tabla 2.

Western blot

Se extrajeron proteínas totales de diferentes tejidos: riñón, nervio ciático, corteza cerebral, cerebelo y nervio óptico. Cada muestra fue solubilizada con buffer de extracción de proteínas (2% SDS, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA y 5 mM Tris, pH 7.2) e inhibidores de proteasas (aprotinina, inhibidor de tripsina, leupetina (10 μ g/ml) y PMSF (100 μ M). El lisado de proteínas fue centrifugado a 10 000 rpm (9,600 g), 10 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. La concentración de proteína fue cuantificada usando el kit Protein Assay (Bio-Rad) con albúmina bovina como estándar. Proteínas de riñón, corteza y nervios, 5, 25 y 40 μ g respectivamente fueron separadas por PAGE-SDS estándar en geles de poliacrilamida al 10% para posteriormente ser transferidas electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL (GE Healthcare) donde quedaron inmovilizadas. La membrana se incubó en leche al 10% en TBST (10 mM Tris, 150 mM NaCl y 0.05% Tween, pH 8.0) durante toda la noche. Posteriormente, la membrana se incubó con el anticuerpo primario conejo anti-AQP1 (1:300, Proteintech group) por 3 hrs, con biotina anti-conejo (1:3000, Vector) por 1h y con el reactivo AB (Vectastain ABC kit, Vector) por 30 min. Después de cada incubación se realizaron 3 lavados con TBST por 5 min. Para revelar la membrana se colocó el reactivo de Amersham ECL (GE Healthcare) durante 2 min protegido de la luz y la señal se captó con una película de Hyperfilm ECL (GE Healthcare) después de 3 min de exposición. Finalmente la membrana fue reutilizada, previo tratamiento con solución para desnudar membrana (10mM β -mercaptoetanol, 5mM Tris-HCl, SDS 2%) 30min a 50°C, con el anticuerpo primario ratón anti-actina (1:40.000, Millipore) y biotina anti-ratón (1:300) para normalización.

Inmunohistoquímica

Los nervios se colocaron sobre portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina y se separaron suavemente en una gota de PBS con agujas calibre 23 como se ha reportado anteriormente (Jessen y Mirsky, 1984). Las laminillas preparadas con el nervio fueron fijadas durante 10 min con metanol (Sigma-Aldrich). Se bloquearon con leche al 10% en PBS por 3h a 4°C. Posteriormente se colocó el primer anticuerpo conejo anti-AQP1 (1:500, Proteintech group) diluido en PBS, con 10 µl de leche al 10% y 1.5 µl de Tween 20 (Sigma), en cámara húmeda toda la noche a 4°C. Se colocó el reactivo AB durante 30 min en cámara húmeda y posteriormente se reveló el marcaje con DAB (3,3'-diaminobenzidina, Sigma) durante 7 min. Después de cada incubación se realizan 3 lavados con PBS por 5 min. Las muestras fueron contrateñidas con 1.3 % de Tionina (Sigma-Aldrich) durante 3.5 min. Después de dos lavados con agua ultrapura se colocaron en alcohol al 50%, 70%, 80%, 90% y alcohol absoluto cada uno durante un min y finalmente en Xilol durante 2 min. Las muestras se montaron con Permount (Fisher Chemical) y se observaron en el microscopio óptico Olympus BX60.

Doble Inmunofluorescencia

Para realizar dobles inmunofluorescencias se realizaron los mismos pasos que con la inmunohistoquímica descritos en la sección anterior hasta la incubación con el primer anticuerpo anti-AQP1. Posteriormente se colocó conejo anti-biotina (1:300) por 1 h y fluoresceína (1:1000) por 30 min. También se realizó el marcaje con ratón anti-GFAP (proteína ácida fibrilar glial; 1:1500, Sigma-Aldrich), ratón anti-MBP (proteína básica de mielina; 1:500, Calbiochem), ratón anti-Ankyrina G (1:300) y ratón anti-actina (1:1500, Sigma-Aldrich) todos se incubaron de 2-3 horas ó toda la noche en cámara húmeda. Posteriormente se colocó Alexa rojo 568 (1:3000, Invitrogen) incubado 1 h en frío, después de lavar con PBS se marcaron los núcleos con Hoechst por 7 min, se lavaron 3 veces con PBS y se montaron con VectaShield (Vector) para su observación en el microscopio de fluorescencia. Para el control negativo no se colocó el primer anticuerpo.

3. RESULTADOS

Expresión de AQPs en el SNP.

En este proyecto se estudió la localización de la AQP1 en el nervio ciático de la rata. Se realizaron ensayos de RT-PCR en el nervio ciático con AQP1, AQP4, AQP9 (por ser las principales AQPS estudiadas en SNC) y AQP2. Aunque muchos estudios sugieren que AQP2 se expresa exclusivamente en membranas apicales en los túbulos distales y colectores renales (Kwon et al., 2001) existe evidencia de que ésta tiene una localización extra-renal, que incluyen ciertas zonas tanto del SNC (células endoteliales, médula espinal, materia blanca subcortical e hipocampo) como del SNP (nervios periféricos) (Mobasheri et al., 2005).

Los resultados muestran una banda de 363 pb que corresponde al amplicón esperado de AQP1 tanto en el nervio ciático de la rata como en corazón, pulmón, riñón e hígado (Figura 1A). Aunque en el SNC se describe que AQP1 se encuentra principalmente en el plexo coroideo, encontramos que diferentes regiones del cerebro: hipocampo, bulbo olfatorio, corteza cerebral, cerebelo, médula espinal también expresan AQP1 a nivel de RNAm (Figura 1B). Para comprobar la autenticidad del producto amplificado el amplicón de 363 pb, se digirió con la enzima PsT1 la cual cortó en los dos fragmentos esperados de 90 y 274 pb (Figura 1C).

Con el fin de identificar la presencia de la proteína se llevó a cabo un Western blot con diferentes muestras. Para el caso del nervio ciático se emplearon 40 µg ya que se pensó que su presencia sería muy pobre en comparación con las muestras de corteza cerebral, cerebelo y bulbo olfatorio donde se emplearon 25 µg o en el caso de riñón (control positivo) con 5 µg. También se corrieron muestras de nervio óptico, a la misma concentración que el nervio ciático ya que únicamente se reporta la presencia de AQP4 y AQP9 en el nervio óptico (Dibas et al., 2010). Empleando el anticuerpo anti-AQP1 se observó la presencia de la banda de 28 KDa en todas las muestras estudiadas, incluyendo en nervio óptico, que corresponde a la AQP1 (Figura 2D). Se observa que al igual que con el RNA, a nivel de proteína AQP1 también se expresa en todos los tejidos estudiados. En riñón los niveles de AQP1 son muy elevados, pues aún cuando se trabajó con una concentración muy baja, la expresión de la

proteína es muy alta. Actina es una proteína abundante del citoesqueleto que se encuentra en todas las células (True et al., 1990), por lo que se empleó como control de carga.

Con el fin de determinar si otras AQP's se expresan en el nervio ciático se llevaron a cabo ensayos de RT-PCR para las AQP's 2, 4 y 9 (Figura 2). cDNA preparado no solo de nervio ciático sino también de cerebelo, riñón y bazo fueron amplificados usando *primers* de rata para las AQP's 2, 4 y 9 (Tabla 1). La Figura 2A muestra los fragmentos amplificados tanto de nervio ciático como de tejidos control. La AQP2 se expresa en riñón, pero no así en nervio ciático y cerebelo. La AQP4 se expresa en riñón, pero no en bazo ni nervio ciático; en tanto AQP9 se encuentra en cerebelo y bazo, pero no está ni en riñón ni en nervio ciático. En conclusión AQP2, AQP4 y AQP9 no se expresan en el nervio ciático y se confirman las diferencias de expresión de las AQP's entre el SNC y el SNP. Para determinar la autenticidad de los productos amplificados se realizó un análisis de restricción de cada uno de ellos. En todos los casos se obtuvieron los fragmentos esperados para cada uno de los productos amplificados (Figura 2 B y Tabla 2).

Con la finalidad de determinar la especificidad del anticuerpo anti-AQP1 utilizado, se realizaron inmunohistoquímicas en cortes histológicos de riñón, AQP1 se localiza sólo en el borde apical y basolateral de los túbulos proximales (Figura 3A y B), en concordancia con lo reportado (Nielsen et al., 1993)

Expresión de AQP1 por inmunohistoquímica

Dado que por RT-PCR y Western Blot se observa la expresión y traducción de AQP1 en el nervio ciático se realizaron inmunofluorescencias para determinar su localización. La Figura 4 muestra el patrón de marcaje del anticuerpo anti-AQP1 en el nervio ciático. AQP1 se encuentra tanto en las CSNFM como en las CSFM. Las CSNFM presentan un marcaje abundante, en todas las preparaciones (Figura 4A), al observarlas detalladamente se observa que el patrón de marcaje es granular y muy intenso a lo largo de toda la célula. En las CSFM AQP1 se localiza principalmente en las ISL (Figura 4B, C y D) y en los nodos de Ranvier (Figura 4C y E). El patrón de localización que encierra la región nodal es muy particular, pues

a diferencia de otras proteínas como actina, la distribución es asimétrica, es decir, en una gran proporción de nodos observamos que una parte del nodo se encuentra más marcada que la otra (Figura 4C y E). Cabe señalar que la presencia de las ISL marcadas con AQP1 en los nervios es muy intensa, se aprecian entre 17- 22 ISL por internodo, destacando que su distribución no es equidistante, y pueden presentarse incluso cerca del núcleo de la célula (Figura 4B y G). Morfológicamente encontramos que las ISL tienen forma de embudo o cono que forman canales en la mielina, pueden encontrarse en dirección opuesta y tienen una longitud variable además coinciden, en muchos casos, con la formación de varicosidades en la fibra nerviosa (Figura 4D), esto coincide con lo reportado en la literatura (Ramol y Cajal, 1928). En la Figura 4G se muestra una reconstrucción de una fibra nerviosa mielinizada teñida con DAB en la que se aprecia la presencia de 17 ISL dentro del internodo, todos presentan el marcaje intenso de la proteína y se observa que su distribución no es equidistante, los nodos que se encuentran a los extremos del internodo mostraron el marcaje asimétrico descrito anteriormente. Reynold y Heath (1995) dividieron el internodo en 4 regiones R1, R2, R3 y R4 que van de la región proximal a la distal. El núcleo, está en el centro divide a la región R2 y R3. Si el internodo de la Figura 4G se regionaliza de la misma manera el número de incisuras marcadas con AQP1 es R1=5, R2=4, R3=6 y R4=2, es decir, nuestros resultados coinciden con Reynolds y Heath ya que el número de incisuras va $R3 > R1 > R2 > R4$ sugiriendo que se tiene la misma polaridad y que todas las incisuras se marcan con AQP1. En el control (sin el anticuerpo primario anti-AQP1) no hay marcaje en las células, únicamente los núcleos teñidos con tiónina (Figura 4F). En conjunto, estos resultados indican que AQP1 se expresa en ambos tipos celulares, con una localización restringida a las ISL y a la zona nodal en las CSFM.

Expresión de AQPs haciendo dobles inmunofluorescencias

Para determinar específicamente la localización de la AQP1 se realizaron ensayos de dobles inmunofluorescencias empleando anticuerpos específicos para las CSNFM, así como para las diferentes regiones de las CSFM, como son las ISL, la mielina y la región nodal.

Se llevó a cabo el doble marcaje empleando anti-AQP1 (Figura 5A) y anti-GFAP (Figura 5B) el cual es un marcador específico de CSNFM. Como se observa en la Figura 5D ambas moléculas colocalizan, es decir que existe expresión de AQP1 en las CSNFM.

En las CSFM, la AQP1 se aprecia en la región de mielina no compacta que incluye las ISL y la región nodal. La morfología de las ISL marcadas con AQP1 (Figura 6A) tiene mucha similitud con los dibujos hechos por Ramón y Cajal en 1928. (Figura 6B). Empleando doble marcaje de AQP1 con MBP (que marca mielina) o actina (que se expresa en las ISL) se puede apreciar la localización de AQP1 en las ISL. Se observa el marcaje de AQP1 entre la mielina marcada con MBP (Figura 7A, B y C) y la colocalización de AQP1 y actina en las ISL (Figura 7D, E y F)

También se observó la presencia de AQP1 en los nodos de Ranvier. El marcaje con anti-MBP limita en el internodo a la proteína MBP (Figura 8A') dejando libre o sin marcaje las zonas nodales que son ocupadas por AQP1 (Figura 8A, A''). A diferencia de las inmunofluorescencias realizadas contra AQP1 (Figura 8B) y β -actina (Figura 8B') que colocalizan la región paranodal (Figura 8B''). En la figura 8B'' se observa no solo el empalme de ambas proteínas, sino también la asimetría de marcaje que presenta AQP1 (Figura 8B) comparado con actina (Figura 8B'). Un marcador de la región nodal es Ankirina G (Ank G), proteína que actúa como adaptador entre las proteínas de membrana y el citoesqueleto de actina y microtúbulos (Bennett y Lambert, 1999). El marcaje de Ank G en el axón se localiza justo en la región nodal con la apariencia de dos puntos (Figura 8C') al realizar el empalme del marcaje de AQP1 y Ank G (Figura 8C'') se observa que aún cuando ambas proteínas se localizan en los nodos, su polaridad es diferente. Es decir, Ank G presenta localización nodal, y AQP1 tiene un localización paranodal. Una fibra nerviosa es mielinizada por varias CS formando cada una un internodo, en las preparaciones realizadas con estos nervios se encontró un marcaje muy peculiar, si AQP1 en un internodo marca fuerte las ISL y la región paranodal, el siguiente también presenta marcaje en las ISL y el nodo, pero la intensidad es menor con respecto al internodo anterior, pero el siguiente se marca más intenso, seguido de uno menos intenso. Es decir, en un nodo la expresión asimétrica de AQP1 es en la parte proximal y en el siguiente en la distal y así sucesivamente, generando un marcaje en forma de domino. Por ello

se observa que en la región nodal, que comprende dos extremos de los internodos, el marcaje es asimétrico.

4. DISCUSIÓN

En este estudio, se emplearon técnicas de RT-PCR, Western blot e inmunofluorescencias para describir la expresión e inmunolocalización de 4 tipos de AQPs (AQP1, 2, 4 y 9) en el nervio ciático. Se demostró que AQP1 es la única AQP presente en el nervio ciático de la rata, ya que de las 4 AQPs estudiadas solo encontramos niveles de expresión de RNAm y de proteína de AQP1, pero no de AQP2, AQP4 y AQP9. Gao et al. tampoco encontraron AQP4 en el SNP, mientras que Mobasher y Marples (2005) mediante microarreglos describieron moderada expresión de AQP2 en el nervio ciático. Algo interesante, es que AQP1 se exprese en el nervio óptico, además de las reportadas AQP4 y AQP9, es decir en el nervio óptico se expresan las tres AQPs, mientras que en el nervio ciático sólo se exprese AQP1. Es interesante también, que AQP4 a pesar de ser la AQP más importante del SNC, no se exprese en el nervio ciático. AQP2 se ha reportado en la transmisión del dolor mostrando que existen cambios en la expresión de ésta en el ganglio trigémino durante la inflamación aguda (Borsani, et al., 2009); Buffolli et al., 2009). Habría que explorar si en condiciones de dolor AQP2 se expresa en el nervio ciático. AQP1 tiene una notable distribución en el SNC y una localización particular en el SNP. Estudios previos mostraron la presencia de AQP1 en cortes del sistema nervioso entérico, de los ganglios dorsales y trigémino y del nervio ciático (Gao et al., 2006). Sin embargo, no existe el reporte de la localización precisa de ésta proteína en el nervio ciático. Dado que el sistema que se utilizó en este trabajo permite separar las fibras nerviosas fue posible identificar la localización de la AQP1 en las células de Schwann. Los resultados muestran que tanto las CSFM como las CSNFM expresan AQP1. Estudios funcionales utilizando el modelo murino revelan el papel de AQP1 en la recepción del dolor (Borsani, 2010). Los axones no mielinizados agrupados por las CSNFM transmiten el dolor, y se encontró que todas estas células expresan AQP1 sugiriendo que AQP1 puede tener un papel en el dolor también. En el caso de las CSFM AQP1 se expresa en forma polarizada, principalmente en las ISL y en la región paranodal. Ambas son regiones de mielina no

compacta en las cuales uniones gap autotípicas conectan cada membrana adyacente para formar canales citoplasmáticos. Por sus características estructurales, estas regiones probablemente facilitan el transporte de nutrientes, moléculas y electrólitos tanto a la mielina como a la región periaxonal del internodo (Balice-Gordon et al., 1998; Meier et al., 2004).

Nuestros resultados muestran que en condiciones normales, cada nodo contiene AQP1, pero muestra una asimetría y un patrón de domino en el marcaje, aunque no se puede sugerir a qué se debe este comportamiento, seguramente debe jugar un papel importante en el mantenimiento y regulación de ciertos canales y concentraciones iónicas en los nodos de Ranvier. Las CS mantienen una relación 1:1 con el axón y forman la mielina por el enrollamiento alrededor del axón, de varias capas de la membrana de la CS, en forma de espiral (Jessen y Mirsky, 2005). Estos cambios morfológicos de la CS son mediados por el citoesqueleto de actina. Al terminar la mielinización los filamentos de actina permanecen principalmente en el mesaxon, las ISL y en las regiones nodales, igual que la localización de AQP1, sugiriendo que tanto el citoesqueleto de actina como los canales de agua pueden ser importantes en el mantenimiento y en la estructura de las vainas de mielina (Trapp, 1990). El citoesqueleto de actina y su reorganización son requeridos para la regulación de ciertos canales y su movimiento intracelular (Noda y Sasaki, 2008).

A la fecha, no es muy claro cómo se regula el número de ISL tanto en condiciones normales como patológicas. En condiciones normales, el número de incisuras se correlaciona con el diámetro del axón y con la edad (Ghabriel y Allt, 1981; Hiscoe, 1947). En el presente estudio observamos alrededor de 17-22 ISL marcados con AQP1 y la forma de cono coincide con la morfología de Ramón y Cajal (1928). La abundante localización de AQP1 en las ISL sugiere un papel en el mantenimiento de la vaina de mielina permitiendo que tanto el axón como la mielina tengan la capacidad de ensancharse por ejemplo durante el transporte de organelos y vesículas en los axones. Esta hipótesis se sustenta debido a que la célula en un medio isotónico, como es PBS, presenta la rápida aparición de varicosidades, un ensanchamiento visible que deforma la fibra miélica de la CS el cual podría ser ocasionado por un aumento en el volumen de agua en el interior de la célula a través de las AQPs. La presencia de varicosidades no es exclusivo del SNP, también se ha reportado este fenómeno en células del

SNC. En astrocitos y médula espinal, después de un evento traumático, se genera un ensanchamiento de la célula y se ha demostrado la intervención de canales de agua, aunque no es la AQP1 la responsable, sino la AQP4 (Kitaura e al., 2009). Las varicosidades que se observan en las fibras mielínicas en condiciones normales coinciden con la localización de las ISL, por otro lado, se ha observado que durante la degeneración Walleriana la fragmentación de la mielina en ovoides ocurre al lado de las incisuras (Webster, 1965; Ghabriel y Allt, 1979). Jung et al. (2011) encontraron que la polimerización de los fragmentos de actina ocurre en las ISL del nervio ciático de ratones después de una lesión y su inhibición con compuestos como citocalasina D previene la formación de los ovoides de mielina. Dado que observamos colocalización de ambas proteínas sería interesante observar qué ocurre con AQP1 cuando se bloquea actina tanto en condiciones normales como durante la degeneración Walleriana, posiblemente AQP1 es importante en la fragmentación de la mielina después de que se produce una lesión. Aunque no se realizó una cuantificación rigurosa de la intensidad del marcaje de AQP1 en las ISL y en los nodos, éste es comparable con el obtenido con actina. El hecho de que AQP1 y actina presenten un patrón de localización y distribución semejante en las CSFM, sugiere que AQP1 está localizada en la región paranodal, como se encuentra actina, y que existe una interacción entre ambas proteínas para lograr su anclaje en la membrana de la célula.

5. CONCLUSIONES

En conclusión, AQP1 se expresa en el nervio ciático de la rata, tanto a nivel de RNAm como de proteína. Se localiza en ambas células gliales, CSFM y CSNFM. En las CSFM se encuentra en regiones de mielina no compacta, en las ISL y en los nodo de Ranvier. En los nodos de Ranvier tiene una distribución asimétrica en las regiones nodales y se localiza en la región paranodal.

6. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Universidad Autónoma del Estado de México proyecto 3215/2012CHT.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen (2002). Aquaporin water channels from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol.* Jul 1;542:3-16.
- Balice-Gordon RJ, Bone LJ, Scherer SS (1998). Functional gap junctions in the Schwann cell myelin sheath. *J Cell Biol* 142:1095-1104
- Bennett V, Lambert S. 1999. Physiological roles of axonal ankyrins in survival of premyelinated axons and localization of voltage-gated sodium channels. *J Neurocytol* 28:303-318.
- Borsani E, Bernardi S, Albertini R, Rezzani R, Rodella LF (2009). Alterations of AQP2 expression in trigeminal ganglia in a murine inflammation model *Neurosci Lett.* 16;449(3):183-818.
- Borsani E. (2010). Aquaporins in sensory and pain transmission. *Curr Neuropharmacol.* 8(2):122-7.
- Buffolli B, Borsani E, Rezzani R and Rodella LF (2009). Chronic construction injury induces aquaporin-2 expression in the dorsal root ganglia of rats. *J Anat.* 215(5): 498-505
- Carbrey JM, Agre P. (2009). Discovery of the aquaporins and development of the field. *Handb Exp Pharmacol.*190: 3–28.
- Dibas A, Oku H, Fukuhara M, Kurimoto T, Ikeda T, Patil RV, Sharif NA, Yorio (2010). Changes in ocular aquaporin expression following optic nerve crush. *Mol Vis.* 3;16:330-40.
- Gao, H., He Ch., Fang, X., Hou, X., Feng, X., Yang, H., Zhao, X., Ma T. (2006) Localization of aquaporin-1 water channel in glial cells of the human peripheral nervous system. *Glia* 53: 783-787.
- Ghabriel MN, Allt G (1979) The role of Schmidt-Lanterman incisures in Wallerian degeneration. An electron microscopic study. *Acta Neuropathol* 48:95–103.
- Ghabriel MN, Allt G. (1981). Incisures of Schmidt–Lanterman. *Prog Neurobiol* 17(1/2): 25–58.

- Hiscoe HB. (1947). Distribution of nodes and incisures in normal and regenerated nerve fibers. *Anatomical Record* 99:28.
- Jessen KR, Mirsky R (1984). Nonmyelin-forming Schwann cells coexpress surface proteins and intermediate filaments not found in myelin-forming cells: a study of Ran-2, A5E3 antigen and glial fibrillary acidic protein. *J Neurocytol.* 13(6):923-34.
- Jessen, KR., Mirsky R. (2005). The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nature Rev. Neurosci.* 6:671682.
- Jung J, Cai W, Lee HK, Pellegatta M, Shin YK, Jang SY, Suh DJ, Wrabetz L, Feltri ML, Park HT. (2011). Actin polymerization is essential for myelin sheath fragmentation during Wallerian degeneration. *J Neurosci.* 31(6):2009-15.
- Kitaura H, Tsujita M, Huber VJ, Kakita A, Shibuki K, Sakimura K, Kwee IL, Nakada T. (2009). Activity-dependent glial swelling is impaired in aquaporin-4 knockout mice. *Neurosci Res.* 2009 Jun;64(2):208-12.
- Kwon TH, Hager H, Nejsum LN, Andersen ML, Frøkiaer J, Nielsen S (2001). Physiology and pathophysiology of renal aquaporins. *Semin Nephrol.* 21(3):231-8.
- Matsumoto, I., Nagamatsu, N., Arai, S., Emori, Y., Abe, K. (2004). Identification of candidate genes involved in somatosensory functions of cranial sensory ganglia. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 126, 98–102.
- Mobasheri, A and Marples D. (2004) Expression of the AQP-1 water channel in normal human tissues: a semiquantitative study using tissue microarray technology. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286(3):C529-37.
- Meier C, Dermietzel R, Davidson KG, Yasumura T, Rash JE. 2004. Connexin32-containing gap junctions in Schwann cells at the internodal zone of partial myelin compaction and in Schmidt–Lanterman incisures. *J Neurosci* 24:3186–3198.
- Mobasheri A, Wray S, Marples D (2005). Distribution of AQP2 and AQP3 water channels in human tissue microarrays. *J Mol Histol.* 36(1-2):1-14.
- Nielsen S, Smith BL, Christensen EI, Knepper MA, Agre P. (1993). CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. *J Cell Biol.* 120(2):371-83.

- Noda Y, Sasaki S (2008). Actin-binding channels. *Prog Brain Res.* 2008;170:551-7
- Oshio, K., Watanabe, H., Song, Y., Verkman, A.S., Manley, G.T. 2005. Reduced cerebrospinal fluid production and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel aquaporin-1. *FASEB J.* 19, 76–78.
- Oshio K, Watanabe H, Yan D, Verkman As, Manley GT. (2006). Impaired pain sensation in mice lacking Aquaporin-1 water channels. *Biochem Biophys Res Commun* 341: 1022-1028.
- Papadopoulus MC., and Verkman AS. (2013) Aquaporin water channels in the nervous system. *Nature Rev. Neurosc.* 6,671-682.
- Ramón y Cajal S. (1928). *Cajal's degenretation & regeneration of the nervous system.* Raul M. May Trad. Oxford University Press 1991. pp 52-60.
- Reynolds RJ, Heath JW. (1995). Patterns of morphological variation within myelin internodes of normal peripheral nerve: quantitative analysis by confocal microscopy. *J Anat.* 187 (Pt 2):369-78
- Salzer, JL., Brophy PJ y Peles E. (2008). Molecular domains of myelinated axons in the peripheral nervous system. *Glia.* 56:1532-40
- Tait, M.J., Saadoun, S., Bell, B.A., Papadopoulos, M.C (2008). Water movements in the brain: role of aquaporins. *Trends Neurosci.* 31, 37–43.
- Tonghui Ma , Hongwen Gao, Xuedong Fang, Hong Yang. (2012). Water channel proteins in the peripheral nervous system in health and disease. *Mol Aspects Med.* 33 (5-6):605-11.
- Trapp BD. 1990. The myelin-associated glycoprotein: location and potential functions. In: Colman D, Duncan I, Skoff R, editors. *Myelination and dysmyelination.* New York: The New York Academy of Sciences. pp 29–43.
- True, L.D. (1990). *Atlas of diagnostic immunopathology.* Grove Medical Publishing, N.Y.:6.5
- Verkman AS. (2008). Mammalian aquaporins: diverse physiological roles and potencial clinical significance. *Expert Rev Mol Med.* 10:13.

- Webster HF (1965). The relationship between Schmidt-Lantermann and myelin segmentation during Wallerian degeneration. *Ann NY Acad Sci* 122:29-38.
- Zelenina, M (2010) Regulation of brain aquaporins. *Neurochem Int.* doi: 10.1016/j.neuint.2010.03.022.
- Zhang, H., Verkman, A.S. (2010). Aquaporin-1 tunes pain perception by interaction with Na(v)1.8 Na⁺ channels in dorsal root ganglion neurons. *J. Biol. Chem.* 285, 5896–5906.

8. TABLAS

	PRIMER SENTIDO	PRIMER ANTISENTIDO	LONGITUD AMPLICÓN
AQP1	TCTGAGCATCGCTACCTCTGG	AGAGCCACAGACAAGCCAA	363pb
AQP2	GGTTGCCATGTCTCCTTC	AGAGGAGGGAGCCGATGATG	424pb
AQP4	TTCAAAGGCGTCTGGACTCAAG	GCAACGGAACCAGTAACATCAGTC	494pb
AQP9	CTGAGAAGGACGGTG CCAAGAA	GCAAAGACGATCAGAAGGAGGAAC	526pb

Tabla 1. Pares de primers diseñados contra las AQPS 1, 2, 4 y 9 en rata. Se muestra la secuencia de cada uno de los oligonucleótidos y los tamaños de los amplicones generados.

AQP	Amplicón	Enzima	Fragmentos Digeridos
AQP1	363 pb	PsT-I	274/104
AQP2	424 pb	Hinf-I	319/105
AQP4	494 pb	Ava-II	354/136
AQP9	526 pb	Ava-II	395/135

Tabla 2. Enzimas y fragmentos obtenidos para el análisis de los amplicones generados de las AQPs 1, 2, 4 y 9. Se muestra el tamaño de los amplicones obtenidos para cada AQP, así como las enzimas utilizadas para digerirlos y el tamaño de los fragmentos obtenidos para cada caso.

9. PIES DE FIGURA

Figura 1. Análisis de la expresión de AQP1. Los productos amplificados de diferentes tejidos de RNA de nervio ciático, corazón, pulmón, riñón e hígado (A) y de diferentes regiones cerebrales: corteza cerebral, hipocampo, bulbo olfatorio y médula espinal (B) fueron analizados en geles de agarosa al 2%. Todas las muestras amplifican la secuencia de 363pb correspondiente a AQP1. (M) Marcador de peso molecular de 50 pb. (C) El fragmento amplificado de 363pb fue digerido con la enzima PsT1. Se observa la banda de 363pb sin digerir y los dos fragmentos de 90 y 274 pb obtenidos con la digestión analizados en un gel de agarosa al 3%. (D) Mediante western blot (WB) se observa la presencia de la proteína AQP1 (28 KDa) en nervio ciático (NC), nervio óptico (NO), corteza cerebral (Co), cerebelo (Ce), bulbo olfatorio (BO) y riñón (R), este último fue empleado como control positivo. β -actina (42 kDa) se usó como control de carga.

Figura 2. Análisis de la expresión de las AQPs 2, 4 y 9 en el SNP. (A) Muestras de RNA de nervio ciático, cerebelo, riñón, y bazo fueron amplificadas empleando primers para los tres diferentes tipos de AQPs. Se observa la banda de 424pb de AQP2 sólo en riñón. AQP4 de 494pb amplifica en cerebelo y riñón y AQP9 de 526pb sólo se expresa en cerebelo y bazo. Ninguna de las AQPs se expresan en el nervio ciático de la rata. (B) Se muestran los fragmentos sin digerir de cada AQP seguido de los fragmentos obtenidos por la digestión de Hinf-I para AQP2 y Ava-II para AQP4 y AQP9. Los fragmentos fueron analizados en geles de agarosa al 3%.

Figura 3. Localización de AQP1 en el riñón de la rata. (A) Se observa marcaje de anti-AQP1 en los túbulos proximales (flecha) de la corteza renal. (B) En ausencia del anticuerpo no hay marcaje en las células. Barra: 100 μ m

Figura 4. Distribución del marcaje de AQP1 en el nervio ciático de la rata. AQP1 se observa en las CSNFM (A) y en las ISL (B, C y D; puntas de flecha), las cuales se distribuyen a lo largo del internodo y presentan una morfología característica en forma de embudo (D), se encuentran incluso abajo del núcleo de la célula (B). Cuando la célula presenta varicosidades se aprecia que las ISL juegan un papel en la formación de éstas (D). AQP1 también marca la región nodal y se aprecia que la distribución es asimétrica (C y E; flecha). En ausencia de anticuerpo primario no existe marcaje de AQP1, sólo el marcaje de los núcleos con tionina (F). Reconstrucción de una fibra nerviosa mielínica marcada con AQP1 (G). La división del internodo en 4 regiones, desde la parte proximal a la distal, donde se ubican los nodos de Ranvier (N), muestra que el número de incisuras marcadas con AQP1 es R1=5, R2=4, R3=6 y R4=2. El núcleo (Nu) está en el centro y divide R2 y R3. Barra: 50µm

Figura 5. Doble inmunofluorescencia de AQP1 (verde) y GFAP (rojo). Preparaciones de nervio ciático fueron marcadas tanto en presencia de anti-AQP1 (A), anti-GFAP, (B) y Hoechst (C). El marcaje de AQP1 colocaliza con GFAP (D). Barra: 50µm

Figura 6. Identificación de AQP1 en las ISL del nervio ciático por fluorescencia. (A) En CSFM se observa que la distribución de AQP1 se localiza en las ISL (flechas) y en la región nodal (asterisco). Nótese que la morfología de las ISL obtenidas con el marcaje de AQP1 presenta gran homología con el dibujo de Ramón y Cajal (1928) (B) tienen forma de segmentos cónicos-cilíndricos de longitud variable. Barra: 50µm

Figura 7. Doble inmunofluorescencia de AQP1 con MBP y actina. Preparaciones de nervio ciático fueron marcadas con anti-AQP1 (A y D), anti- MBP (B) y anti- β -actina (E). Montaje de AQP1 y MBP (C). AQP1 colocaliza con β -actina en las ISL (F). Barra: 50µm

Figura 8. Doble inmunofluorescencia de AQP1 con MBP, actina y Ank G.

Preparaciones de nervio ciático fueron marcadas con anti-AQP1 (A, B, C), anti-MBP (A', A''), anti- β -actina (B', B'') y anti-AnkG (C', C''). Nótese que la interrupción del marcaje con MBP en la zona nodal es ocupado por AQP1 (A'). Actina (B') colocaliza con AQP1 en la región paranodal (B''). AnkG marca la región nodal de la CS (C') y no colocaliza con AQP1 (C''). Barra: 50 μ m

10. FIGURAS

FIGURA 1.

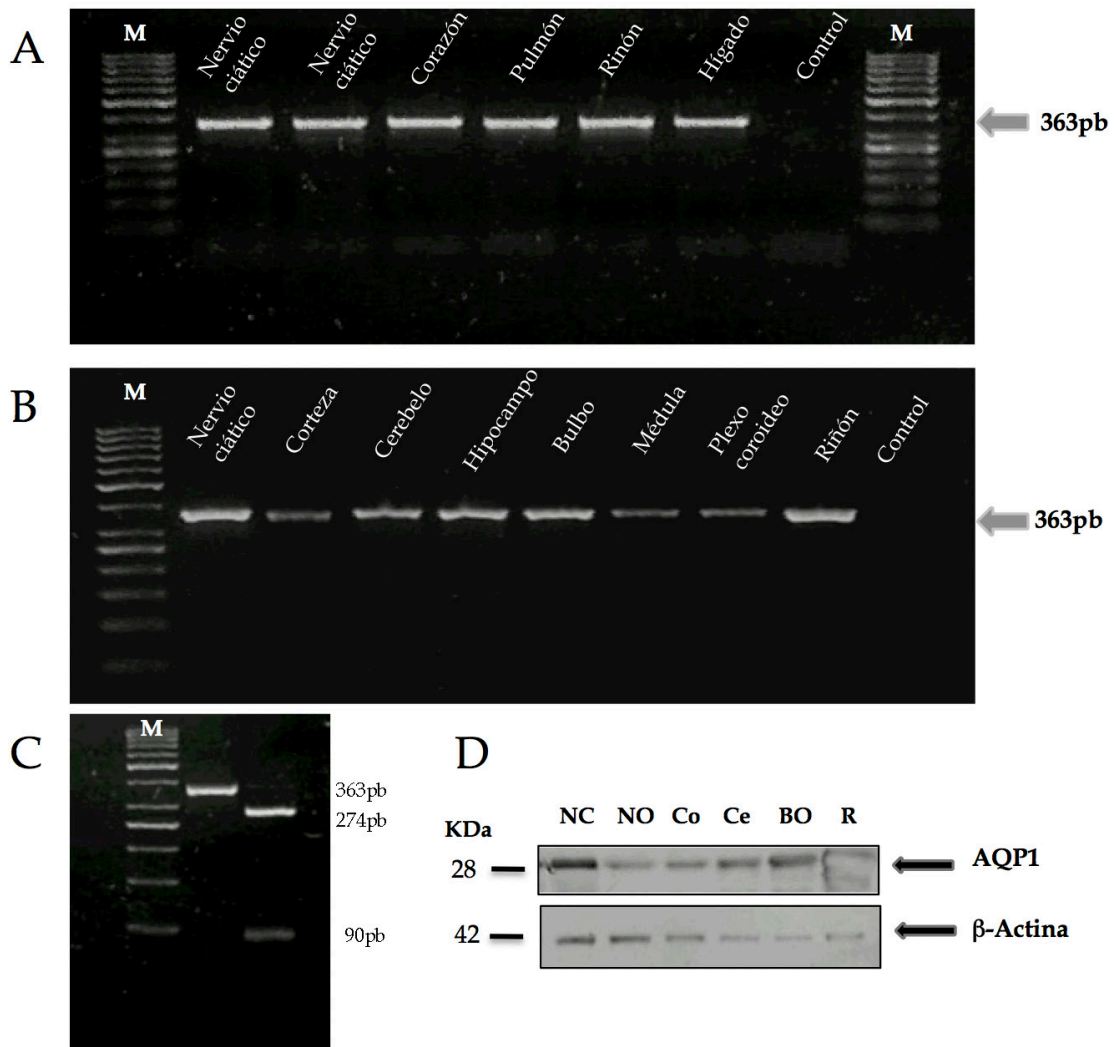


FIGURA 2.

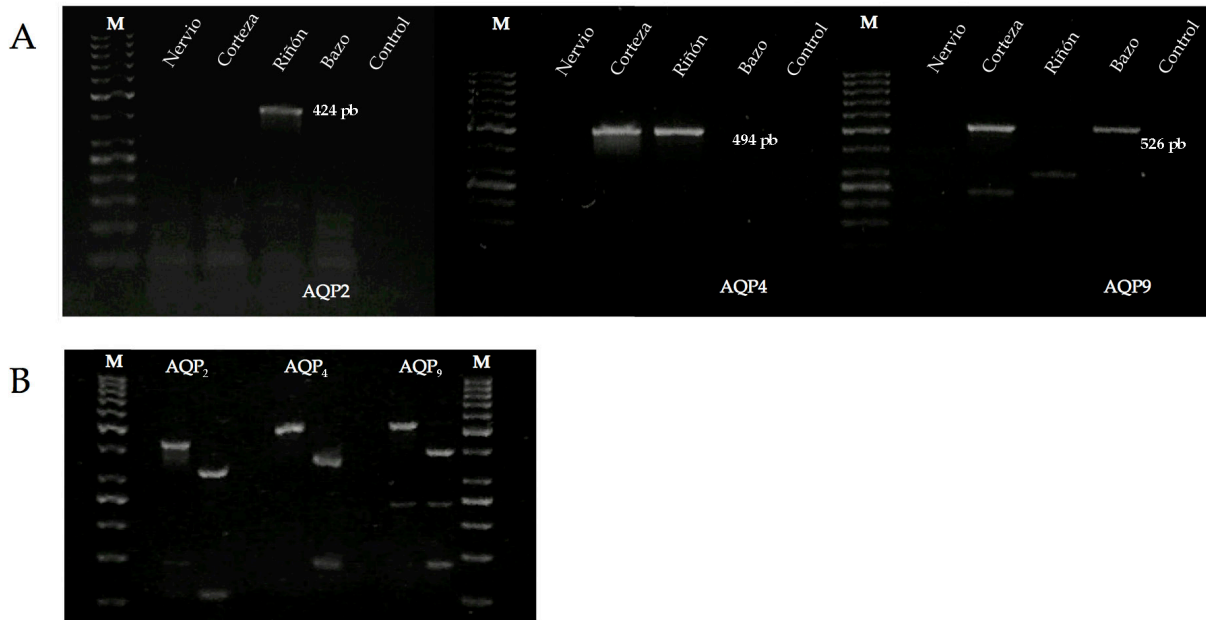


FIGURA 3.

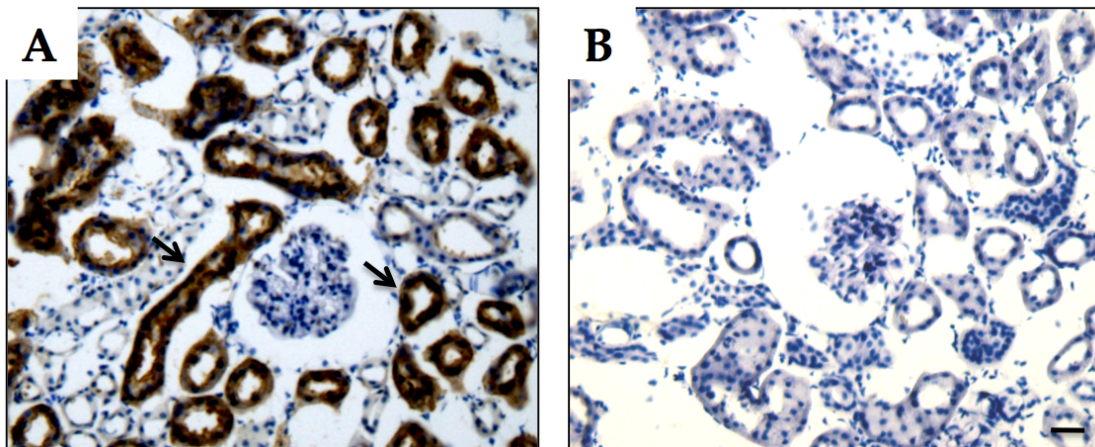


FIGURA 4.

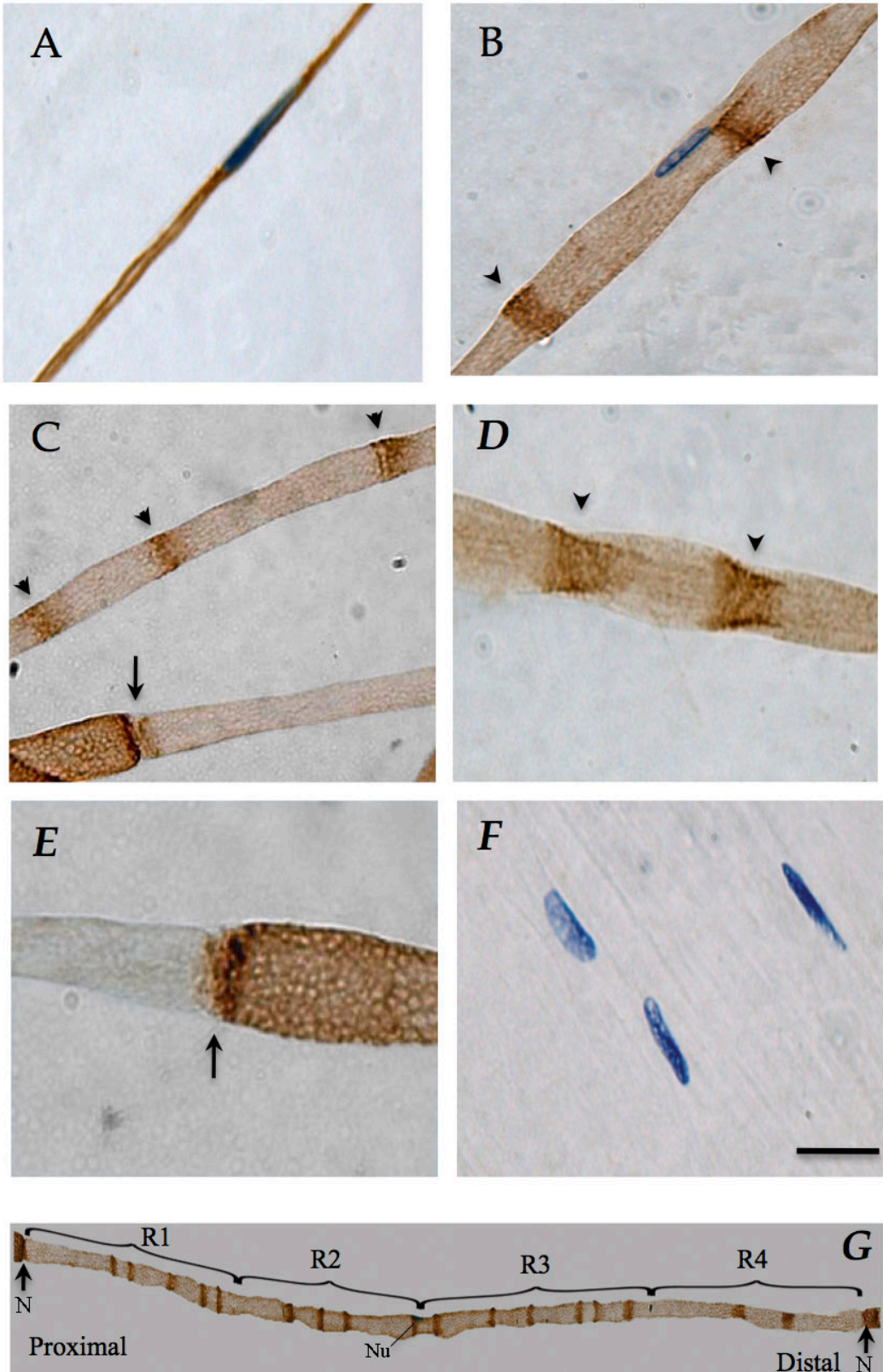


FIGURA 5.

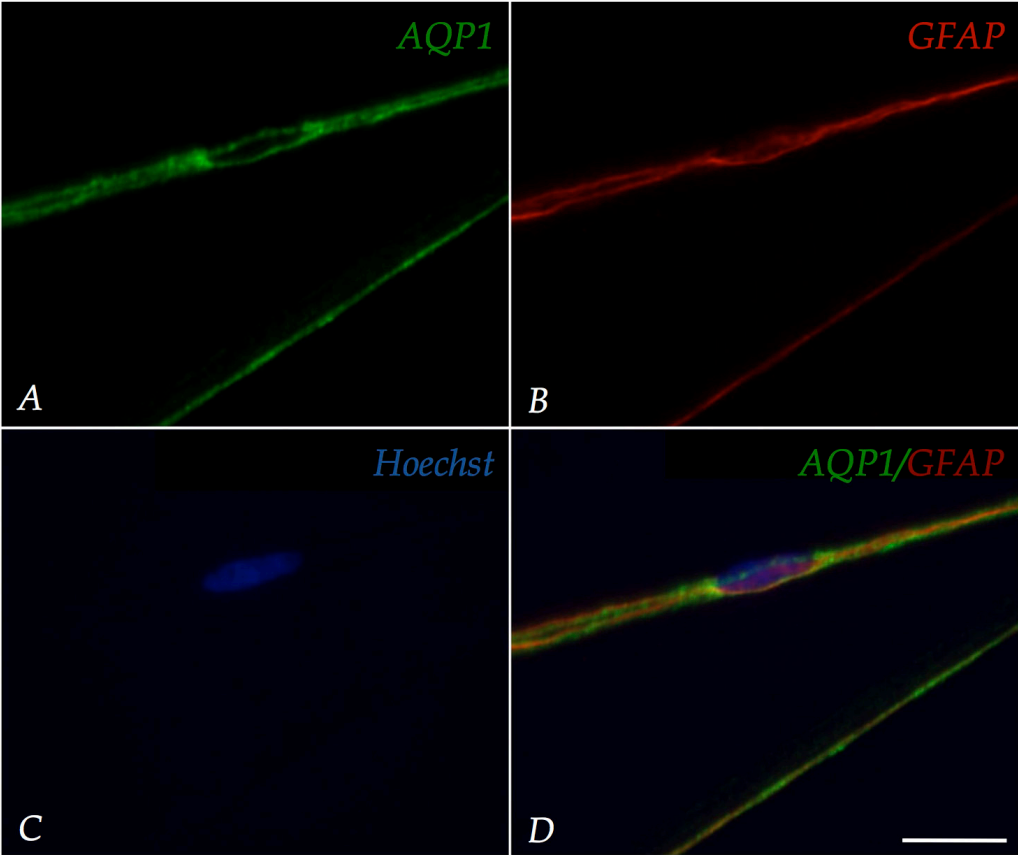


FIGURA 6.

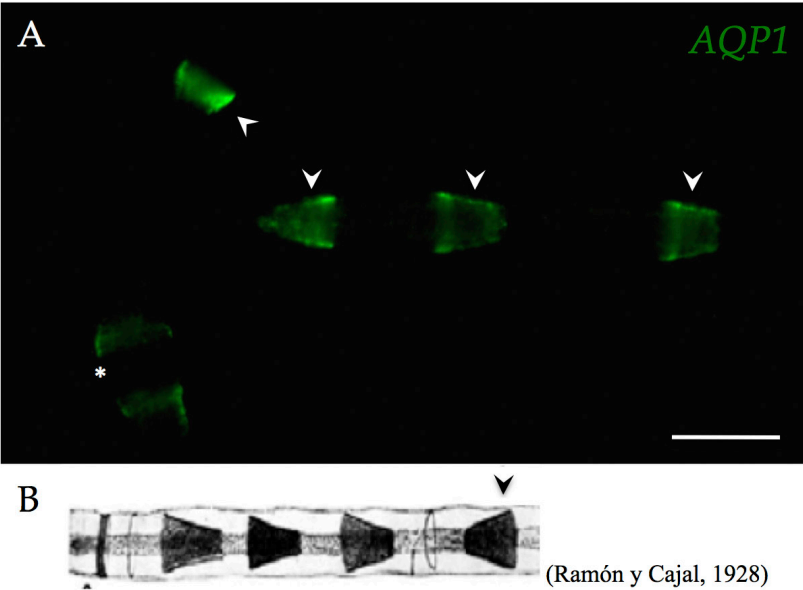


FIGURA 7.

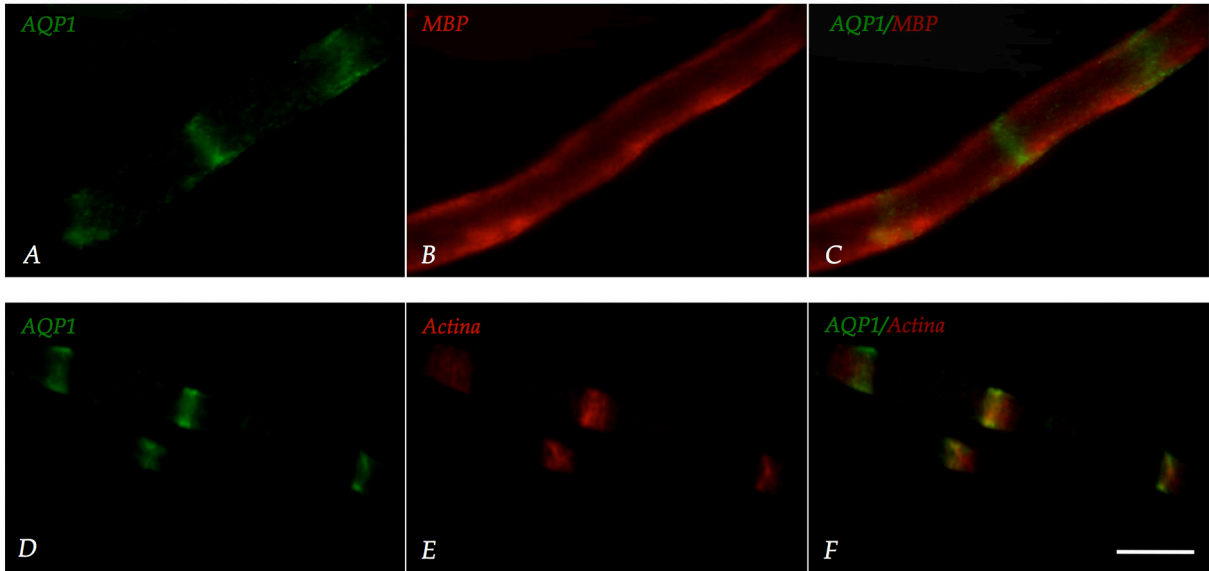
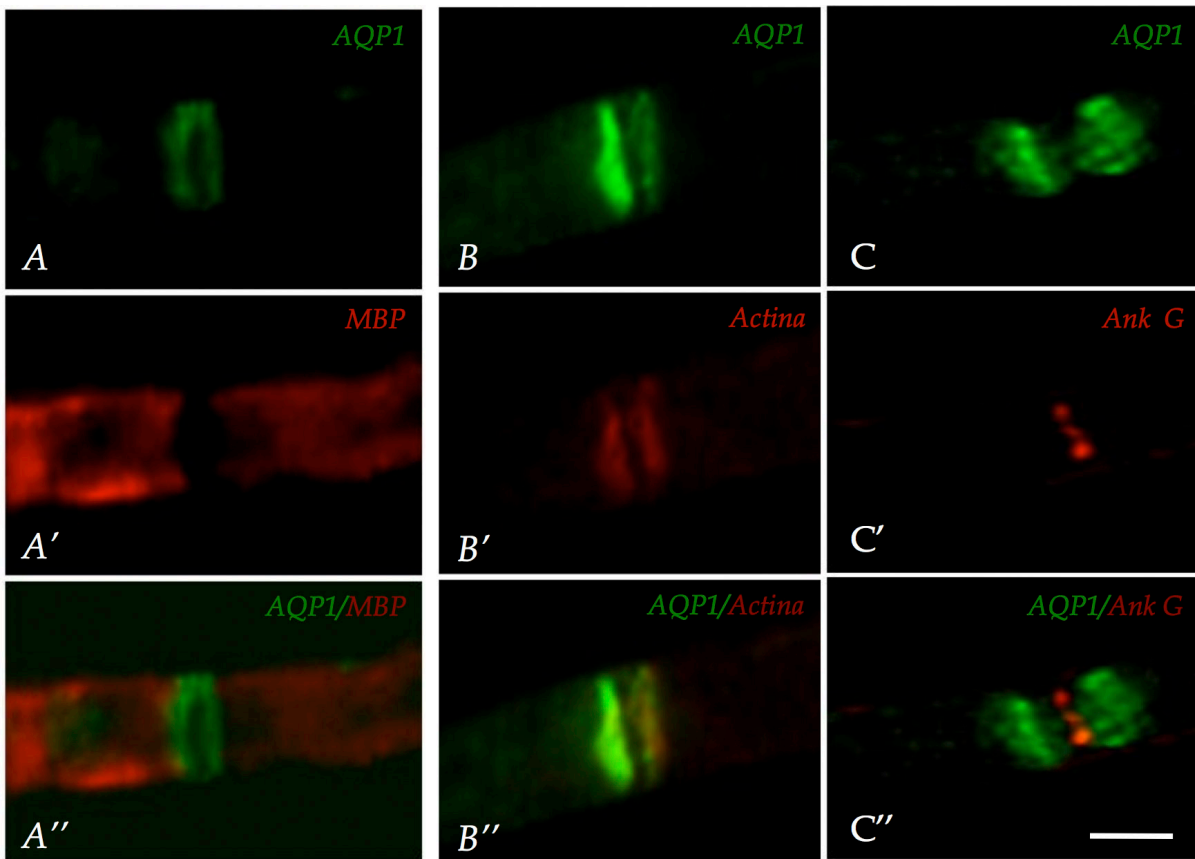


FIGURA 8.



IX. CONCLUSIONES

1. AQP1 es la única AQP presente en el nervio ciático de la rata, ya que de las 4 AQPs estudiadas sólo encontramos niveles de expresión de RNAm y de proteína de AQP1, pero no de AQP2, AQP4 y AQP9
2. AQP1 se localiza tanto en las CSFM como en las CSNFM
3. AQP1 en las CSFM se localiza tanto en las incisuras de Schmidt-Lanterman como en los nodos de Ranvier
4. En los nodos de Ranvier tiene una distribución asimétrica y se localiza en la región paranodal

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Albertini, R., Bianchi R. (2010) Aquaporins and glia. *Curr Neuropharm* 8: 84-91.
- Armati P J, Pollard J D, Gatenby P. 1990. Rat and human Schwann cells in vitro can synthesize and express MHC molecules. *Muscle Nerve* 13,106-16.
- Armati PJ, Pollard J D. 1996. Immunology of the Schwann cell. *Baillieres. Clin Neurol* 5, 47-64
- Arciszewski MB, Stefaniak M, Zacharko-Siembida A, Calka J. (2011). Aquaporin-1 water channel is expressed on submucosal but not myenteric neurons from the ovine duodenum. *Ann Anat* 193: 81-85.
- Arroyo EJ, Scherer SS. 2000. On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem Cell Biol* 113:1-18.
- Balice-Gordon RJ, Bone LJ, Scherer SS (1998). Functional gap junctions in the Schwann cell myelin sheath. *J Cell Biol* 142:1095-1104.
- Benga G. (2009). Water channel proteins (later called aquaporins) and relatives: past, present, and future. *IUBMBLife* 61 (2), 112–133.
- Benga G. (2012). On the definition, nomenclature and classification of water channel proteins (aquaporins and relatives). *Mol Aspects Med.* 33(5-6):514-7.
- Bennett V, Gilligan DM. 1993. The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of the plasma membrane. *Annu Rev Cell Biol* 9:27-66.
- Bennett V, Lambert S. 1999. Physiological roles of axonal ankyrins in survival of premyelinated axons and localization of voltage-gated sodium channels. *J Neurocytol* 28:303-318.
- Berghs S, Aggujaro D, Dirkx R, Jr., Maksimova E, Stabach P, Hermel JM, Zhang JP, Philbrick W, Slepnev V, Ort T, Solimena M. 2000. betaIV spectrin, a new spectrin localized at axon initial segments and nodes of ranvier in the central and peripheral nervous system. *J Cell Biol* 151:985-1002.
- Berger BL y Gupta R. (2006). Demyelination secondary to chronic nerve compression injury alters Schmidt-Lanterman incisures. *J Clin Immunol.* 26(3):265-73.
- Berthold CH, Fraher JP, King RH, Rydmark M. 2005. Microscopic anatomy of the peripheral nervous system. *Peripheral Neuropathy*, 4th Edn, Elsevier Saunders, Philadelphia, PA, pp. 3592.
- Bunge MB, Williams AK, Wood PM. 1982. Neuron-Schwanncell interaction in basal lamina formation. *Dev. Biol.* 92: 449-460.
- Borsani E, Bernardi S, Albertini R, Rezzani R, Rodella LF (2009). Alterations of AQP2 expression in trigeminal ganglia in a murine inflammation model *Neurosci Lett.* 16;449(3):183-8
- Bray, GM, Rasminsky M y Aguayo AJ. (1981). Interactions between axons and their sheath cells. *Annu Rev Neurosci.* 4:127-62.
- Brodal, P. (1992). The central nervous system: structure and function. Ed. Oxford University Press p. 45-53, 398-424.

Caldwell JH, Schaller KL, Lasher RS, Peles E, Levinson SR. (2000). Sodium channel Na(v)1.6 is located the nodes of ranvier, dendrites, and synapses. *ProcNatl Acad Sci.* 97(10):5616-20.

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

Carbrey, JM., Agre, P. (2009) Discovery of the aquaporins and development of the field. *Handb Exp Pharmacol* 190: 3-28.

Conner MT, Conner AC, Bland CE, Taylor LH, Brown JE, Parri HR, Bill RM (2012). Rapid aquaporin translocation regulates cellular water flow: mechanism of hypotonicity-induced subcellular localization of aquaporin 1 water channel. *J Biol Chem.* Mar 30;287(14)

Cowan, WM, Jessell, TM, Zipursky, SL. Editores 1997. Molecular and cellular approaches to neural development. Oxford University Press. Chapter 3: "Neuron-glia interactions": págs 64-107

Cramer P, Muller CW. 1999. A firm hand on NFkappaB: structures of the IkappaBalpha-NFkappaB complex. *Structure* 7:R1-R6.

Davis JQ, Lambert S, Bennett V. 1996. Molecular composition of the node of Ranvier: identification of ankyrin-binding cell adhesion molecules neurofascin (mucin+/third FNIII domain-) and NrCAM at nodal axon segments. *J Cell Biol* 135:1355-1367.

Eshed Y, Feinberg K, Poliak S, Sabanay H, Sarig-Nadir O, Spiegel I, Bermingham JR Jr, Peles E. 2005. Gliomedin mediates Schwann cellaxoninteraction and the molecular assembly of the nodes of Ranvier.*Neuron* 47:215–229.

Fawcett, JW. y Keynes RJ. (1990). Peripheral nerve regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 13: 42-60.

Ghabriel MN, Allt G. (1980). Schmidt-Lanterman Incisures. I. A quantitative teased fibre study of remyelinating peripheral nerve fibres. *Acta Neuropathol.* 1980;52(2):85-95.

Ghabriel MN, Allt G. (1980)

Gao, H., He Ch., Fang, X., Hou, X., Feng, X., Yang, H., Zhao, X., Ma T. (2006) Localization of aquaporin-1 water channel in glial cells of the human peripheral nervous system. *Glia* 53: 783-787.

Garrido JJ, Giraud P, Carlier E, Fernandes F, Mousif A, Fache MP, Debanne D, Dargent B. 2003. A targeting motif involved in sodium channel clustering at the axonal initial segment. *Science* 300:2091-2094.

Geren BB, Schmitt FO. 1954. The structure of the Schwann cell and its relation to the axon in certain invertebrate nerve fibers. *ProcNatl Acad Sci.* 40(9):863-70.

Greenfield S, Brostoff S, Eylar EH, Morell P. 1973. Protein compositionof myelin of the peripheral nervous system. *J Neurochem* 20, 120716.

Griffin ,JW. y Thompson WJ. (2008). Biology and pathology of nonmyelinating Schwann cells. *Glia.* 56:1518-31.

Hiscoe HB. (1947). Distribution of nodes and incisures in normal and regenerated nerve fibers. *Anat Rec.* 1947 Dec;99(4):447-75.

- Ishibashi, K., Kondo, S., Hara, S., Morishita, Y., 2011. The evolutionary aspects of aquaporin family. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 300, R566–R576.
- Itoh T, Rai T, Kuwahara M, Ko SB, Uchida S, Sasaki S, Ishibashi K. (2005). Identification of a novel aquaporin, AQP12, expressed in pancreatic acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 330:832-838.
- Jessen, KR., Mirsky R. (1999). Schwann cells and their precursors emerge as major regulators of nerve development. *Trends Neurosci.* 22(9):402-10.
- Jessen, KR., Mirsky R. (2005). The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nature Rev. Neurosci.* 6:671-682.
- Kriegstein, A.R., & Noctor S.C. (2004). Patterns of neuronal migration in the embryonic cortex. *Trends Neurosci.* 7, 392-399.
- Komada M, Soriano P. 2002. [Beta]IV-spectrin regulates sodium channel clustering through ankyrin-G at axon initial segments and nodes of Ranvier. *J Cell Biol* 156:337-348.
- Kun A, Otero L, Sotelo-Silveira JR, Sotelo JR (2007). Ribosomal distributions in axons of mammalian myelinated fibers. *J Neurosci Res.* 85(10):2087-98.
- Kwon TH, Hager H, Nejsum LN, Andersen ML, Frøkiaer J, Nielsen S (2001). Physiology and pathophysiology of renal aquaporins. *Semin Nephrol.* 21(3):231-8.
- Lazzarini RA, Griffin J, Lassman H, Nave KA, Miller R, Trapp B. 2002. *Myelin Biology and Disorders.*
- Lehmann GL, Gradilone SA, Marinelli RA. (2004). Aquaporin water channels in central nervous system. *Curr Neurovasc Res* 1:293-303.
- Magni F, Sarto C, Ticozzi D, Soldi M, Bosso N, Mocarelli P, Kienle MG (2006) Proteomic knowledge of human aquaporins. *Proteomic* 5637-5649.
- Mathey E, Armati P, Mirsky R, Jessen KR, Arroyo EJ, Scherer S, Feltri ML, Wrabetz L, Ko C-P, Sugiura Y, Feng Z, Lisak RP, Benjamins JA, Kieseier BC, Hu W, Hartung H-P., Shy ME, Kamholz J, Li J, Hughes R, Pollard JD. 2007. *The Biology of Schwann Cells Development, Differentiation and Immunomodulation.*
- Meier C, Dermietzel R, Davidson KG, Yasumura T, Rash JE. 2004. Connexin32-containing gap junctions in Schwann cells at the internodal zone of partial myelin compaction and in Schmidt–Lanterman incisures. *J Neurosci* 24:3186–3198.
- Melendez-Vasquez C, Carey DJ, Zanazzi G, Reizes O, Maurel P, Salzer JL. 2005. Differential expression of proteoglycans at central and peripheral nodes of Ranvier. *Glia* 52:301–308.
- Mobasher A, Wray S, Marples D (2005). Distribution of AQP2 and AQP3 water channels in human tissue microarrays. *J Mol Histol.* 36(1-2):1-14.
- Mostov K, Su T, ter Beest M. (2003). Polarized epithelial membrane traffic: conservation and plasticity. *Nat Cell Biol.* (4):287-93.
- Nesic, O., Lee, J., Unabia, GC., Johnson, K., Ye, Z., Vergara, L., Hulsebosch, C.E., Perez-Polo, JR. (2008) Aquaporin 1 a novel player in spinal cord injury. *J. Neurochem.* 105: 628-640.

- Nielsen S, Smith BL, Christensen EI, Knepper MA, Agre P. (1993). CHIP28 water channels are localized in constitutively water-permeable segments of the nephron. *J Cell Biol.* 120(2):371-83.
- Occhi S, Zambroni D, Del Carro U, Amadio S, Sirkowski EE, Scherer SS, Campbell KP, Moore SA, Chen ZL, Strickland S, Di Muzio A, Uncini A, Wrabetz L, Feltri ML. 2005. Both laminin and Schwann cell dystroglycan are necessary for proper clustering of sodium channels at nodes of Ranvier. *J Neurosci* 25:9418–9427.
- Oshio K, Watanabe H, Song Y, Verkman AS, Manley GT. (2005). Reduced cerebrospinal fluid production and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel Aquaporin-1. *FASEB J* 19:76-78.
- Oshio K, Watanabe H, Yan D, Verkman AS, Manley GT. (2006). Impaired pain sensation in mice lacking Aquaporin-1 water channels. *Biochem Biophys Res Commun* 341: 1022-1028.
- Oguievetskaia K, Cifuentes-Diaz C, Girault J, y Goutebroze L. 2005. Contacts cellulaires des fibres myelinisées du système nerveux périphérique. *Medicine/Science.* 21,162-169.
- Papadopoulos, MC., Verkman (2007) Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatr Nephrol* 22: 778-784.
- Peles E, Salzer JL. 2000. Molecular domains of myelinated axons. *Curr Opin Neurobiol* 10:558–565.
- Poliak S, Peles E. 2003. The Local Differentiation of Myelinated Axons at Nodes of Ranvier. *Nature*; 4: 968-980.
- Quarles R, Mcklin W, Morel P. 2006. Myelin formation, structure and biochemistry. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects* Published by Elsevier, capítulo 4.
- Ramón y Cajal S. (1928). *Cajal's degeneration & regeneration of the nervous system.* Raul M. May Trad. Oxford University Press 1991. pp 52-60
- Rojek A, Praetorius J, Frokiaer J, Nielsen S, Fenton RA: A current view of the mammalian aquaglyceroporins. *Annu Rev Physiol* 2008, 70:301-327
- Saadoun S, Papadopoulos MC, Bell B, Krishna S, Davies D. (2002). The aquaporin-4 water channel and brain tumour oedema. *J Anat.* 200: 528.
- Saadoun S, Papadopoulos MC, Hara-Chikuma M, Verkman AS. (2005). Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption. *Nature* 434:786-792.
- Salzer JL. 1997. Clustering sodium channels at the node of Ranvier: Close encounters of the axon-glia kind. *Neuron* 18:843–846.
- Salzer JL. (2003). Polarized domains of myelinated axons. *Neuron.* 40(2):297-318.
- Salzer, JL., Brophy PJ y Peles E. (2008). Molecular domains of myelinated axons in the peripheral nervous system. *Glia.* 56:1532-40.
- Shamash, S., Reichert, F., y Rotshenker, S. (2002). The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta. *J Neurosci.* 22(8):3052-60.
- Speake T, Freeman LJ, Brown PD (2003). Expression of aquaporin 1 and aquaporin 4 water channels in rat choroid plexus. *Biochim Biophys Acta* 1609: 80-86.

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

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

Tait MJ, Saadoun S, Bell A, Papadopoulos MC. (2007). Water movements in the brain: role of aquaporins. *TRENDS Neurosc*. 31: 37-43.

Trapp BD. 1990. Myelin-associated glycoprotein. location and potential functions. *Ann N Y Acad Sci*. 605:29-43.

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

Verkman AS. (2002). Physiological importance of aquaporin water channels. *ANN Med* 34: 192-200.

Verkman AS. (2002b). Aquaporin channels and endothelial cell function. *J. Anat.* 200: 617-627.

Walz T, Hirai T, Murata K, Heymann JB, Mitsuoka K, Fujiyoshi Y, Smith BL, Agre P, Engel A. (1997). The three-dimensional structure of aquaporin-1. *Nature*. 387(6633):624-7.

Webster H. 1993. Development of peripheral nerve fibers. *Peripheral Neuropathy*, 3rd Ed. WB Saunders, Philadelphia, pp. 243-66.

Zelenina, M., Zelenin, S., Aperia, A. (2005) Water channels (aquaporins) and their role for postnatal adaptation. *Pediatr Res* 57: 47R- 53R.

Zelenina, M (2010) Regulation of brain aquaporins. *Neurochem Int*. doi: 10.1016/j.neuint.2010.03.022.

Zhai Q., Wang, J., Kim, A., Liu, Q., Watts, R., Hoopfer, E., Mitchison, T., Luo, L. y He, Z. (2003). Involvement of the ubiquitin-proteasome system in the early stages of wallerian degeneration. *Neuron*. 39(2):217-25.

Zhou W, Goldin AL. 2004. Use-dependent potentiation of the Nav1.6 sodium channel. *Biophys J*. 87 (6):3862-72.