



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**LOCALIZACIÓN DE LA AQP1 EN EL NERVIÓ CIÁTICO NORMAL Y LESIONADO DE LA RATA Y
DIFERENCIAS ENTRE RATA Y RATÓN EN LA LOCALIZACIÓN DE AQP1 Y EN LOS PATRONES
DE EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DE AQP DEL NERVIÓ CIÁTICO**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

EDITH SEGURA ANAYA

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MYRNA ALEXANDRA ROBERTA DENT

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR

DR. ROLANDO HERNÁNDEZ MUÑOZ

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

DR. MAURICIO DÍAZ MUÑOZ

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEMéx), bajo la dirección de la Dra. Myrna Dent. El proyecto contó con el financiamiento de la universidad a través de los proyectos 3215/2012CHT, 3837/2014 FSH y 4515/2018/CI.

Los estudios de posgrado en el programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de Edith Segura Anaya fueron apoyados por una beca otorgada por el CONACYT (412647).

El comité tutor que asesoró el desarrollo del proyecto de esta tesis estuvo integrado por:

Dra. Myrna Alexandra Roberta Dent	Facultad de Medicina, UAEMéx
Dr. Rolando Hernández Muñoz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Mauricio Díaz Muñoz	Instituto de Neurobiología, UNAM

A mis padres por su amor incondicional,
por siempre confiar en mí y brindarme todo su apoyo.

A Sebastián y Adolfo que son alegría en mi camino.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Myrna Dent, por compartir sus conocimientos y enseñarme el camino de la investigación, por su confianza, paciencia, pero sobre todo por su amistad, cariño y por enseñarme a disfrutar el mundo. Mi agradecimiento sincero por tanto, sin su apoyo no lo habría logrado.

Al Dr. Armando Aranda Anzaldo por compartir sus conocimientos y sus valiosos comentarios.

Al Dr. Alejandro Martínez Gómez por sus consejos, por su invaluable colaboración en el proyecto, pero sobre todo por su amistad.

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

A los miembros del jurado: Dra. Herminia Pasantes Ordóñez, Dra. Ana Brígida Clorinda Arias, Dr. José Juan Antonio Ibarra Arias y Dr. Rogelio Arellano Ostoa, por las observaciones y sugerencias que ayudaron a mejorar este trabajo.

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

A la unidad de videoconferencia del IFC-UNAM a cargo de Ana María Escalante por su apoyo en la realización de los exámenes tutorales de cada semestre.

A todos los miembros del laboratorio de Biología Molecular y Neurociencias: Evangelina, Rolando, Erika, Lupita, Ernesto, Diana, Yessica, Christian, Rommel, por sus consejos y amistad a lo largo de estos años.

Al Dr. Héctor Vázquez-Rivera por su ayuda con la parte estadística del proyecto.

A toda mi familia, en especial a mis padres, mis hermanos, Gaby, Adolfo, Ale, Yalid, y mis hermosos sobrinos, por compartir mis sueños y alentarme a seguir creciendo. Siempre han sido una gran motivación en mi vida.

A Cuauhtémoc y a mis amigos fuera del laboratorio: Ana Elena, Car, Nimbe, Alfredo, por apoyarme y compartir aventuras a lo largo de estos años.

A todas aquellas personas que indirectamente colaboraron, muchas gracias.

ABREVIATURAS

AQP: Acuaporina

AnkG: Ankirina G

BSSM: Método de tinción de plata de Bielschowsky

SN: Sistema Nervioso

SNC: Sistema Nervioso Central

SNP: Sistema Nervioso Periférico

CD: Citocalasina D

CS: Células de Schwann

CSFM: Células de Schwann que forman mielina

DW: Degeneración Walleriana

GRD: Ganglios de la raíz dorsal

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial

ISL: Incisuras de Schmidt-Lanterman

MAG: Glicoproteína asociada a la mielina

MBP: Proteína básica de mielina

NC: Nervio ciático

NP: Nervio periférico

NF200: Neurofilamento de cadena pesada 200

P0: Proteína cero

PMP22: Proteína periférica de mielina 22

SS: Silver stain (marcaje con plata)

ABSTRACT	I
RESUMEN	III
I. ANTECEDENTES.....	1
1.1 SISTEMA NERVIOSO PERIFÉRICO	1
1.1.1 <i>Estructura del nervio periférico</i>	3
1.2 CÉLULAS DE SCHWANN	4
1.2.1 DESARROLLO DE LAS CÉLULAS DE SCHWANN	5
1.2.2 CARACTERÍSTICAS ANATÓMICAS DE LOS AXONES MIELINIZADOS.....	7
1.2.3 INCISURAS DE SCHMIDT-LANTERMAN Y BANDAS DE CAJAL.....	9
1.2.4 ORGANIZACIÓN POLARIZADA DE LA CS.....	10
1.2.4.1 <i>Polaridad longitudinal</i>	11
1.2.4.2 <i>Polaridad radial</i>	13
1.3 DEGENERACIÓN WALLERIANA.....	15
1.3.1 CLASIFICACIÓN DE LA LESIÓN EN EL NERVIO PERIFÉRICO	16
1.3.2 EVENTOS DE LA DEGENERACIÓN WALLERIANA	18
1.3.3 PAPEL DE LAS CÉLULAS DE SCHWANN EN LA DEGENERACIÓN WALLERIANA	20
1.3.4 REGENERACIÓN DEL NERVIO	23
1.4 ACUAPORINAS	24
1.4.1 <i>Estructura y selectividad de las acuaporinas</i>	26
1.4.2 <i>Regulación de las acuaporinas</i>	28
1.4.3 <i>Acuaporinas en el sistema nervioso central</i>	29
1.4.4 <i>Acuaporinas en el sistema nervioso periférico</i>	32
II. HIPÓTESIS	34
III. OBJETIVOS	35
3.1 <i>Objetivo general</i>	35
3.2 <i>Objetivos particulares</i>	35
IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	36
4.1 ANIMALES EXPERIMENTALES	36
4.2 EXTRACCIÓN DE TEJIDOS	36
4.3 LESIÓN DEL NERVIO CIÁTICO.....	36
4.4 CITOCALASINA D	37
4.5 INMUNOHISTOQUÍMICA.....	37

4.6	DOBLE INMUNOFLUORESCENCIA.....	38
4.7	TINCIÓN DE PLATA.....	38
4.8	DOBLE INMUNOFLUORESCENCIA CON TINCIÓN DE PLATA.....	39
4.9	TOMA DE FOTOGRAFÍAS Y ANÁLISIS DE IMÁGENES.....	40
4.10	EXTRACCIÓN DE ARN.....	40
4.11	DISEÑO DE <i>PRIMERS</i>	41
4.12	AMPLIFICACIÓN POR PCR.....	42
4.13	EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS.....	43
4.14	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	43
4.15	ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.....	44
4.16	WESTERN BLOT.....	44
V. RESULTADOS.....		46
5.1	EXPRESIÓN DE AQP1 EN EL NC.....	46
5.2	LOCALIZACIÓN DE AQP1 EN EL NERVIIO CIÁTICO DE LA RATA.....	46
5.3	FIBRAS NERVIOSAS MARCADAS CON LA TINCIÓN DE PLATA.....	52
5.4	EXPRESIÓN DE AQP1 DURANTE LA DEGENERACIÓN WALLERIANA EN LA RATA.....	59
5.5	LOCALIZACIÓN DE ACTINA EN NERVIOS LESIONADOS Y TRATADOS CON CD.....	61
5.6	FRAGMENTACIÓN DEL AXÓN POR LA INHIBICIÓN DE LA POLIMERIZACIÓN DE F-ACTINA.....	65
5.7	LOCALIZACIÓN DE AQP1 DURANTE LA DEGENERACIÓN WALLERIANA.....	67
5.8	LOCALIZACIÓN DE AQP1 EN NERVIOS TRATADOS CON CITOCALASINA D.....	70
5.9	EXPRESIÓN DE AQP1 EN EL NERVIIO CIÁTICO DE RATÓN.....	71
5.10	LOCALIZACIÓN DE AQP1 EN EL NERVIIO CIÁTICO DE RATÓN.....	72
5.11	EXPRESIÓN DE DIFERENTES ISOFORMAS DE AQPS EN EL NERVIIO CIÁTICO DE LA RATA Y DEL RATÓN.....	75
5.12	CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE AQPS DE LA RATA DESPUÉS DE UNA LESIÓN POR COMPRESIÓN.....	77
VI. DISCUSIÓN.....		80
6.1	LOCALIZACIÓN DE AQP1 EN EL NC DE ROEDORES.....	80
6.2	EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DE AQP EN EL NERVIIO CIÁTICO DE RATA Y RATÓN.....	83
6.3	EXPRESIÓN DE LAS ISOFORMAS DE AQP EN EL NERVIIO CIÁTICO DE RATA DESPUÉS DE UNA LESIÓN POR COMPRESIÓN	84
6.4	PAPEL DEL CITOESQUELETO DE ACTINA DURANTE LA DEGENERACIÓN WALLERIANA.....	87
6.5	AQP1 DURANTE LA DEGENERACIÓN WALLERIANA.....	88
VII. CONCLUSIONES.....		90
VIII. ANEXO I.....		92

IX. ANEXO II	93
X. ANEXO III	94
XI. BIBLIOGRAFÍA	95

ABSTRACT

In peripheral nerve trunks, axons are ensheathed by myelinating or non-myelinating Schwann cells or Remak cells. Myelinated axons are organized in a series of distinct subdomains or internodes, each internode composed of one myelinated Schwann cell exhibits a striking longitudinal (from node to node) and radially (from the axon to the basal lamina) polarity that is essential for nerve impulse propagation. Remak cells enfold Remak fibers which have been associated with pain perception and grouped unmyelinated small-caliber nociceptor c-fiber axons. Aquaporins (AQPs) are membrane proteins acting as water channels, which are widely distributed in mammals, plants and lower organisms. To date, 13 different subtypes of mammalian AQPs have been identified with differing tissue distributions that appear related to their functional roles in water transporting. In the peripheral nervous system, AQPs have been reported in both peripheral neurons and glial cells. In this work, we first described the localization of AQP1 in the rat sciatic nerve. AQP1 is present in both Remak and myelin Schwann cells. In myelinated cells AQP1 is localized in non-compact myelin, enriched in the Schmidt-Lanterman incisures and paranodal regions (Segura-Anaya et al., 2015). After nerve crush injury the level of AQP1 expression of both mRNA and protein remains constant at all times studied. However, immunohistochemistry reveals that AQP1 is only present in Remak cells a day after crush injury and is not present after 3 days. We then studied the localization of AQP1 in mouse and guinea pig, showing that is only present in Remak cells, showing a different localization among species. The expression of AQP1 in Remak cells supports the involvement of AQP1 in pain perception. We then performed RT-PCR of nine AQP isoforms (AQP1-9) from rat and mouse sciatic nerve showed that in rat only five AQPs are present (AQP1, AQP4, AQP5, AQP7 and AQP9), whereas in mouse all AQPs except AQP8 are expressed. Therefore, these two closely related rodents show different AQP1 localization and have different AQPs expression patterns in the sciatic nerve, possibly due to a difference in the regulation of these AQPs. RT-PCR of AQPs in rat after nerve crush injury, showed that AQP1, AQP4 and AQP7 expression remains constant at all times studied, while AQP2, AQP5 and AQP9 is upregulated after injury. The up-regulation of AQP2, AQP5 and AQP9 after nerve injury suggests a possible role for these AQPs in promoting regeneration injury (Segura-Anaya et al., 2021). We also developed a technique, in which teased sciatic

nerves were simultaneous staining by Bielschowsky's silver staining method (BSSM) and immunofluorescence of the same section. This approach allows to get more information about the complexity of peripheral nerves, it would be very useful to study the morphology of the axon and the polarized domains of myelinated axons (Segura-Anaya et al., 2018).

RESUMEN

En los nervios periféricos, los axones se encuentran envueltos por células de Schwann que forman mielina y que no forman mielina o células Remak. Los axones mielinizados se organizan en diferentes subdominios o internodos y cada internodo formado por una célula de Schwann que forma mielina muestra una polaridad longitudinal (de nodo a nodo) y una radial (del axón a la lámina basal) esenciales para la propagación del impulso nervioso. Las células Remak envuelven axones de fibras C nociceptivas de pequeño calibre no mielinizados que se han asociado con la percepción del dolor. En este trabajo se analizaron distintos aspectos relacionados con las acuaporinas (AQPs) en el nervio ciático normal y lesionado en rata y ratón. Las AQPs son una familia de proteínas de membrana que forman canales de agua y se encuentran ampliamente distribuidas en mamíferos, plantas y organismos inferiores. Se han identificado 13 isoformas de AQPs en mamíferos, las cuales tienen una diferente distribución entre los tejidos, con múltiples papeles fisiológicos. En el SNP se ha descrito la expresión de las AQPs tanto en neuronas como en células gliales. En este trabajo, se describió la localización precisa de AQP1 en el nervio ciático de la rata, ubicándola tanto en las células de Schwann que forman mielina como en células Remak. En las células mielinizadas AQP1 se localiza en la mielina no compacta, principalmente en las incisuras de Schmidt-Lanterman y la región paranodal del nodo de Ranvier (Segura-Anaya et al., 2015). Después de una lesión por compresión del nervio ciático se observó que el nivel de expresión de AQP1, tanto de ARNm como de proteína, permanece constante en todos los tiempos estudiados después de la lesión. Sin embargo, la inmunohistoquímica muestra que AQP1 en las fibras lesionadas se localiza solo en células Remak un día después de la lesión y no se encuentra a los 3 días. Posteriormente se encontró que en el ratón y el cuyo AQP1 únicamente se localiza en células Remak, lo que muestra una distribución diferente con respecto a la rata. La expresión de AQP1 en células Remak apoya su participación en la percepción del dolor. La presencia de otras isoformas de AQP (1-9) en el nervio ciático de rata y ratón se detectó mediante RT-PCR. Los resultados muestran que en rata se expresan cinco AQPs (AQP1, AQP4, AQP5, AQP7 y AQP9), mientras que en ratón se expresan todas las AQPs estudiadas, excepto AQP8. Por lo tanto, estos dos roedores estrechamente relacionados presentan diferencias tanto en la localización de AQP1 como en los patrones de expresión de las isoformas de AQPs en el nervio ciático, posiblemente debido a diferencias en su regulación.

En la rata, después de una lesión por compresión del nervio la expresión de AQP1, AQP4 y AQP7 permanece constante en todos los tiempos estudiados, mientras que AQP2, AQP5 y AQP9 aumentan su expresión después de la lesión; esta regulación a la alza sugiere que posiblemente estas AQPs tengan un papel en la regeneración del nervio ciático (Segura-Anaya et al., 2021). En fibras de nervio ciático se desarrolló una técnica que consiste en el marcaje simultaneo del método de tinción de plata de Bielschowsky para axones y la inmunofluorescencia en la misma preparación, esta técnica nos permite tener una mayor información sobre la complejidad de los nervios periféricos, ya que permite estudiar la morfología completa del axón y localizar con precisión ciertos dominios celulares que se adquieren durante el proceso de mielinización (Segura-Anaya et al., 2018).

I. ANTECEDENTES

1.1 Sistema Nervioso Periférico

El sistema nervioso (SN) constituye uno de los sistemas más complejos del organismo. Desde el punto de vista anatómico está dividido en sistema nervioso central (SNC), constituido por el encéfalo y la médula espinal, y el sistema nervioso periférico (SNP) que está formado por los nervios periféricos que se expanden por todo el cuerpo, formando una arborización compleja parecida a la que se encuentra en los vasos sanguíneos (Zacchigna et al., 2008). Los nervios que emergen del SNC se dividen en 2 categorías: nervios craneales y nervios espinales. Varias ramas se originan a partir de estos nervios y las terminales nerviosas llegan a todas las partes del cuerpo.

El nervio periférico (NP) se compone de fibras nerviosas que consisten en el axón (prolongaciones de las neuronas) y las células gliales que acompañan su trayectoria desde su segmento inicial hasta las proximidades de las terminales nerviosas. Se han utilizado varios esquemas de clasificación de las fibras nerviosas basadas en parámetros como la velocidad de conducción, función, diámetro de la fibra entre otros atributos (Geuna et al., 2009). Anatómicamente, la asociación que tienen con las células de Schwann (CS), principal glía del SNP, permite distinguir dos subgrupos de fibras nerviosas: fibras mielinizadas y no mielinizadas (Figura 1). Todos los axones de gran calibre están rodeados por una estructura laminar, la mielina, que es una extensión de la membrana plasmática de las CS. A nivel estructural, la mielina se observa como líneas oscuras (electrodensas) y claras (translúcidas) alternadas que se disponen en espiral alrededor del axón. La mielina permite la rápida propagación del potencial de acción (Nave y Werner, 2014); además es responsable del color blanco brillante de los nervios tanto en el SNP como en el SNC (Geuna et al., 2009). Estos axones mielinizados, son axones motores que surgen de las motoneuronas en la asta ventral de la médula espinal o el tronco del encéfalo y proporcionan inervación a los músculos esqueléticos y los axones sensoriales que surgen como procesos periféricos de los axones de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal (GRD). Las fibras no mielinizadas agrupan axones de menor calibre rodeados por una célula de Schwann que no forma mielina también conocida como célula Remak (Jessen y Mirsky, 2010). Estos axones sensoriales no

mielinizados se asocian con funciones mecanorreceptoras y nociceptivas de umbral alto, transmiten señales sensoriales, relacionadas con el dolor, hacia los GRD (Griffin y Thompson, 2008; English, 2021).

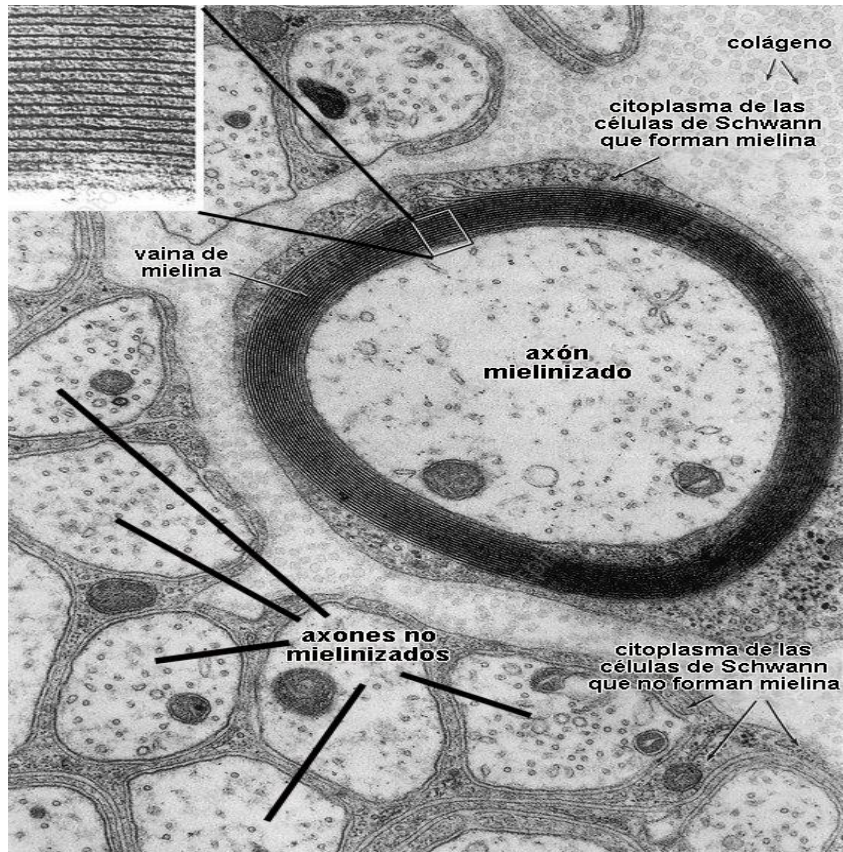


Figura 1. Axones rodeados por las células de Schwann. Micrografía electrónica de un axón mielinizado y varios axones no mielinizados rodeados por una célula de Schwann que no forma mielina o célula Remak. La ampliación muestra la estructura laminar de la vaina de mielina (<https://www.sciencephoto.com/media/996079/view/myelin-sheath-em>).

1.1.1 Estructura del nervio periférico

La estructura del NP es única, difiere dramáticamente del cerebro, la médula espinal o el nervio óptico (Zochodne, 2008). Los nervios periféricos (NPs) poseen una gran elasticidad, propagan los potenciales de acción largas distancias y soportan los estiramientos asociados con movimientos de las extremidades y la compresión mecánica de las actividades diarias. Para resistir el estrés mecánico, los NPs contienen grandes cantidades de tejido conectivo denso, distribuido en tres capas: endoneuro, perineuro y epineuro (Figura 2) (Jessen et al., 2015; Belin et al., 2017). En el endoneuro, los axones se agrupan en fascículos y están protegidos estructuralmente por una matriz extracelular vascularizada rica en colágeno, ligada a la lámina basal que envuelve a los axones. El ambiente endoneural contiene fibroblastos, vasos sanguíneos y la presencia de algunos macrófagos y está rodeado por el perineuro que protege las fibras nerviosas de células y moléculas indeseables (Jessen et al., 2015). Además, cada axón se encuentra asociado individualmente con una vaina de mielina. Ésta además de promover la conducción del impulso nervioso y proteger al axón del estrés mecánico, facilita el intercambio de metabolitos entre la región vascular y el axón. Finalmente, se encuentra el epineuro, que es la capa gruesa más externa formada de colágeno que rodea y une a los fascículos nerviosos en un solo haz; por esta capa transcurren los vasos sanguíneos que irrigan a los nervios (Kandel et al., 2012).

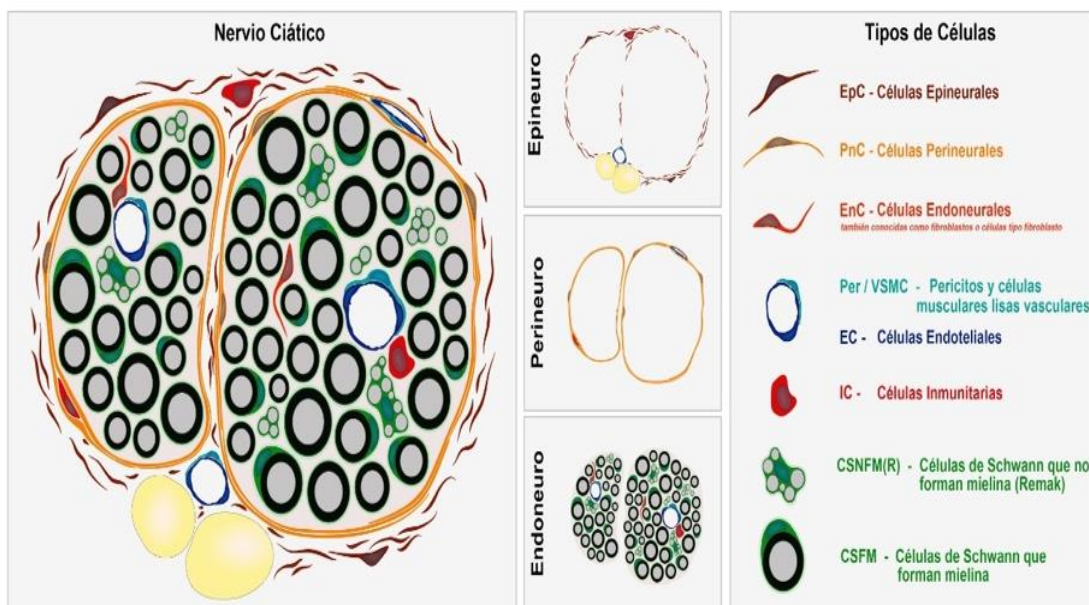


Figura 2. Diagrama de la estructura del nervio periférico. El nervio posee tres componentes: el epineuro es la capa más externa que recubre todo el nervio periférico. El perineuro es un tubo celular que rodea un fascículo de fibras nerviosas, dentro del perineuro las unidades axón-célula de Schwann individuales se encuentran embebidas en una matriz rica en colágeno llamada endoneuro que además de las células de Schwann contiene: fibroblastos, células endoteliales y células del sistema inmune (Adaptada de Gerber et al., 2021).

1.2 Células de Schwann

Las células de Schwann (CS), descritas desde 1939 por Theodor Schwann, constituyen la principal glía del SNP. Rodean todos los axones del nervio y pueden ser de dos tipos: las células de Schwann que forman mielina (CSFM) y las que no forman mielina o células Remak (Jessen y Mirsky, 2005). Si bien se considera que ambas CS proporcionan un soporte metabólico a los axones, solo las CSFM tienen un papel clave en la conducción del impulso nervioso (Jessen y Mirsky, 2019). La mielina proporciona un aislamiento eléctrico y envoltura de baja capacitancia para los axones de gran calibre que trae como consecuencia la “conducción saltatoria” del impulso nervioso entre los nodos de Ranvier y puede alcanzar una velocidad de conducción de hasta 120 m/s (Jessen y Mirsky, 2005; Nave, 2010; Menorca et al., 2013). En los axones amielínicos la velocidad de conducción es más lenta, 1m/s o 2m/s, debido a que el impulso nervioso se transmite por circuitos locales de corrientes iónicas a lo largo de la membrana axonal (Morrel et al., 1989).

Ambos tipos de células gliales expresan algunos marcadores en común como la proteína S100, un marcador clásico de CS (Jessen y Mirsky, 2005), pero al mismo tiempo poseen diferencias morfológicas, moleculares y estructurales, ya que cada una de ellas expresa proteínas específicas que las caracterizan (Jessen y Mirsky, 2015). Las células Remak expresan muchos marcadores que también se encuentran en el desarrollo como la molécula de adhesión celular neural (NCAM), el receptor para neurotrofina p75 (p75NTR), la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y L1 NCAM. Mientras las CSFM expresan un gran rango de moléculas que se relacionan con la síntesis, mantenimiento y estructura de la mielina, incluyen el factor de transcripción pro-mielina Erg2 (Krox20), altos niveles de enzimas que controlan la síntesis de colesterol, proteínas estructurales como la proteína P cero (P0), proteína básica de mielina (MBP), y proteínas asociadas a la membrana como la glicoproteína

de asociación a la mielina (MAG), proteína periférica de mielina 22kd (PMP22) y periaxina (Jessen y Mirsky, 2019).

1.2.1 Desarrollo de las células de Schwann

Las CS tienen un origen embrionario ectodérmico a partir de las células de la cresta neural que posteriormente se desarrollan en precursores de las CS; éstas pueden dar lugar a melanocitos, fibroblastos endoneurales y neuronas además de la CS (Jessen y Mirsky, 2005).

Los precursores de las CS presentan una morfología fusiforme característica y procesos extensos que contactan y forman uniones con los procesos de las células precursoras adyacentes. De esta forma rodean grandes grupos de axones, la mayoría de un tamaño similar (Jessen y Mirsky, 2004). Los precursores de las CS se desarrollan en CS inmaduras y envuelven a un conjunto de axones, dirigidos por el regulador molecular neuregulina-1 (NRG-1), que participa en casi todos los aspectos de la biología de las CS (Michailov et al., 2004). Los precursores realizan la selección radial de los axones, un proceso fisiológico lento que comienza en el periodo embrionario y continúa en el desarrollo postnatal, hasta el día 10 posterior al nacimiento en el SNP de la rata, similar a lo que ocurre en humanos (Feltri et al., 2016). El inicio de la selección radial ocurre después de que la CS ha comenzado la producción de lámina basal cuya función es iniciar la asimetría celular y establecer un eje de polaridad glial, imprescindible en la espiralización de la membrana al mielinizar al axón (Simons y Trotter, 2007).

El fenotipo adoptado por las CS, es estrictamente dependiente de las señales axonales y el ambiente celular; un factor crítico que determina el destino de la CS inmadura es el diámetro del axón envuelto por dicha CS: si los axones poseen un diámetro menor o igual a 1 micra las CS se diferencian en células Remak que envuelven a uno o varios axones, incluidos muchos axones sensoriales. Por el contrario, si el axón es de un diámetro mayor o igual a 1 micra las CS adoptan un fenotipo pro-mielinizante que activa un programa molecular para sintetizar grandes cantidades de mielina y rodea axones de neuronas motoras y algunos de tipo sensorial, el número de vueltas de mielina es proporcional al diámetro del axón (Jessen

y Mirsky, 2019) (Figura 3). El determinante de esta diferenciación es la cantidad de Neuregulina 1 tipo III (NRG1-III) expresada en la superficie del axón y no el diámetro axonal *per se*. Esta proteína funciona como una señal de supervivencia y proliferación para los precursores de las CS y ajusta el número de CS en función del número de axones que serán mielinizados (Simons y Trotter, 2007).

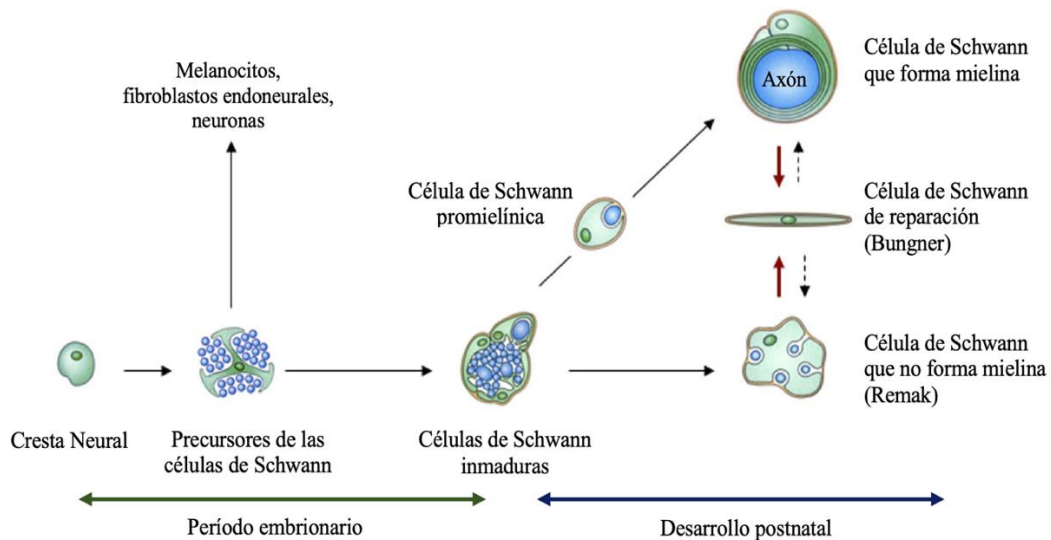


Figura 3. Desarrollo de las células de Schwann en rata. El diagrama muestra las transiciones de las células de Schwann en el desarrollo y después de una lesión. En el desarrollo (flechas negras continuas) ocurre: la formación de los precursores de las células de Schwann a partir de células de la cresta neural, la transición precursor-célula de Schwann y la formación de células de Schwann que forman y no forman mielina madura. Esta transición puede adoptar un fenotipo de reparación cuando se pierde el contacto axonal (flechas rojas) y se restablece en los nervios en regeneración (flechas punteadas) (Adaptada de Jessen y Mirsky, 2016).

A pesar del notable proceso de diferenciación que sufren las CS en el desarrollo postnatal se observa que poseen alta plasticidad celular. Si las células de Schwann maduras pierden el contacto axonal, por alguna lesión, las CS pueden adoptar un fenotipo de reparación, parecido al de las células inmaduras, y son capaces de proliferar y servir como sustrato para el crecimiento del axón y su remielinización (Boerboom et al., 2017; Jessen y Mirsky, 2019).

1.2.2 Características anatómicas de los axones mielinizados

Las fibras mielinizadas están constituidas por el axón y las células gliales especializadas, oligodendrocitos en el SNC y CSFM en el SNP, que envuelven al axón formando la vaina de mielina. A diferencia de los oligodendrocitos que extienden procesos celulares para mielinizar varios axones simultáneamente (60:1), las CSFM mielinizan un solo segmento axonal en una relación 1:1, lo que permite que a lo largo de un axón se puedan encontrar miles de CSFM formando cada una un internodo (Salzer, 2015). Estos segmentos de mielina o internodos tienen una longitud promedio de 1mm en fibras largas (Hess y Young, 1957) y están recubiertos con lámina basal (matriz extracelular). El núcleo de las CSFM se puede identificar fácilmente ya que se localiza a la mitad de un internodo, por fuera de la vaina de mielina.

Según el grado de compactación, la mielina se puede dividir en dos regiones estructural y funcionalmente distintas: mielina compacta y mielina no compacta (Figura 4B). La mielina compacta cuya función es el aislamiento, inhibe el intercambio de iones durante la conducción nerviosa. La mielina se caracteriza por un alto contenido de lípidos (~70%) que incluyen galactocerebrósidos, esfingomielina y particularmente colesterol. Una proporción menor se compone de proteínas, principalmente la glicoproteína P0 que es la más abundante en el SNP y no está presente en el SNC, corresponde al 50% de las proteínas de mielina y es esencial para la compactación de la mielina; también está la proteína básica de mielina (MBP) (5-18%) que se ubica en la cara citosólica de la membrana glial, y la proteína periférica de mielina (PMP22) (~5%) (Jessen y Mirsky, 2010; Salzer y Zalc, 2016). En un corte longitudinal de la mielina y el axón se puede identificar la estructura de los axones mielinizados en el SNP. Al desenrollar un internodo se observa la forma trapecoidal de la CSFM (Figura 4A).

La mielina no compacta comprende una red continua de compartimentos citosólicos no compactados como se observa en la superficie más externa, el compartimento abaxonal, que establece contacto con la lámina basal y el compartimento adaxonal, en la parte interna, que se encuentra adyacente al axón. Ambos compartimentos están conectados mediante canales

citoplasmáticos conocidos como incisuras de Schmidt-Lanterman (ISL) y las asas paranodales en los nodos de Ranvier (el borde lateral de la vaina de mielina) (Arroyo y Scherer 2000). El axón, rodeado por la vaina de mielina, posee una membrana llamada axolema; en su interior se encuentra el citoplasma del axón, denominado axoplasma, el cual contiene los organelos celulares: mitocondrias, polirribosomas y varias estructuras filamentosas, como microfilamentos, neurofilamentos y microtúbulos (Zochodne, 2008). En la mielina no compacta se expresan moléculas como actina, uniones adherentes (E-caderina), uniones comunicantes (conexina 32, Cx32), uniones estrechas (claudinas) o MAG, (Trapp, 1990; Scherer y Arroyo, 2002), entre otras.

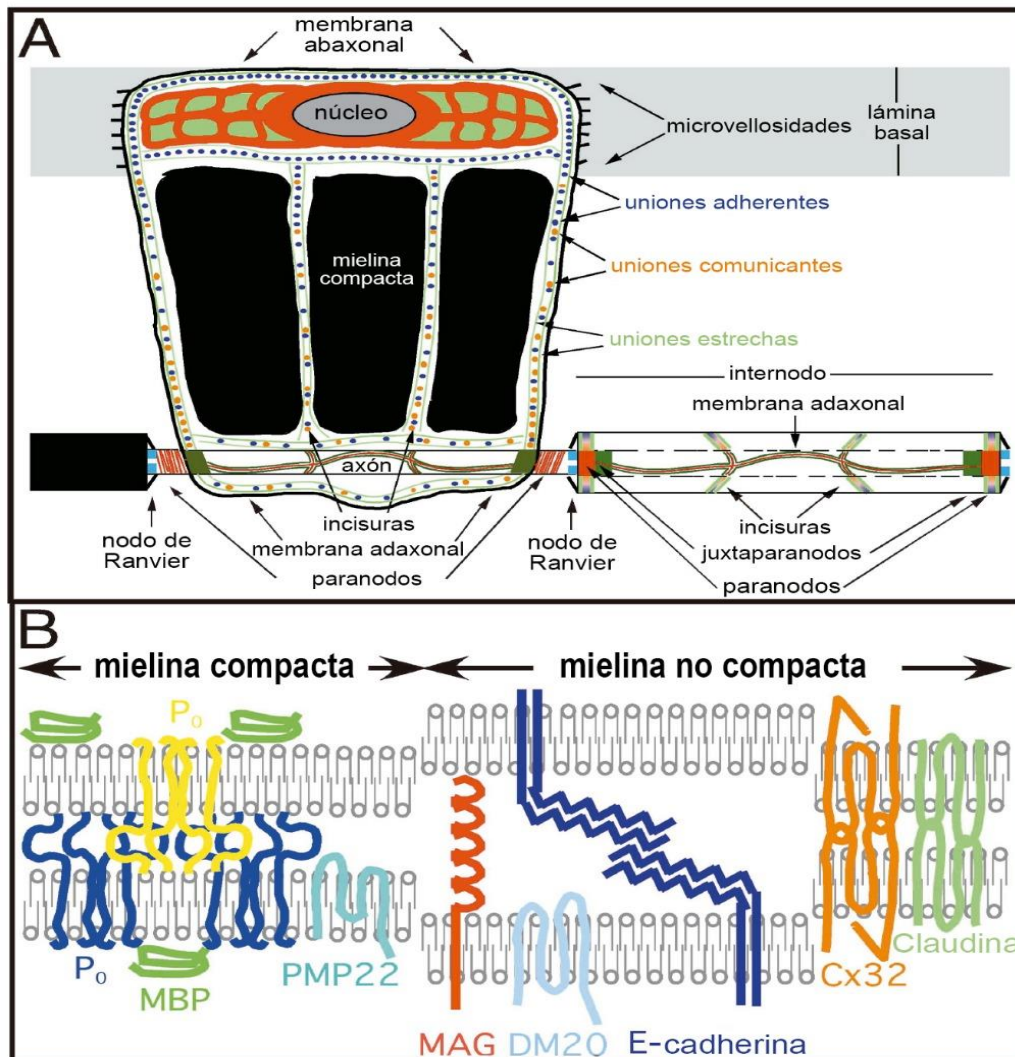


Figura 4. Organización de un axón mielinizado. **A)** Esquema de una CSFM extendida rodeada por la lámina basal (ilustrada en color gris), la cual está en contacto directo con la membrana abaxonal y las microvellosidades de la CS. La membrana abaxonal contiene el núcleo de la célula de Schwann y se divide por aposiciones periódicas que se forman entre la membrana abaxonal y la capa exterior de la mielina compacta. Al interior de la CSFM, la membrana adaxonal establece contacto con la membrana del axón. Entre la membrana adaxonal y la abaxonal se localiza la mielina compacta que es interrumpida por las incisuras de Schmidt-Lanterman (ISL), espacios citoplasmáticos entre los cuales se observan uniones adherentes, comunicantes y estrechas. Adyacente a la célula extendida se muestra una CSFM envolviendo una porción del axón (formando un internodo) que permite la conducción del impulso nervioso. **B).** También se muestran las proteínas presentes en la mielina compacta y la mielina no compacta. La mielina compacta contiene P0, MBP y PMP22; la mielina no compacta contiene E-caderina, MAG, DM20, Cx32 y claudina (Adaptada de Scherer y Arroyo, 2002).

1.2.3 Incisuras de Schmidt-Lanterman y Bandas de Cajal

Las incisuras de Schmidt-Lanterman (ISL) son porciones de citoplasma orientadas tanto longitudinalmente como transversalmente, que interrumpen la apariencia densa de la mielina compacta. Estas fueron descritas por Ramón y Cajal (1928) como segmentos cónicos infundibulares de longitud variable que se extienden desde el citoplasma de las CS al axón (Figura 5). Las ISL son propias de las regiones internodales siendo más abundantes en la región cercana al núcleo. La función de las incisuras está en debate, pero se ha sugerido que estas regiones de mielina no-compacta actúan como canales para el transporte de sustancias metabólicas (Martini, 2005); también se ha sugerido que tienen alguna función en el mantenimiento y metabolismo de la mielina, así como en el crecimiento longitudinal de la vaina de mielina (Arroyo y Scherer, 2007). El número total de incisuras varía de acuerdo con diferentes factores: se incrementa con el grosor de la mielina, la longitud internodal y la edad (Hiscoe, 1947; Ghabriel y Allt, 1979). También en respuesta a una lesión, se observa un incremento en el número de ISL en los internodos que han sufrido remielinización (Berger y Gupta, 2006). Se ha descrito una gran variedad de moléculas que se localizan en las incisuras que incluyen: actina, espectrina, MAG (Trapp et al., 1989), las uniones gap (Balice-Gordon et al., 1998; Meier et al., 2004), E-cadherina (Tricaud et al., 2005), los receptores de inositol 1,4,5 trifosfato (Martínez-Gómez y Dent, 2007; Toews et al., 2007), proteínas ERM (ezrina,

radixina, y moesina) (Scherer et al., 2001; Trapp et al., 1999) entre otras, sugiriendo la importancia de estas moléculas para la estabilización y la función de la mielina.

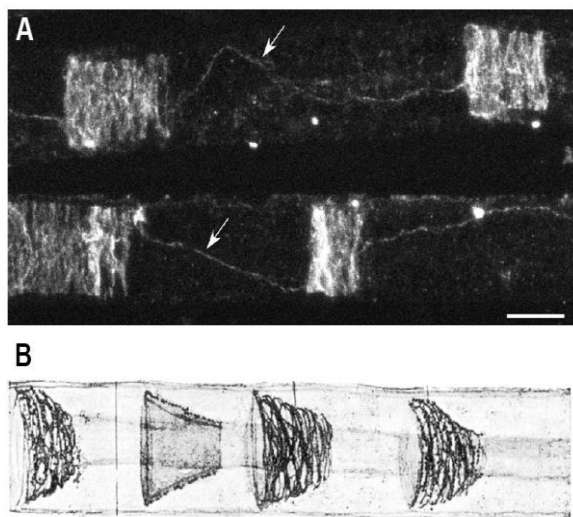


Figura 5. Región internodal interrumpida por la presencia de las incisuras de Schmidt-Lanterman. El panel A es una reconstrucción de una imagen con el microscopio confocal de dos fibras que resaltan el marcaje de las proteínas ERM presentes en las incisuras con un patrón en espiral. El panel B es un dibujo realizado por Ramón y Cajal (1928) que muestra a las incisuras como elementos infundibulares que se extienden a lo largo del citoplasma de las células de Schwann (Scherer y Arroyo, 2002).

Otras estructuras morfológicas descritas en la región internodal, son las bandas de Cajal (Santiago Ramón y Cajal, 1928), que se forman por la interrupción del citoplasma externo de la CS con aposiciones periódicas entre la membrana abaxonal y la envoltura externa de la mielina. Estos canales citoplasmáticos contienen L-periaxina, la proteína relacionada a distrofina 2 (DRP2), distroglicano (PDG); además están enriquecidas con proteínas del citoesqueleto y son importantes para la elongación del internodo durante el crecimiento de los nervios periféricos (Court et al., 2004); proporcionan un conducto para el transporte de ARN y proteínas originadas en el soma hacia la región paranodal (Susuki et al., 2011, Salzer, 2015).

1.2.4 Organización polarizada de la CS

El proceso de mielinización establece una relación estrecha entre una CSFM y el axón, generando una estructura altamente compartimentalizada organizada en dominios membranales discretos, cada uno con un arreglo único de proteínas. De tal modo que las CSFM son células altamente polarizadas, morfológica y molecularmente; presentan una

polaridad longitudinal determinada por la región nodal y una polaridad radial que va desde el axón (membrana adaxonal) hasta la lámina basal (membrana abaxonal) (Salzer, 2015).

1.2.4.1 Polaridad longitudinal

La polaridad longitudinal se centra alrededor de los nodos de Ranvier (Pereira et al., 2012; Salzer, 2017); está constituido por las regiones nodal, paranodal y juxtapanodal (Figura 6). Esta organización es crítica para la conducción saltatoria del impulso nervioso y se establece por la presencia de complejos multiproteicos de moléculas de adhesión celular (CAM), canales iónicos y moléculas adaptadoras de citoesqueleto o estructurales (Salzer et al., 2008; Eshed-Eisenbach y Peles, 2013).

Los nodos de Ranvier, descubiertos por el anatomista y patólogo francés Louis-Antoine Ranvier (1835-1922), son espacios que miden aproximadamente $1\mu\text{m}$ entre cada internodo que se repiten a lo largo de una fibra nerviosa individual, en esta región el axón queda expuesto al espacio extracelular (Salzer et al., 2008). El diámetro del axón a la altura del nodo difiere con respecto a las regiones paranodales e internodales, presenta una leve constricción que permite su identificación en secciones longitudinales; es en esta región del axón donde se acumulan una mayor cantidad de mitocondrias, vesículas y neurofilamentos (Zochodne, 2008).

El axolema en los nodos de Ranvier posee una alta cantidad de canales de Na^+ dependientes de voltaje (principalmente $\text{Na}_v1.6\alpha$) cuya función principal es la despolarización de la fibra nerviosa, permitiendo la conducción del impulso nervioso (Caldwell et al., 2000). También se concentran en esta región varias proteínas, como la molécula de adhesión celular-neural (NrCAM), la neurofascina de 186 kDa (NF186) (Davis et al., 1996) o ankirina_G que interacciona con los componentes de la CSFM y del citoesqueleto (Melendez-Vasquez et al., 2005). Además, los nodos hacen contacto con las asas paranodales, la lámina basal (continúa aún en esta región) (Arroyo y Scherer, 2007) y las microvellosidades que se proyectan de dos CSFM contiguas, y se encargan de vincular el citoplasma abaxonal de las CS con el axolema

nodal. Las microvellosidades están enriquecidas con el complejo de señalización ERM (ezrina, radixina, y moesina) (Salzer et al., 2008).

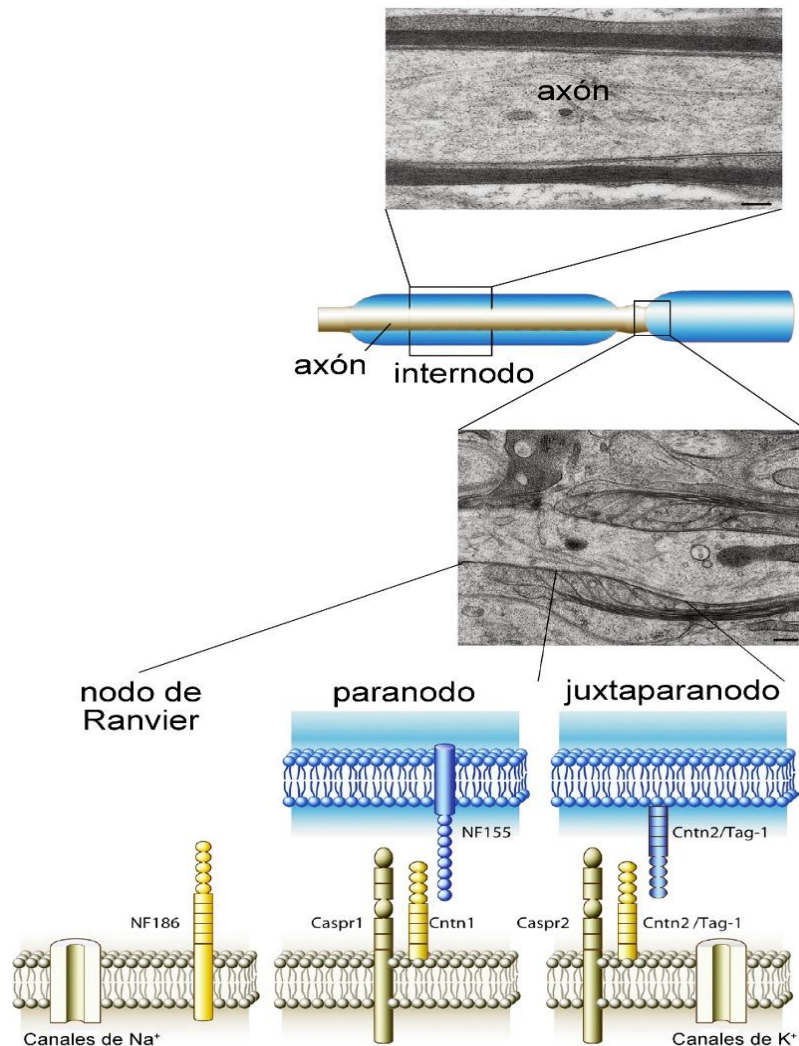


Figura 6. Composición molecular de la región nodal. Diagrama e imágenes de microscopía electrónica que muestran la polaridad longitudinal de un axón mielinizado. Cada uno de estos dominios se caracteriza por la expresión de proteínas específicas: la región nodal contiene canales de Na⁺ activados por voltaje, en la región paranodal la mielina está fuertemente unida al axón por un complejo formado por neurofascina-155 (NF155), contactina 1 (Cntn1), la proteína asociada a contactina (Caspr1), y la región juxtapanodal donde se encuentran la mayoría de los canales de K⁺ activados por voltaje que se separan de los paranodos por un complejo formado por la proteína la proteína asociada a contactina 2 (Caspr2) y contactina-2 (Cntn2) (Adaptada de Simons et al., 2014).

La región paranodal es contigua a la región nodal y está estructurada por asas de mielina, que forman las uniones paranodales axo-gliales que permiten que ocurra la mayor aproximación entre el axolema y la CSFM. Las uniones paranodales también son conocidas como uniones tipo septo, haciendo alusión a las uniones septadas observadas en invertebrados (Rosenbluth, 2009). En el axolema de la región nodal se localiza contactina (Cntn) y las proteínas asociadas a contactina (Caspr), dos moléculas de reconocimiento celular que se unen mediante sus dominios extracelulares a proteínas como la neurofascina de 155 kDa (NF155) que se expresan en las asas paranodales de las CSFM (Scherer y Arroyo, 2002; Salzer et al., 2008). La región paranodal tiene como objetivo fijar la mielina al axón e impedir la difusión lateral de los canales iónicos nodales (Poliak y Peles, 2003). Por último, la región juxtapanodal se ubica debajo de la mielina compacta, adyacente a la región paranodal, es rica en los canales de K^+ tipo “shaker”: Kv1.1 y 1.2 distribuidos con un gradiente de concentración que va en sentido decreciente desde el paranodo hasta el internodo. Esta región incluye un complejo formado por la glicoproteína transitoria 1 (Tag-1), que se localiza en la superficie glial, y Caspr2 en el lado axonal, ambas proteínas ayudan a mantener la estructura del dominio y permiten la localización de los canales de K^+ en sitios específicos (Traka et al., 2003). Los canales de K^+ actúan como un amortiguador de la reentrada del potencial de acción, al mantener el potencial de reposo del internodo y actuando activamente en el establecimiento del potencial de membrana después de la conducción del impulso nervioso (Poliak y Peles, 2003).

1.2.4.2 Polaridad radial

La vaina de mielina envuelve el axón en forma espiralada a través de múltiples capas de membrana plasmática; esta organización permite numerosas interacciones entre las moléculas presentes en la membrana externa (abaxonal) y la lámina basa, la membrana interna (adaxonal) con el axolema, estableciendo una polaridad radial que se puede observar a través de un corte transversal de un axón mielinizado (Figura 7) (Salzer, 2003; Poliak y Peles, 2003).

La región internodal es el sitio de interacción más extenso entre el axón y la CSFM comprende aproximadamente el 99% de la longitud de la región mielinizada. A lo largo del internodo, la membrana adaxonal se encuentra separada del axolema por un espacio de ~15nm denominado espacio periaxonal (Salzer et al., 2003) y la membrana abaxonal que interacciona con la lámina basal. En el exterior, la lámina basal se encuentra constituida principalmente por colágeno tipo IV, proteoglicanos (heparán sulfato) y lamininas (Bunge et al., 1990). Las lamininas son trímeros que interaccionan con los receptores ubicados en las CSFM, tanto integrinas $\alpha6\beta4$ como β -dístroglicano que son importantes en la mielinización (Figura 7) (Einheber et al., 1993).

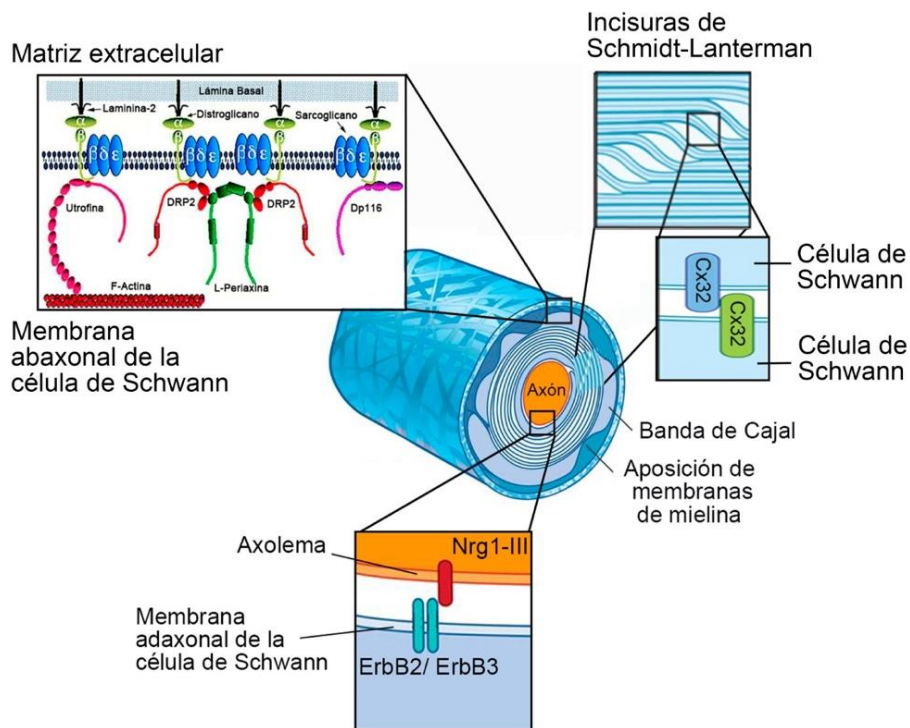


Figura 7. Polaridad radial de la CSFM. Diagrama de un corte transversal de un axón mielinizado. Se observan las múltiples capas de mielina que rodean al axón y la polaridad radial de la CS. La membrana abaxonal contacta con la lámina basal a través de interacciones moleculares entre laminina y dístroglicano. Al interior, en el espacio periaxonal ocurren interacciones moleculares entre la membrana adaxonal de la CSFM y el axolema, por otro lado, las incisuras de Schmidt-Lanterman, que expresan Cx32 formando uniones GAP, contactan radialmente la membrana abaxonal y adaxonal en la CSFM (Adaptado de Scherer y Arroyo, 2002; Salzer, 2015).

1.3 Degeneración Walleriana

Cuando se produce daño en los nervios periféricos, debido a la transección (corte parcial o total del nervio) o a la compresión del nervio, los axones y la mielina asociada a ellos se degeneran (degeneración Walleriana) (Stoll et al., 2002). La degeneración Walleriana (DW), descrita por primera vez por Augustus Waller (1850), es el proceso de degeneración rápida y progresiva que sufre la porción distal de un axón cuando es separado del soma neuronal. Esta respuesta del sistema nervioso es atribuida principalmente a la ruptura y degradación tanto de los axones lesionados como de las capas de mielina debido, principalmente, a una lesión traumática, aunque también se puede presentar la degeneración axonal en algunas enfermedades neurodegenerativas (esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer y Parkinson (Coleman y Perry, 2002).

Después de una lesión, los axones tanto del SNC como del SNP se degeneran; sin embargo, en este último, los axones poseen un sorprendente potencial de regeneración que les permiten crecer y formar nuevas conexiones. Para lograrlo, el nervio pasa por tres procesos principales: la DW, la regeneración axonal y la reinervación con el órgano blanco que le permite formar nuevas conexiones. El fracaso en cualquiera de estos procesos puede contribuir a un resultado poco funcional (Menorca et al., 2013).

La lesión axonal provoca una cascada de eventos que incluyen, degeneración axonal, desmielinización, desdiferenciación y proliferación de las CS, reclutamiento de macrófagos circundantes, reorganización del espacio endoneural, así como la elevación de neurotrofinas y la producción de citocinas. Estos eventos celulares y moleculares que ocurren en la porción distal del nervio lesionado en el SNP inducen el desarrollo de un microambiente que estimula la regeneración del axón (Dubový, 2011).

1.3.1 Clasificación de la lesión en el nervio periférico

El tiempo y el éxito de la reparación del nervio dependen del tipo y la extensión de la lesión en el nervio. Se ha desarrollado un sistema de clasificación, clínicamente útil, que permite correlacionar los cambios microscópicos que ocurren cuando los axones del nervio se desconectan parcial o totalmente del cuerpo neuronal. Esta clasificación divide las lesiones en tres categorías: neuropraxia, axonotmesis y neurotmesis (Figura 7) (Seddon et al., 1943) la cual ha facilitado el desarrollo de modelos experimentales para estudiarlas.

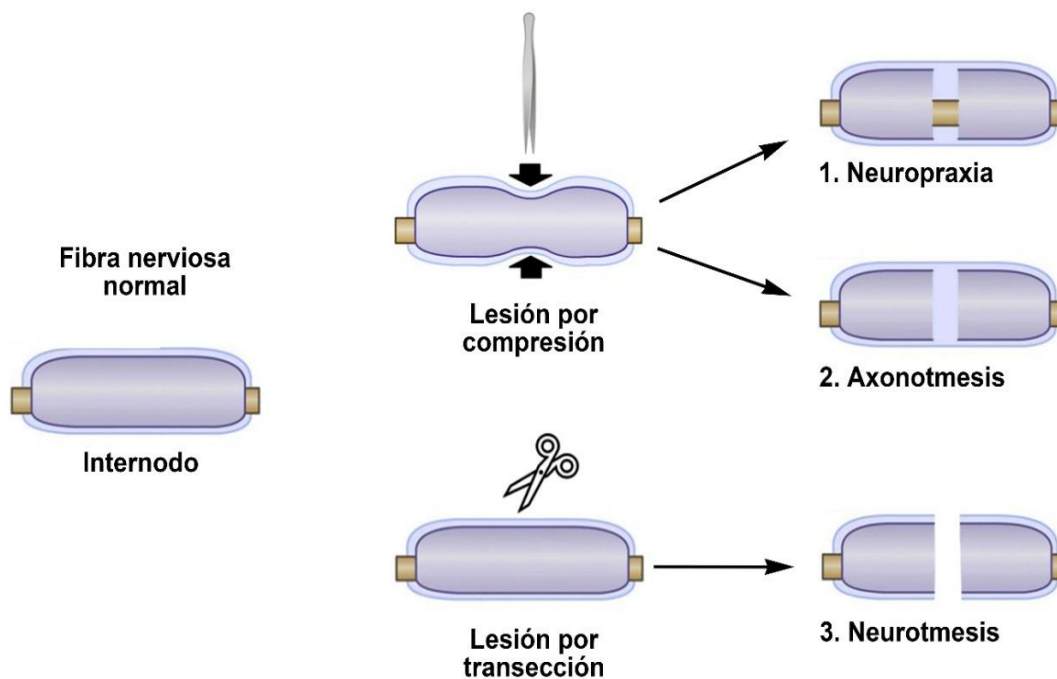


Figura 8. Clasificación de Seddon para las lesiones del nervio periférico. Diagrama que muestra los tres tipos de daño que puede sufrir un nervio después de una lesión por transección o compresión. 1) Neuropraxia, que solo altera la vaina de mielina; 2) Axonotmesis, que altera al axón y la vaina de mielina, pero mantiene la estructura de la lámina basal; 3) Neurotmesis en la que se altera toda la fibra mielinizada incluida la lámina basal (Adaptada de Belin et al., 2017)

La neuropraxia es el tipo de lesión menos severa que sufre el nervio debido a una ligera compresión mecánica o isquemia, en la cual se mantiene la integridad del axón y el tejido conectivo, siendo la vaina de mielina la principal afectada. Esta lesión es transitoria, afecta la propagación del impulso nervioso a través del segmento afectado, pero es completamente reversible (Belin et al., 2017).

La axonotmesis es una lesión severa producida por el aplastamiento o compresión del nervio que provoca tanto la interrupción axonal como el daño en la vaina de mielina, pero preserva la continuidad de la lámina basal y del tejido conectivo. En la porción distal con respecto al sitio de la lesión, los axones y la mielina se degeneran (Jessen y Mirsky, 2016). Sin embargo, las posibilidades de recuperación en esta lesión son muy buenas. Después de cierto tiempo se inicia una regeneración axonal y una paulatina remielinización, debido al entorno celular que proporciona señales moleculares que permiten que el axón se regenere y facilitan la adecuada reinervación hacia su blanco y su recuperación funcional. En el modelo murino, la regeneración axonal después de una lesión por aplastamiento es casi completa (Dubový, 2011), de tal modo que alrededor de las 4 a 6 semanas después de la lesión, el nervio, fibras sensoriales y motoras recuperan su función.

Finalmente, la neurotmesis es una lesión dramática en la cual los axones, el tejido conectivo y la lámina basal están desconectados del soma. Este tipo de lesión se presenta cuando se corta el nervio, como ocurre en un traumatismo mecánico. Se observa que el proceso de regeneración es ineficiente ya que la continuidad entre la región proximal y el blanco se pierde, y es menos probable que los axones encuentren el camino para recuperar la conexión, lo que compromete la restauración adecuada de la función. Desafortunadamente, en humanos la mayoría de las lesiones de nervio ciático involucran la transección del tejido y menos frecuente el tipo de lesión por compresión que conlleva una forma más sencilla de reparación (Belin et al., 2017).

1.3.2 Eventos de la degeneración Walleriana

La robusta capacidad regenerativa del SNP está determinada, en parte, por los eventos moleculares y celulares que ocurren en el segmento distal del nervio respecto al sitio de la lesión antes de que ocurra la regeneración de las fibras nerviosas (Figura 9).

El primer signo observable en la región distal es el ensanchamiento o edema en la membrana del axón que ocurre entre las 8 y las 24h después de la lesión (Pettersson y Tengvar, 1986; Vargas y Barres, 2007). Esta etapa se acompaña por el movimiento de Ca^{2+} que ocurre después de la lesión al nervio (Krause et al., 1994). Dado que los axones se desconectan del cuerpo celular se presenta un aumento en la concentración de Ca^{2+} intracelular (14-24 h) que promueve la actividad de calpaínas que degrada proteínas del citoesqueleto y causa la subsecuente desintegración de la membrana del axón (Dubový, 2011; Lim et al., 2017) y su degeneración en pequeños fragmentos. Como consecuencia, se presenta la pérdida de la continuidad axonal y del impulso nervioso así como cambios en las CS, mielina, macrófagos y otras células sanguíneas.

El curso temporal de la fragmentación axonal depende de la especie, la distancia de la lesión desde el soma de la neurona y el diámetro del axón. La degeneración axonal en ratas inicia 24h después de la lesión, mientras que en primates y humanos puede retrasarse por varios días en primates y humanos (Vargas y Barres, 2007). Estas diferencias entre especies se atribuyen a la longitud y el calibre del axón, ya que los axones de menor calibre se degeneran mucho más rápido que los axones más largos o de mayor calibre (Lubinska, 1977).

Con la pérdida del contacto axonal, la mielina se fragmenta en pequeños segmentos de forma ovoide. Morfológicamente, la fragmentación de la mielina ocurre cerca de las ISL, de tal manera que los ovoides de mielina se encuentran delimitados por estas regiones de citoplasma que interrumpen la mielina (Ghabriel y Allt, 1979). En este punto, el citoplasma abaxonal y las bandas de Cajal son prácticamente imperceptibles debido a la presencia de los ovoides (Park et al., 2019). Poco después de que la mielina compacta comienza a desintegrarse, el citoplasma de la CSFM se dilata y se localizan ovoides de tamaños

heterogéneos, entre ellos mielinosomas que son fragmentos de mielina que se desprenden de los ovoides. Esta secuencia de procesos se considera como evidencia morfológica de la destrucción activa de la mielina durante la DW (Park et al., 2019) (Figura 9B).

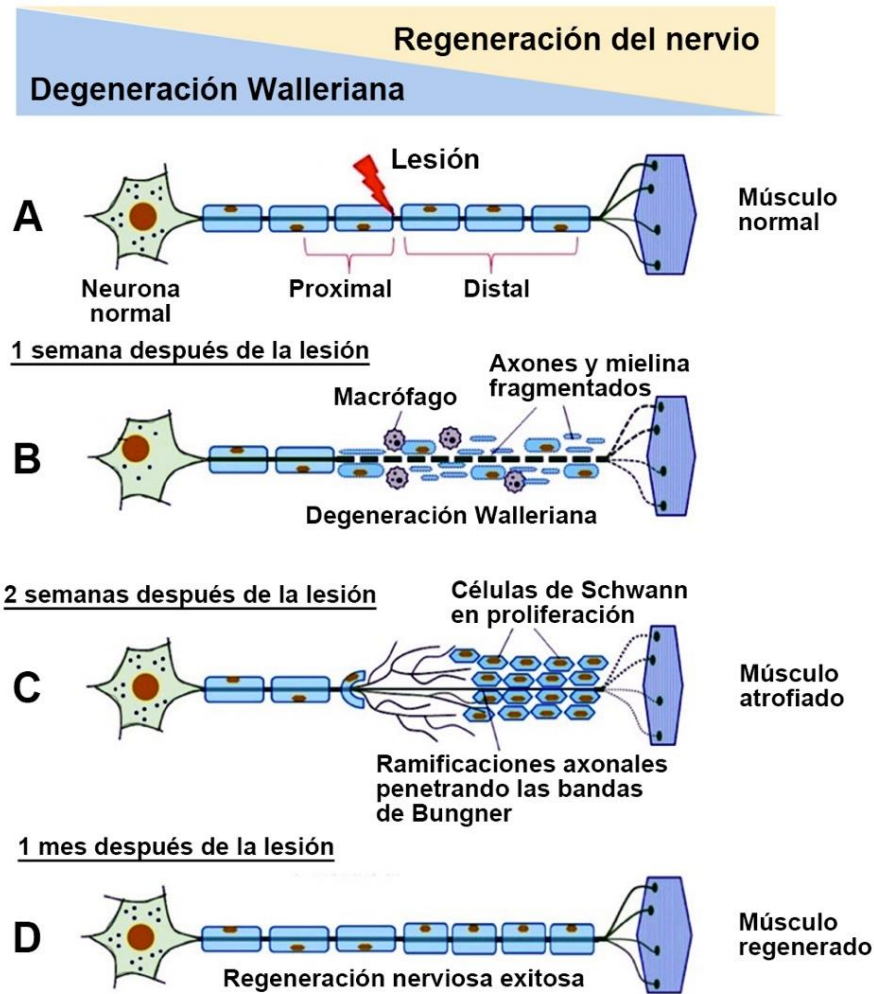


Figura 9. Cambios en el nervio periférico después de una lesión: degeneración y regeneración. (A) Axón mielinizado no lesionado. (B) En respuesta a una lesión, el axón y su envoltura de mielina se degeneran en la parte distal con respecto a la lesión. Los macrófagos invaden la región distal, penetran la lámina basal, y fagocitan la mielina en degeneración. (C) En la parte proximal, se forma el cono de crecimiento, el axón comienza a regenerarse dentro de las bandas de Bungner que corresponden a CS en proliferación, las cuales contribuyen a la regeneración axonal y la eventual remielinización. (D) Nervio periférico reparado y remielinizado, los internodos regenerados son más pequeños (Adaptado de Arslantunali et al., 2014)

El desarrollo de los ovoides facilita la degradación de la mielina para la regeneración axonal ya que la eliminación de la mielina es importante para promover un ambiente favorable para la regeneración. En el SNP existen mecanismos tanto intrínsecos como extrínsecos para removerla. La eliminación de los ovoides de mielina es orquestada primero por las propias CS (Jessen y Mirsky, 2016) a través de un proceso denominado mielinofagia, y después por macrófagos que se infiltran al sitio de la lesión, a los 3-4 días, y concluyen el proceso de fagocitosis (Gaudet et al., 2011).

1.3.3 Papel de las células de Schwann en la degeneración Walleriana

La regeneración de los nervios lesionados depende de la inusual plasticidad de las CSFM y las células Remak así como su habilidad para adoptar una nueva identidad durante el proceso de reparación. Es decir, un cambio en el fenotipo hacia un tipo celular especializado para promover la sobrevivencia de las neuronas, la regeneración axonal, la fagocitosis de la mielina y para guiar el crecimiento de los axones hacia su blanco (Jessen y Mirsky, 2016).

La plasticidad de las CS, que se observa en la región distal respecto a la lesión, les permite adaptarse mediante la proliferación y la conversión en células que promueven la regeneración y que se conocen como CS de reparación. Después de la degeneración axonal, las CSFM y las células Remak comienzan a proliferar, y se incrementan considerablemente en la porción distal, éstas revierten a un fenotipo parecido, pero no igual, al de las CS inmaduras debido a que han perdido el contacto axonal (Jessen y Mirsky, 2016). Los cambios que se inducen en la CS han sido caracterizados como desdiferenciación o activación porque en cierta medida la conversión de CSFM a un fenotipo de reparación implica tanto la pérdida (desdiferenciación) como la ganancia (activación) de ciertas funciones celulares (Jessen y Mirsky, 2015). De este modo, ambas CS sufren una reprogramación para adquirir un fenotipo especializado para la reparación del nervio, y expresan moléculas que caracterizan a las CS pre-mielinizantes tales como: L1 NCAM, receptor de neurotrofina p75, GFAP y muchas otras (Jessen y Mirsky, 2008; Jessen y Mirsky, 2016). Además, disminuyen la expresión de genes asociados con la mielinización (Krox20), con las enzimas para la síntesis de colesterol, proteínas estructurales (P0, MBP, PMP, MAG y periaxina) (Jessen y Mirsky, 2008); y

aumenta la expresión de diferentes factores de transcripción, entre ellos c-Jun un regulador clave de las CS de reparación (Arthur-Farraj et al., 2012) que promueve la expresión del programa de reparación, que incluye el aumento de factores tróficos para el crecimiento axonal, el mecanismo de degradación de la mielina y la formación de las bandas de Bungner (Jessen y Arthur-Farraj, 2019) (Figura 10).

Entre los días 3-4 después de la lesión, en roedores, las CS de reparación proliferan, adoptan una morfología elongada bipolar, y se alinean en columnas dentro de la lámina basal formando las bandas de Bungner que proporcionan soporte estructural y sustrato para la regeneración de los axones (Stoll y Muller, 1999). Estas células de reparación secretan factores neurotróficos y proteínas de superficie que proporcionan sustento a las neuronas dañadas y guían el crecimiento de los axones hasta que establecen el contacto axonal (Gaudet et al., 2011). Se caracterizan por la expresión de-novo del factor de transcripción de oligodendrocitos (Olig1), sonic hedgehog (Shh), la expresión del factor neurotrófico derivado de las células gliales (GDNF), del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), así como de neurotrofina-3 (NT3), artemina, factor de crecimiento del nervio (NGF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), eritropoyetina, pleiotrofina, P75NTR, y N-caderina (Jessen y Mirsky, 2016). También secretan citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF), interleucinas 1 (IL-1), IL-6, y proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) las cuales median la infiltración de macrófagos y neutrófilos (5-14 días) del torrente sanguíneo al sitio de la lesión y permiten a las CS interactuar con las células del sistema inmune. Las citocinas como IL-6 y LIF además de atraer a los macrófagos actúan directamente sobre las neuronas para promover el crecimiento axonal (Bauer et al., 2007).

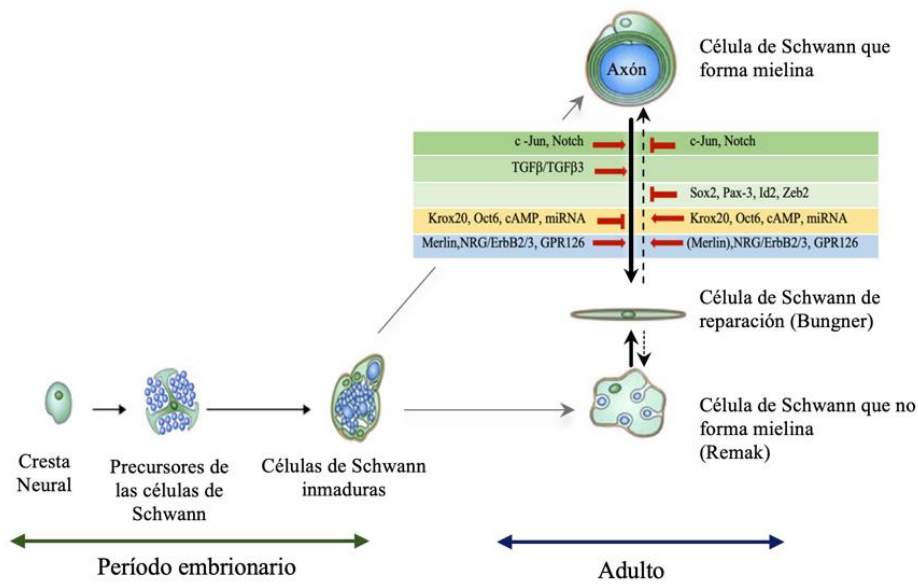


Figura 10. Señales que regulan la respuesta a la lesión de las células de Schwann y la remielinización.

El diagrama indica los principales sistemas moleculares implicados en la generación de las células de reparación (a la izquierda de las flechas continuas) o mielinización/remielinización (a la derecha de las flechas discontinuas). También se muestran los precursores de las células de Schwann (Jessen y Arthur-Farraj, 2019)

Otra característica de las CS de reparación es la activación de un programa intrínseco que elimina la mielina, la mielinofagia, que se realiza en forma cooperativa entre las CS y los macrófagos. Primero las CS permiten que se degrade cerca del 50 % del total de la mielina en los primeros 3 a 7 días a través de la autofagia que libera la mielina de las CS a los lisosomas para su hidrólisis. Después los macrófagos infiltrados cooperan junto con las CS para remover los restos de mielina y de los axones durante la segunda fase de depuración de la mielina (Rotshenker, 2011), siendo además una fuente adicional de citocinas y participando en la producción de factores mitogénicos para las CS y fibroblastos, así como en promover la vascularización del nervio (Cattin et al., 2015). La combinación de estos eventos cumple un papel muy importante en la regeneración del nervio.

1.3.4 Regeneración del nervio

La regeneración del nervio en lesiones severas comienza después de que la DW ha concluido, pero en lesiones menos graves, como la axonotmesis, el proceso de reparación y regeneración inicia casi inmediatamente después del daño (Burnett y Zager, 2004). Estudios ultraestructurales han mostrado que los axones del SNP en mamíferos comienzan a crecer 24 horas después de que ocurre la lesión (Yang et al., 2016).

La porción del axón de la parte proximal forma un cono de crecimiento que se extiende como filopodios hacia la región distal, orientados por la presencia de actina y miosina que se localizan dentro del cuerpo celular (Menorca et al., 2013). La movilidad del cono de crecimiento depende de la presencia de receptores de tirosina cinasa presentes en la membrana que responden a moléculas como semaforinas, efrinas, netrinas y colapsina-1 (Goodman, 1996). También participan factores neurotróficos como NGF que son importantes en el proceso de reparación nerviosa (Dodd y Jessen, 1988). La tasa de crecimiento axonal es variable, en humanos se ha estimado que es de 1mm/d, sin embargo depende de la naturaleza y severidad de la lesión, la duración de la degeneración, las condiciones del tejido nervioso (Menorca et al., 2013). El envejecimiento también retarda la regeneración del axón (Burnett y Zager, 2004).

El proceso de reparación que promueve el crecimiento axonal y su remielinización no es un proceso sincronizado en todas las fibras, siendo más bien una secuencia temporal de eventos que se sobrelapan con la desmielinización y cooperan para favorecer la reparación del tejido. El cono de crecimiento avanza hacia la porción distal en el interior de la lámina basal y se encuentra con los restos de mielina que se observan en la DW sin que éstos representen un impedimento, quizá porque los conos de crecimiento secretan al activador de plasminógeno que ayuda a disolver el material que bloquea su camino (Kryostesek y Seeds, 1981).

La regeneración axonal no es sinónimo de la recuperación de la función, pues es necesario que ocurra un proceso de maduración que precede a la recuperación funcional para lograrlo. La remielinización se realiza de manera similar a la que ocurre en el desarrollo de las fibras

nerviosas; implica la participación de las CS que envuelven al axón formando una envoltura multilaminar alrededor de éste. Una vez que los axones se han regenerado, con base en el nivel de NRG1 tipo III en el axón y su unión a sus receptores afines ErbB2/ErbB3 en las CS, estas glías volverán a mielinizar a los axones en crecimiento en un periodo de 14 a 30 días en ratas (Bhatheja y Field, 2006). La mielina se restablece, pero con una estructura alterada; el número de lamelas de mielina decrece, y el número de internodos por unidad del tamaño de la fibra se incrementa. Una serie de pequeños internodos resultan cuando nuevos nodos de Ranvier se forman en regiones que previamente eran internodales y la densidad de los canales de Na⁺ es significativamente más elevada que la densidad inicial (Schröder, 1972). El diámetro del axón aumenta progresivamente hasta alcanzar dimensiones normales, pero depende del establecimiento de conexiones funcionales con el órgano blanco para lograrlo.

1.4 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 extracelulares mantengan su isotonicidad, necesaria para la homeostasis intracelular (Sánchez, 2003). Por muchos años se asumió que el transporte de agua ocurría únicamente por un mecanismo de difusión simple, dado que el agua puede atravesar la membrana. Sin embargo, desde hace varias décadas se había reunido evidencia que apuntaba hacia un mecanismo adicional mucho más rápido para el transporte del agua a través de la membrana, descubriéndose unas moléculas proteicas que recibieron el nombre de acuaporinas (AQPs), las cuales permiten el paso de agua a través de la membrana con muy pocas restricciones (López-Domínguez y Pasantes, 2009).

La identificación de las AQPs fue realizada por Agre y colaboradores en la década de 1990, quienes describieron por casualidad una nueva proteína en la membrana de los eritrocitos con un componente no glicosilado de 28 kDa y un componente glicosilado que migra como una banda difusa de 35-60 kDa (Denker et al., 1988), organizada en forma de tetrámeros, que fue llamada inicialmente CHIP28 (*CH*annel-*l*ike *I*ntegral *P*rotein de 28 kDa), permeable

selectivamente al agua y que explicaba la elevada permeabilidad a ésta en las membranas en que estaba presente; posterior a su clonaje y secuenciación, esta proteína recibió el nombre de acuaporina 1 (AQP1) (Li et al., 2020). Por su importante descubrimiento sobre los “canales de agua” en la membrana celular, Peter Agre fue galardonado con el premio Nobel de Química en 2003.

Las AQPs se encuentran ampliamente distribuidas en mamíferos, plantas y organismos inferiores (Carbrey y Agre, 2009) lo que demuestra que son importantes para el mantenimiento de la fisiología normal de los organismos. En mamíferos se han identificado hasta ahora 13 AQPs (de la 0 a la 12), que pueden clasificarse en subgrupos: acuaporinas clásicas u ortodoxas, acuagliceroporinas y las acuaporinas no-ortodoxas también llamadas S-acuaporinas (Verkman, 2008). El primer subgrupo, las acuaporinas ortodoxas, permeables específicamente para agua incluye a la AQP0, AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP6 y AQP8; con excepción de AQP6, tales AQPs se muestran impermeables a solutos dotados de carga eléctrica e iones; el segundo grupo, las acuagliceroporinas, son canales permeables al agua y a pequeñas moléculas sin carga como amonio, urea y glicerol, y son las AQP3, AQP7, AQP9 y AQP10, finalmente las S-acuaporinas, que difieren un poco en la estructura del resto de las acuaporinas, son AQP11 y AQP12, cuya función y estructura se encuentra en estudio, pero se ha observado que son canales que se encuentran dentro de la célula (Verkman, 2008; Li y Wang 2017). AQP11 se localiza en el retículo endoplásmico y es capaz de transportar agua y peróxido de hidrógeno (Bestetti et al., 2020).

La permeabilidad de la AQP1 al agua es alta, llegando a transportar tres mil millones de moléculas de agua por segundo, y cifras cercanas para casi todas las demás (Zeidel ML et al., 1994) con una energía de activación baja (<5kcal/mol). Las AQPs son altamente selectivas al paso del agua impidiendo el paso de protones, y como se mencionó, sólo algunos subtipos de AQPs permiten el paso de moléculas pequeñas como la urea y el glicerol. El transporte de agua y solutos en las AQPs es bidireccional, determinado por el gradiente electroquímico del agua. Es decir, 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 pueden ser regulados

por diferentes mecanismos también determinan la intensidad del transporte (Carbrey y Agre, 2009).

1.4.1 Estructura y selectividad de las acuaporinas

La familia de AQPs presenta similitud estructural. El subtipo mejor caracterizado es la AQP1. Observaciones cristalográficas han mostrado que esta proteína se organiza en tetrámeros con cuatro monómeros idénticos que forman el canal de agua (Figura 11A). La unidad monomérica de cada AQP (~30 kDa), presenta seis dominios transmembranales de tipo α -hélice (M1, M2, M4, M5, M6 y M8), dos medias hélices (M3 y M7) y 5 asas conectoras (a-e), con sus segmentos amino y carboxilo terminal orientados hacia el citoplasma (Figura 11B, C). Esta organización permite la formación de un poro cuyo diámetro es de 2 nm de largo por 0.3 nm de ancho (Verkman et al., 2014). Esta dimensión limita el paso de la mayoría de las moléculas presentes en los fluidos biológicos y permite que la estructura sea similar a un reloj de arena.

La selectividad al paso del agua es muy alta en las AQPs; la estructura del poro acuoso evita la disipación del gradiente electroquímico (Verkman et al., 2014) ya que impide que el agua protonada (H_2O^+) sea capaz de atravesar la barrera formada por residuos de aminoácidos aromáticos y arginina (conocido como constricción ar/R), el cual está conservado en todos los miembros de la familia y ocupa una posición estratégica en el poro. La constricción ar/R es la región más estrecha del poro y tiene un diámetro de $\sim 2.8 \text{ \AA}$ en la AQP1 de humano y $\sim 3.4 \text{ \AA}$ para las acuagliceroporinas (Fu et al., 2000; Sui et al., 2001).

Existe una segunda barrera al paso de protones, formada por un fuerte dipolo en el centro del poro que posee la secuencia asparagina-prolina-alanina (NPA), ubicados en las asas b (citoplasmática) y c (extracelular), que reorienta las moléculas de agua eliminando las interacciones entre una molécula y la siguiente, lo cual elimina la posibilidad del transporte simultáneo de protones. La región NPA se encuentra muy conservada y es un motivo que caracteriza a las AQPs (Sui et al., 2001). La presencia de un residuo alternativo a His-180, como Gly, está asociado con un mayor diámetro del poro, como sucede en las

acuagliceroporinas, lo cual permite el paso de glicerol y otros solutos. Finalmente, la estructura atómica de la AQP1 se ha determinado con resolución de 3.8Å (Murata et al., 2000). Esto ha permitido una correlación precisa entre aminoácidos específicos y la estructura 3D de la AQP1.

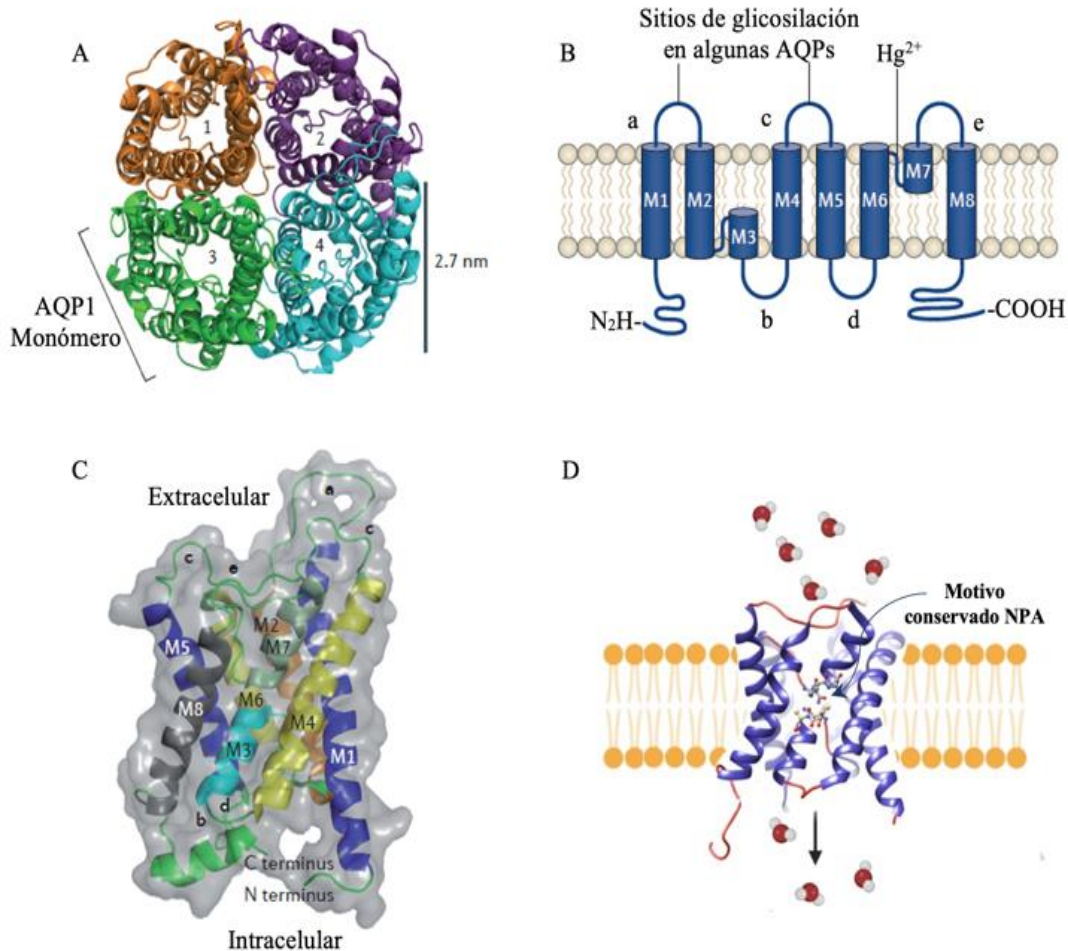


Figura 11. Estructura de las acuaporinas. A. Arreglo tetramérico de la AQP1. B. Esquema de la topografía de la AQP1 en la membrana celular. C. Estructura del monómero de AQP1 que muestra los dominios α -hélice (M1-M8) unidos por cinco asas conectoras (a-e). D. Representación de la AQP1 con los dos motivos NPA (asparagina-prolina-alanina) esenciales para la selectividad de la molécula (Adaptado de Verkman et al., 2014).

1.4.2 Regulación de las acuaporinas

Las AQP_s constituyen un grupo de las proteínas de membrana que se cuentan entre las mejor caracterizadas en términos de estructura. Esto ha permitido comprender la base estructural para el transporte y la selectividad, pero en términos de regulación todavía existe una gran interrogante pues a pesar de que mantienen una estructura conservada se regulan diferencialmente dependiendo del organismo y tejido en el que se expresan (King et al., 2004; Kreida et al., 2015). La permeabilidad de cada canal y su abundancia en la membrana celular determinan la intensidad del transporte, y como se mencionó, ambos parámetros pueden ser regulados (Carbrey y Agre, 2009). Las regiones importantes para la regulación se ubican, principalmente fuera del dominio transmembranal que comparten las AQP_s, en las asas conectoras y en la región carboxilo terminal (Sjöhamn y Hedfalk, 2014). Esta regulación ya sea de corto o de largo plazo ocurre a través de diferentes mecanismos (Zelenina, 2010). El primero, es mediado por cambios conformacionales de la proteína que modifican la apertura del canal, o modificaciones postraduccionales a través de la fosforilación o desfosforilación de sitios cruciales en la AQP que cambia la capacidad para unirse a otras proteínas reguladoras o a proteínas del citoesqueleto que pueden controlar el transporte de las proteínas hacia la membrana, dirigir su degradación y, en el caso de la activación, si la AQP está abierta o cerrada (Nesverova y Törnroth-Horsefield, 2019). Como resultado de esta regulación dinámica, la localización subcelular de las AQP_s puede cambiar en segundos o minutos lo que conduce a cambios inmediatos en la permeabilidad de la membrana (Zelenina, 2010).

Con excepción de la AQP₀, principal acuaporina del cristalino, que se regula por el pH y es dependiente de Ca²⁺ (Nemeth-Cahalan et al., 2013), el mecanismo regulador predominante de las AQP_s de mamífero está mediado por la interacción con proteínas que afecta directamente el transporte o la translocación molecular de vesículas intracelulares hacia la membrana, como ocurre con la AQP₂ en el túbulo colector del riñón. Este cambio involucra un mecanismo mediado por la hormona antidiurética que, tras la deshidratación, desencadena la redistribución de la AQP₂ de vesículas intracelulares a la membrana apical (Frick et al., 2014).

Otro mecanismo de regulación que responde rápidamente a los cambios en el ambiente extracelular en una escala de segundos se ha descrito con la AQP1, que se transloca a la membrana debido al aumento de Ca^{2+} intracelular y la fosforilación de dos residuos de treonina por la acción de la PKC (proteína cinasa C) (Conner et al., 2012). También se han descrito varias proteínas que interactúan con las AQPs, que incluyen a la calmodulina (AQP0, AQP6), el regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) (AQP4, AQP9), sintrofina (AQP4), las proteínas de choque térmico HSC70, HSP70 (AQP2), etc. Estos ejemplos destacan la complejidad de las interacciones proteína-proteína en las que participan las AQPs para su regulación (Roche y Törnroth-Horsefield, 2017). La regulación a largo plazo, es mediada por cambios en la expresión del ARNm, la síntesis de proteínas y su tasa de degradación. Estos factores pueden alterar, en horas o días, la abundancia de las proteínas y por lo tanto la permeabilidad de la membrana donde se localiza la AQP (Zelenina, 2010). Los microRNA (miRNA), son riboreguladores, y también se ha mostrado que participan en la regulación transcripcional del gen, se ha descrito que modulan la expresión de algunas AQPs (AQP1, AQP2 y AQP4) (Bijkerk et al., 2018; Sepramaniam et al., 2010).

1.4.3 Acuaporinas en el sistema nervioso central

Las AQPs están distribuidas ampliamente en los tejidos, con múltiples papeles fisiológicos (Verkman, 2002; Zelenina, 2005). Frecuentemente hay más de una AQP en los órganos típicamente diseñados para transportar grandes volúmenes de agua como el riñón. En las últimas dos décadas, los estudios sobre la expresión y función de las AQPs en el sistema nervioso se han enfocado al SNC (Papadopoulos y Verkman, 2013). En el cerebro la homeostasis del agua es de vital importancia fisiológica y clínica, ya que el 80% del peso del cerebro es agua (Badaut et al., 2014). El transporte de agua está vinculado a funciones como la producción y drenaje del líquido cefalorraquídeo, regulación del volumen celular y el control de las dimensiones del espacio extracelular. En un contexto fisiopatológico el transporte de agua juega un papel importante en el edema cerebral que puede conducir a una hernia cerebral o la muerte (Xu et al., 2017).

Hasta la fecha se han identificado nueve AQPs, AQP1, AQP3, AQP4, AQP5, AQP6, AQP7, AQP8, AQP9 y AQP11, en el cerebro y en la médula espinal (Albertani y Bianchi, 2010; Xu et al., 2017) (Figura 12). Sin embargo, solo se ha establecido el papel fisiológico de tres de ellas (AQP1, AQP4 y AQP9) que además de participar en el transporte de fluidos en el cerebro, tienen un papel importante en diferentes funciones celulares como la proliferación y la migración celular, la apoptosis, el edema cerebral, la fagocitosis y en la transducción de señales (Benga, 2009; Carbrey y Agre, 2009; Verkman, 2012).

La AQP1 se expresa principalmente en el plexo coroideo donde contribuye a la producción del fluido cerebroespinal (Oshio et al., 2005). También se ha localizado en las neuronas del asta dorsal de la médula espinal, se considera que participa en la señalización del dolor, y posiblemente tenga un papel en la remodelación y plasticidad axonal que es necesaria para los procesos sensoriales normales (Nesic et al., 2008). La AQP1 se sobreexpresa en algunos trastornos en el cerebro como: astrocitomas, tumores del plexo coroideo, lesión en la médula espinal y subependimomas (Xu et al., 2017).

La AQP4, que es la forma predominante en el cerebro y la más estudiada, se expresa principalmente en los pies de los astrocitos, el espacio subaracnoideo y en estructuras del cerebro, como la médula espinal, el nervio óptico, la retina, los órganos periventriculares y en las células endoteliales que alinean los ventrículos y el cerebelo (Xu et al., 2017). La extensa distribución de la AQP4 en el cerebro sugiere su participación en la homeostasis del agua en este órgano, en la formación del edema cerebral, y en funciones como migración astrogliar, transducción neuronal, neurogénesis, en los gliomas y en la neuroinflamación (Papadopoulos y Verkman, 2013; Zelenina, 2010).

La AQP9, un canal permeable para agua, glicerol, urea y monocarboxilatos se expresa en diferentes regiones del cerebro: tanicitos del hipocampo, células endoteliales de los ventrículos (Elkjaer et al., 2000) y en las neuronas dopaminérgicas. También se localiza en los astrocitos y en la glía de Bergmann (Badaut et al., 2001). Su papel en el cerebro se asocia con el metabolismo de las neuronas, además de contribuir al mantenimiento de la

homeostasis del agua y la formación del edema cerebral, similar a la AQP4 (Potokar et al., 2016).

Actualmente se sabe muy poco sobre la función de las AQP3, AQP5, AQP8 y AQP11 en el cerebro. AQP3, 5 y 8 se han encontrado en astrocitos, la corteza piriforme, hipotálamo, globo pálido y el plexo coroideo (Yang et al., 2011; Koike et al., 2016); en los oligodendrocitos se ha detectado AQP8 (Yamamoto et al., 2001), en las células de Purkinje y las neuronas corticales se ha encontrado la expresión de AQP11 (Gorelick et al., 2006), pero se requiere mayor investigación para esclarecer el papel fisiológico de cada una de ellas en el cerebro.

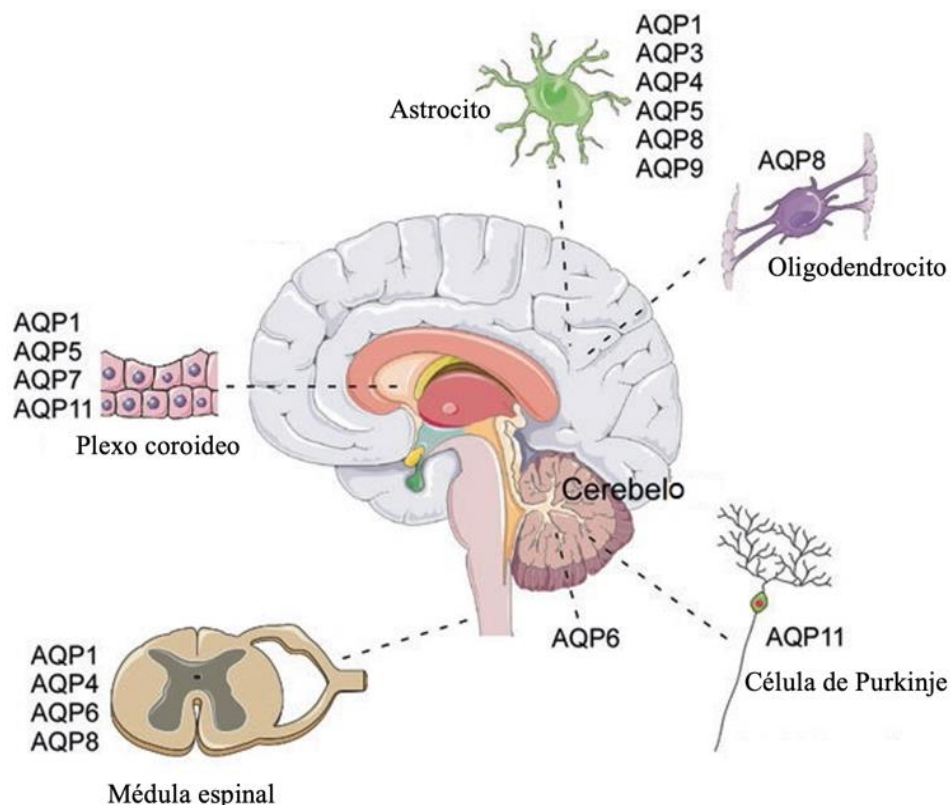


Figura 12. Distribución de las AQPs en el sistema nervioso central. Los astrocitos expresan AQP1, AQP3, AQP4, AQP5, AQP8 y AQP9. En el plexo coroideo se expresan AQP1, AQP5, AQP7 y AQP11. En la médula espinal se expresan AQP1, AQP4, AQP6 y AQP8s. AQP6 se expresa en el cerebelo y AQP11 en las células de Purkinje. Los oligodendrocitos expresan AQP8 (Xu et al., 2017).

1.4.4 Acuaporinas en el sistema nervioso periférico

La expresión y función de las AQP_s en el SNP han sido menos estudiadas que en el SNC. Hasta el momento se han descrito tres AQP_s: AQP₁, AQP₂ y AQP₄ tanto en neuronas como en células gliales, y se ha demostrado que participan en procesos fisiológicos y fisiopatológicos (Ma et al., 2012; Gazerani, 2017). Estas tres AQP_s se han asociado con la transmisión del dolor en neuronas del ganglio trigémino y del GRD que median la nocicepción (Gazeri, 2017). En general, la distribución de cada una de estas AQP_s es similar entre especies. La AQP₁ se expresa en las neuronas de los ganglios dorsales, neuronas y células gliales entéricas, terminaciones periodontales de Ruffini, neuronas del ganglio trigémino y neuronas sensoriales vomeronasales (Matsumoto et al., 2004; Ma et al., 2012; Papadopoulos y Verkman, 2013). También se ha reportado AQP₁ en la glía del plexo nervioso pancreático y en la glía entérica del esófago humano (Gao et al., 2006). En el nervio ciático la AQP₁ se ha mencionado en cortes de ratón (Oshio et al., 2006) y de humano (Gao et al., 2006); sin embargo, no se ha descrito su localización en el nervio. La localización precisa de AQP₁ se realizó en 2015 como parte de esta tesis (Segura-Anaya et al., 2015).

El papel fisiológico de las AQP_s en el sistema nervioso se deriva principalmente del uso de ratones deficientes en diferentes isoformas de AQP_s sujetos a diferentes condiciones patológicas, dado que hasta la fecha no existen inhibidores selectivos no-tóxicos para las AQP_s (Papadopoulos y Verkman, 2013). En ratones deficientes en AQP₁ se reduce la sensación de dolor en respuesta a estímulos térmicos y químicos (Oshio et al., 2006; Zhang y Verkman, 2010). El mecanismo molecular exacto que subyace a esta observación se desconoce, pero se ha reportado que en los ratones con un deterioro en la interacción funcional entre AQP₁ y el canal de Na⁺ (Na_v1.8) en las neuronas del GRD se reduce la permeabilidad al agua en las neuronas y la sensación del dolor (Zhang y Verkman, 2010). También se ha especulado la posible contribución de la AQP₁ en la patogénesis de la migraña (Xu et al., 2010), debido a que en estudios en ratones, la aplicación epidural de KCl puede evocar una depresión cortical, asociada con la migraña, que induce el aumento de expresión de AQP₁ en las neuronas del asta dorsal. Además, el silenciamiento del gen AQP₁ en ratones disminuye la fotofobia, que es frecuente en pacientes con migraña (Xu et al., 2010).

Se han estudiado otras posibles funciones de la AQP1 asociadas a otras condiciones patológicas. En modelos de lesión al nervio ciático, la expresión de AQP1 se incrementa en las neuronas pequeñas del GRD y el asta dorsal de la médula espinal (Kaya et al., 2014). En las neuronas del GRD de ratones deficientes en AQP1 se afecta el crecimiento axonal (Zhang y Verkman, 2015). AQP1 también ha sido identificada en cultivos primarios de CS del nervio facial y su expresión aumenta en condiciones de hipoxia (Zhang et al., 2013).

Los trabajos sobre la expresión de AQP2 y AQP4 en el SNP son todavía más limitados. El primer reporte de AQP2 describió la expresión de ésta en haces del nervio periférico (Mobasher et al., 2005). Posteriormente, se identificó que AQP2 muestra alteraciones de expresión entre las neuronas del ganglio trigémino (Borsani et al., 2009), así como un incremento en la expresión de las neuronas del GRD después de la inducción de dolor inflamatorio agudo mediante una lesión del nervio. Por lo tanto, se considera que AQP2 está asociada con la transmisión del dolor, aunque se desconoce el mecanismo que promueve que se modifiquen los patrones de expresión en ambos casos (Buffoli et al., 2009).

En comparación con todo el trabajo sobre la AQP4 en el SNC, se sabe muy poco de la expresión de la AQP4 en el SNP. Se ha identificado a la AQP4 en el plexo mientérico y submucoso de ratas y ratones. Curiosamente las células gliales en el plexo entérico no expresan AQP4 (Thi et al., 2008). Kato y colaboradores (2014) reportaron que AQP4 se localiza en las células gliales satelitales que envuelven a las neuronas sensoriales aferentes tanto en el ganglio trigémino como en los GRD del ratón. También se ha reportado que en ratas que sufren una lesión en el NP que altera la morfología de los astrocitos en la médula espinal se modifican la expresión de AQP4 (Okłinski et al., 2015). Sin embargo, se requieren más estudios para definir la localización celular y función de las AQPs en el SNP.

El trabajo desarrollado en el laboratorio permitió describir la localización de AQP1 en ambas células de Schwann del nervio ciático de la rata, tanto en las CSFM como en células Remak. En las CSFM, AQP1 se expresa en dominios polarizados, principalmente en las ISL con una forma de cono semejante a los dibujos de las ISL hechos por Ramón y Cajal (1928); también se localiza en la región paranodal, sugiriendo que la AQP1 debe jugar un papel muy

importante en el control homeostático de la CSFM. Además de la rata, también se estudió el nervio ciático del ratón y se demostró que la localización de AQP1 en el nervio ciático es diferente entre estos roedores y que además se expresan diferentes isoformas de AQPs entre ellos. También en la rata, algunas isoformas de AQPs presentan cambios de expresión después de una lesión por compresión del nervio ciático.

Cabe mencionar, que casi todos los trabajos publicados en la literatura han utilizado células en cultivo. Sin embargo, la polarización de las CS se pierde cuando las células se ponen en cultivo. Por ello, este proyecto se llevó a cabo utilizando nervios completos, para mantener la polaridad molecular en un sistema *in vivo* sin lesionar y después de una lesión por compresión del nervio ciático.

II. HIPÓTESIS

1. Dada la importancia de las AQPs en la regulación de la homeostasis del agua se sugiere la presencia de varias AQPs en el nervio, en particular que la AQP1 se localice en las células de Schwann del nervio ciático de la rata y del ratón y en los dominios polarizados específicos en la CSFM.
2. Dado que en la fase temprana de la degeneración Walleriana se presenta edema y fragmentación de la mielina, es posible que se presente un aumento en los niveles de expresión y distribución de AQP1.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar la localización de AQP1 en el nervio ciático normal de rata y ratón, así como durante la degeneración Walleriana. Determinar si existe una asociación entre el citoesqueleto de actina y AQP1. Determinar la expresión de las isoformas de AQP (1-9) en el nervio ciático normal de rata y ratón y lesionado de la rata.

3.2 Objetivos particulares

- Determinar la localización de la AQP1 en el nervio ciático de rata y ratón.
- Determinar los niveles de expresión de AQP1 durante la degeneración Walleriana del nervio ciático, de rata y ratón, lesionado por compresión.
- Determinar la localización de actina, con y sin citocalasina D durante la degeneración Walleriana.
- Determinar la localización de AQP1 durante la degeneración Walleriana del nervio ciático de rata lesionado por compresión con y sin citocalasina D.
- Determinar la expresión de las isoformas de AQP 1-9 en el nervio ciático de rata y ratón.
- Determinar el nivel de expresión de las AQPs 1-9 durante la degeneración Walleriana en el nervio ciático de rata.

IV. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

4.1 Animales experimentales

Se emplearon ratas Wistar macho de 200 a 300g y ratones CD1 de 30-45g que fueron proporcionados por el bioterio del Instituto de Fisiología de la UNAM. El manejo de los animales se realizó con base en la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999.

4.2 Extracción de tejidos

El nervio ciático (NC) de rata y ratón fue extraído en condiciones asépticas después de sacrificar al animal mediante el uso de CO₂. Se realiza una incisión en el músculo para exponer el NC y se corta por sus extremos tratando de que sea lo más largo posible, evitando cortar una vena para no derramar sangre en el área. El nervio se coloca en una solución de PBS (2.7 mM KCl, 1.8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, libre de Ca²⁺ y Mg²⁺ pH 7.4) para realizar laminillas que se usan en inmunohistoquímica e inmunofluorescencia o en los buffer correspondientes para la extracción de ARN o proteínas.

4.3 Lesión del nervio ciático

Los animales (ratas y ratones) fueron anestesiados vía intraperitoneal con ketamina (90mg/Kg) y xilacina (10mg/Kg). La anestesia fue confirmada por la ausencia de reflejos después de recibir un estímulo en la pata. La cirugía se realizó en condiciones asépticas. Se realizó una pequeña incisión longitudinal de 1 cm en la pierna izquierda de los animales, justo a la altura del NC, con una pinza se separaron la fascia subcutánea y muscular para exponer el nervio y liberarlo de tejido conectivo. Posteriormente éste fue lesionado por compresión durante 30s con unas pinzas #7 (Dumont, Suiza), el músculo fue suturado con catgut crómico y la piel con nylon (Atramat). Los animales permanecieron en condiciones controladas de luz y oscuridad para facilitar su recuperación. Fueron sacrificados a las 12 h, y 1, 3, 5, 7, 9, 14, 21 o 30 días después de la lesión, para obtener la porción distal del nervio y extraer proteínas, ARN o realizar extensiones de las fibras nerviosas. El NC sin lesionar fue empleado como control positivo en los experimentos.

4.4 Citocalasina D

Las ratas fueron anestesiadas como en la sección 4.3 y una vez que el nervio estaba expuesto se liberó del tejido conectivo que lo adhiere al músculo con ayuda de unas tijeras para facilitar la incorporación de un pedazo de esponja hemostática (7mm, Haemostat Vet). La esponja seca se introdujo cuidadosamente rodeando una porción del nervio y posteriormente se adicionaron, sobre el nervio y la esponja, 150 µl de citocalasina D (CD, 200 µM diluidos en DMSO; Sigma C8273) o únicamente DMSO (control). La esponja completamente húmeda, se enrolla para que el nervio tenga contacto con el reactivo. Finalmente el animal fue suturado y se mantuvo bajo condiciones controladas de luz y oscuridad para facilitar su recuperación. Los animales fueron sacrificados a 1, 3, 5 y 7 días posteriores al tratamiento con CD o DMSO para obtener la porción del nervio en contacto con el reactivo y así realizar extensiones de las fibras nerviosas.

4.5 Inmunohistoquímica

El NC de rata y ratón fue desmembrado en portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina con la finalidad de separar las fibras nerviosas. Los nervios desmembrados se dejaron secar (1-3h) y posteriormente se fijaron durante 10 min con metanol (Honeywell) o 15 min con paraformaldehído 4% (PF 4%, Sigma-Aldrich) en buffer de fosfatos (0.1M NaH₂PO₄ y 0.1M Na₂HPO₄, pH 7.4). Se bloquearon/permeabilizaron con leche al 10% en PBS (0.5% Tritón X-100, 0.2% Tween) a 4 °C durante 2-3 h. Posteriormente se colocó el anticuerpo primario conejo anti-AQP1 (1:500, Proteintech group) en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C. Posteriormente el tejido se incubó con el anticuerpo secundario conejo anti-biotina (1:600, Vector) durante una hora, enseguida se colocó el reactivo AB durante 30 min en cámara húmeda para posteriormente revelar el marcaje del anticuerpo con DAB (3,3'-diaminobenzidina, Sigma) durante 5 min. Después de cada incubación se realizaron 3 lavados con PBS por 5 min. Los núcleos se marcaron con Hoechst por 7 min, se lavaron 3 veces con PBS y se montaron con VectaShield (Vector, H-1000).

4.6 Doble inmunofluorescencia

Las fibras nerviosas de animales normales, lesionados por compresión, tratados con CD o DMSO, fueron extraídos para realizar extensiones en portaobjetos cubiertos con poli-L-lisina, estas preparaciones se dejaron secar a temperatura ambiente (1-3h). Posteriormente, las laminillas se fijaron con PF 4% durante 20 min y después con metanol frío por 10 min. A continuación se lavaron 3 veces con PBS y se bloquearon/permeabilizaron con leche al 10% en PBS (0.5% Tritón X-100, 0.2% Tween) a 4 °C durante 1-2h. Enseguida se realizó la incubación con faloidina fluorescente (2.5 µl/100 µl PBS, Invitrogen) o anti-AQP1 (1:500) durante toda la noche. Posteriormente, las fibras se lavaron 3 veces con PBS y únicamente a las laminillas incubadas con anti-AQP1 se les colocó Alexa flúor 488 anti-conejo (1:300, Jackson Research) por 90 min. Posteriormente se colocó el doble marcaje con los anticuerpos: ratón anti-MBP (Proteína básica de mielina, 1:300, Calbiochem), ratón anti-NF200 (Neurofilamento 200, 1:1000, Abcam), ratón anti-GFAP-Cy3 (Proteína ácida fibrilar glial, 1:1000, Sigma-Aldrich), o ratón anti-actina (1:1500, Sigma-Aldrich) durante toda la noche en cámara húmeda. Posteriormente los nervios se marcaron con el anticuerpo secundario Alexa flúor 488 anti-ratón (1:300; Jackson ImmunoResearch) o Alexa flúor 568 anti-ratón (1:300, Invitrogen). Después de lavar con PBS los núcleos se marcaron con Hoechst por 7 min, se lavaron 3 veces con PBS y se montaron con VectaShield (Vector, H-1000) o con VectaShield que contiene DAPI (Vector, H-1200). Los controles negativos se realizaron omitiendo el anticuerpo primario. Finalmente las muestras se observaron en el microscopio de epifluorescencia Olympus BX60.

4.7 Tinción de Plata

El NC se extiende en laminillas libres de poli-L-Lisina y se deja secar entre 1-3h. Posteriormente, las preparaciones se fijaron con PF 4% durante 20 min, enseguida se realizaron tres lavados de 5 min, los dos primeros con PBS y el último con agua ultrapura. Las laminillas se colocaron en una solución precalentada de Nitrato de Plata (AgNO_3 , Fermont) al 10% durante 30 min a 37°C y se lavaron con agua destilada. A la solución de AgNO_3 antes empleada, se le agregaron 6 ml de Hidróxido de amonio concentrado (NH_4OH), esta plata amoniacal se tornó oscura y para aclararla se agregaron gota a gota NH_4OH hasta

que quedó incolora, cuidando de no utilizar más de 10ml de NH_4OH , de lo contrario se formaría un precipitado de AgNO_3 , que resultaría en una pobre impregnación de las fibras nerviosas.

Las laminillas se transfirieron a la solución de plata amoniaca, ya incolora, durante 15 min a 37°C y se colocaron en una solución de NH_4OH al 1% durante 3 min. A la solución de plata amoniaca se agregaron 25 gotas de solución reveladora de Bielschowsky (4ml PF 10%, $40\mu\text{l}$ ácido nítrico concentrado y 0.1g ácido cítrico en 20ml agua destilada) en agitación constante durante 1-3 min. Posteriormente las laminillas se colocaron en NH_4OH al 1% durante 3 min para detener la reacción de plata y se transfirieron a una solución de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) al 5% durante 5 min. Para eliminar el exceso de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ las laminillas fueron lavadas tres veces con agua destilada durante 5 min. Finalmente, las fibras se tiñeron con una solución de Tionina al 0.05% durante 20 min, para marcar los núcleos celulares. Las laminillas se deshidrataron mediante lavados consecutivos de etanol en concentraciones crecientes (60%, 70%, 80%, 100%), en Xilol-Alcohol (50:50) y Xilol absoluto durante 1 min en cada uno y se montaron con Permount (Fisher Chemical) para su observación en el microscopio óptico Olympus BX60. También es posible marcar los núcleos con VectaShield que contiene DAPI (Vector, H-1200).

4.8 Doble inmunofluorescencia con tinción de Plata

Para realizar el marcaje de doble inmunofluorescencia con la tinción de plata, las fibras nerviosas se extendieron en laminillas sin poli-L-Lisina y se dejaron secar entre 1-3h. Posteriormente, éstas se fijaron con metanol durante 15 min previo a la incubación con el anticuerpo conejo anti-AQP1 (1:500) o ratón anti-MBP (1:300) y fueron teñidas con Alexa-flúor 488 (1:300) como en la sección 4.6. Algunas laminillas fueron doblemente marcadas con ratón anti-GFAP-Cy3 (1:1000), y conejo anti-MBP (1:300, Abcam) y marcadas con Alexa flúor 568. Los anticuerpos se incubaron toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Después se realizó la tinción de Bielschowsky siguiendo los pasos de la sección 4.7, comenzando con la fijación de las muestras en PF 4% seguida de los pasos para la impregnación de AgNO_3 . Los núcleos se marcaron con VectaShield que contiene DAPI

(Vector, H-1200). Los controles negativos se realizaron omitiendo el anticuerpo primario. Las muestras fueron analizadas en el microscopio de epifluorescencia Olympus BX60.

4.9 Toma de fotografías y análisis de imágenes

Para tomar las fotografías de los campos observados en el microscopio óptico de epifluorescencia se utilizó una cámara *Jenoptik Progres Gryphax* y las imágenes se analizaron con los programas Jenoptik e Image J. Para los Western Blots se empleó una cámara Kodak DC290 ZOOM y las imágenes se analizaron con el programa Kodak 1D versión 3.5. El análisis estadístico se realizó a través del lenguaje de programación R (Versión 4.1.0) y R Studio-1.4.1717. Se realizó ANOVA de una vía y la prueba de Tukey para hacer comparaciones múltiples entre grupos.

4.10 Extracción de ARN

El ARN del nervio ciático de rata y ratón se extrajo utilizando el reactivo TRIZOL (Ambion). Se colocaron de 50-100 µg de tejido fresco en 1 ml de TRIZOL y se homogenizó perfectamente, éste se centrifugó a 12,000 g por 10 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Enseguida se adicionaron 0.2ml de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se agitó vigorosamente de forma manual durante 15 seg, se incubó de 15-30°C por 3 min y se centrifugó a 12,000 g por 15min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa, donde se encuentra el ARN, y se agregaron 0.5ml de alcohol isopropílico para precipitar el ARN, se incubó de 15-30°C por 10min y se centrifugó a 12,000g por 10 min a 4°C. Después de remover el sobrenadante se agregaron 300 µl de LiCl 4M, se incubó a 4°C durante 15 min y se centrifugó a 12,000g 10 min. Nuevamente se eliminó el sobrenadante y se adiciona 1ml de alcohol etílico al 75% y al 100%, después de cada alcohol se centrifugó a 7,500 g por 5 min a 4°C. Se decantó el sobrenadante y el ARN se dejó secar 10 min a temperatura ambiente. El precipitado se disolvió en 40 µl de agua ultrapura libre de RNasas. La concentración de ARN de cada muestra se determinó por espectrofotometría a 750 nm. El ARN se almacenó a -70°C hasta su uso. El ARN de diferentes tejidos: cerebro, hígado y riñón (tejidos control) fue extraído utilizando el kit Quick-RNA MiniPrep (Zymo Research) siguiendo las especificaciones del fabricante.

4.11 Diseño de *primers*

Se diseñaron pares de oligonucleótidos o “*primers*” de rata y ratón para efectuar la amplificación de AQP1, AQP2, AQP3, AQP4, AQP5, AQP6, AQP7, AQP8 y AQP9 en el NC así como en los tejidos control (cerebro, hígado y riñón) de cada especie. Los *primers* se diseñaron con el programa Vector NTI advance™ a partir de la secuencia de ARNm 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. Las secuencias amplificadas tenían una longitud promedio de 200-500 pb. Además, se evitaron aquellos *primers* que formaran dímeros o estructuras secundarias con valores de energía libre menor a -2.0 Kcal/mol y 1.0 Kcal/mol respectivamente (Tabla I). Finalmente, se probó la especificidad de cada *primer* 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.

Tabla I. Pares de *primers* diseñados para la amplificación por RT-PCR de las AQP_s (1-9) y β -actina.

Rata RNAm	Primer sentido (5'-3')	Primer antisentido (5'-3')	Longitud amplicón (pb)
AQP1	TCTGAGCATCGCTACTCTGG	AGAGCCACAGACAAGCCAA	363
AQP2	CTGGGCCACCTCCTTGGGATC	CCACCAGGGGTCCGATCCA	124
AQP3	CACTTGAACCCTGCTGTGACCT	GCTGCTGTGCCTATGAACTGATC	269
AQP4	TTGGACCAATCATAGGCGC	GGTCAATGTCGATCACATGC	213
AQP5	CTCTCACTGGGTCTTCTGGGTA	GGGTGCTTCAAACCTTTCGTCTTCC	271
AQP6	CTGCGGTCATTGTTGGGAAGT	CTGTGTCCTCTGAGTTCGTCTGTG	219
AQP7	CCTTGGTCCGTGGCTCATAT	TTGTCCGTGATGGCGAAGATAC	423
AQP8	GAGCAGACGCCGATGTGTAGTAT	CCAGACGCATTCCAGAACCTT	422
AQP9	CCTGTTCTCTCGGACTCAACTCT	TTCTGCCTTCACTTCTGGGTCTG	230
Ratón RNAm	Primer sentido (5'-3')	Primer antisentido (5'-3')	Longitud amplicón (pb)
AQP1	GACACCTGCTGGCGATTGACTAA	CCTCCTCTATTTGGGCTTCATCTC	281
AQP2	GCCCAGAGGAAGAGAGAAGAGA	GTGCCAATGCCCAGACCAAA	255
AQP3	CACTTGAACCCTGCTGTGACCT	GCTGCTGTGCCTATGAACTGATC	269
AQP4	TCTCCATACTGCTTTGCCTTCC	GGTCCATTATCTCGCTGCCACA	282
AQP5	GCAACAACACAACACCAGGCAG	GTACCCAGAAGACCCAGTCAGA	258
AQP6	CTTAACGGCAAGAGCACAGGGA	GAGACCTTTTGGAAAGAGCGACCT	262
AQP7	ATAAAGCACACCACCTATCAGCG	CAGAAAAGAGCCCAGAATCACT	229
AQP8	GAGCAGACGCCGATGTGTAGTAT	CCAGACGCATTCCAGAACCTT	416
AQP9	CCTGTTCTCTCGGACTCAACTCT	TTCTGCCTTCACTTCTGGGTCTG	230
RNAm	Primer sentido (5'-3')	Primer antisentido (5'-3')	Longitud amplicón (pb)
β -actina	AACACCCCAGCCATGTACG	ATGTCACGCACGATTTCCC	254

4.12 Amplificación por PCR

El ARN obtenido del NC y de los tejidos control para cada AQP de rata y ratón se emplearon para realizar los ensayos de RT-PCR. Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador 2720 (Applied Biosystem). Para realizar la conversión de ARN a ADN complementario (cDNA) se utilizaron 500 ng de ARN de rata y 400 ng de ARN del ratón en 20 μ l de volumen de reacción. Primero, el templado se calentó junto con 1 μ l de Random *primers* (50 pmol) y agua ultrapura a 94°C por 5 min para eliminar estructuras secundarias. Posteriormente se adicionaron 7.6 μ l de la mezcla de reacción, la cual contiene 4 μ l de 5X buffer M-MLV, 2 μ l de ditiotreitól 0.1M (DTT), 180U de transcriptasa reversa (M-MLV *Reverse Transcriptase*, Promega) y 0.7 μ l de dNTPs 10mM (Promega), la mezcla se incubó a tres temperaturas,

primero a 25°C por 10 min, después a 42°C durante 60 min y finalmente a 70°C por 15 min. Posteriormente el cDNA se incubó con 0.8U RNasa H (Ribonucleasa H, Promega) a 37°C por 20 min para degradar las cadenas híbridas.

Para realizar la amplificación de las AQPs 1-9 en muestras de rata y ratón se emplearon 5µl de templado, excepto la AQP1 en la rata que amplifica con 2µl. Se empleó 1.25U de GoTaq DNA polimerasa (Promega), 2mM MgCl₂, 0.2mM de cada dNTP y 0.1 µM de cada oligo en 50µl de volumen de reacción. La amplificación de todas las secuencias se realizó con el mismo programa: desnaturalización inicial de 94°C, 35 ciclos de desnaturalización (94°C por 30s), alineamiento (56°C por 1 min), extensión (72°C por 1 min) y extensión final (72°C por 7 min). Los productos amplificados se analizaron en geles de agarosa al 2% teñidos con 0.5 µg/ml de EtBr (100V y 450mA). 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.

4.13 Extracción de Proteínas

Se extrajeron proteínas totales de diferentes tejidos: riñón, cerebro y nervio ciático (animales normales y lesionados). 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 µg/ml) y PMSF (100 µM). Los tejidos fueron macerados 20 veces, el homogenado se transfirió a un tubo de 1.5 ml y se hirvieron durante 5 min, se centrifugaron a 10,000 rpm (9,600g), 10 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante. Las proteínas se almacenaron a -70°C hasta su uso.

4.14 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo con el kit BCA (Thermo Scientific). Se realizó una curva estándar de albúmina en el rango de 125 a 2000 µg/ml. Se tomaron 10 µl de cada concentración, así como de cada una de las muestras y se agregaron 200 µl del reactivo de trabajo (50:1, Reactivo A:B) y se dejó incubar a 37°C por 30 min. Se midió la absorbancia a

562 nm en un espectrofotómetro (Eppendorf Biophotometer) para obtener la concentración de las proteínas.

4.15 Electroforesis en gel de poliacrilamida

La electroforesis se realizó en geles discontinuos de poliacrilamida formados por un gel separador al 10% (10% acrilamida, 0.375 M Tris pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% AMPS y 0.04% TEMED) y un gel compactador al 4% (4% acrilamida, 0.126 M Tris pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% AMPS 0.01% TEMED). Las muestras son colocadas con 7.5 μ l de buffer de carga (0.125M Tris, 4% SDS, Glicerol, 10% mercaptoetanol). Se emplearon 25 μ g de proteínas de nervio ciático de rata o ratón, 1 y 3 μ g de proteínas de riñón de rata y ratón respectivamente. La electroforesis se realizó a 40 mA durante 90 min empleado un buffer de corrida que contiene: 0.025M Tris, 0.192M Glicina, 0.1% SDS, pH 8.5-8.7.

4.16 Western Blot

Las proteínas fueron transferidas electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL (Amersham Biosciences) utilizando el equipo ECL Semi-Dry Transfer Unit (Amersham Biosciences) aplicando 30V durante 60 min. Para asegurar la eficacia de la transferencia, se tiñó la membrana por 3 min con Rojo Ponceau S al 0.1 % en ácido tricloro y el gel con azul de Coomassie (0.06% azul de Coomassie R-250, 30% metanol y 10% ácido acético). 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) al menos 1h, se hicieron 3 lavados con TBST se colocó el anticuerpo primario conejo anti-AQP1 (1:3000) en TBST durante toda la noche. Después se incubó con biotina anti-conejo (1:3000, Vector) en TBST durante 90 min y posteriormente con el reactivo AB (Vectastain ABC kit, Vector), durante 30-45 min. Entre cada incubación se realizaron 3 lavados con TBST por 5 min. Para revelar la membrana, ésta se extendió entre dos acetatos y se le colocó el reactivo de Amersham ECL (GE Healthcare) durante 1 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. Se retira la película y se sumerge en el revelador “Kodak GBX Developer and

replenisher” durante 1 min, se lava con agua 1 min, enseguida se sumerge con fijador 1 min y finalmente con agua. Todo el procedimiento de revelado se realizó en un cuarto oscuro. Finalmente la membrana fue reutilizada para emplear el control de carga. Ésta se lavó tres veces con TBST para eliminar los residuos del reactivo ECL, se bloqueó nuevamente con leche-TBST durante 1h y se incubó con el anticuerpo primario ratón anti-actina (1:8000, Millipore) y biotina anti-ratón (1:3000) para normalización.

V. RESULTADOS

5.1 Expresión de AQP1 en el NC

La expresión de AQP1, AQP2, AQP4, AQP9 se determinó por RT-PCR. En esa lista se incluyen las tres principales AQPs estudiadas del SNC (AQP1, AQP4 y AQP9); se midió también la expresión de la AQP2, ya que se ha reportado con una localización extra-renal que incluye tanto el SNC como en SNP (Mobasheri et al., 2015). Los resultados muestran la expresión del ARNm de AQP1 en el nervio ciático de la rata, pero no de AQP2, AQP4 y AQP9 (Figura 13A). El análisis de la proteína mediante inmunoblot con anti-AQP1 en el nervio ciático y el riñón (tejido control) muestra la presencia de una banda de 28 kDa en ambos tejidos (Figura 13B). Se observa que al igual que con el ARNm, a nivel de proteína AQP1, también se expresa en el nervio ciático.

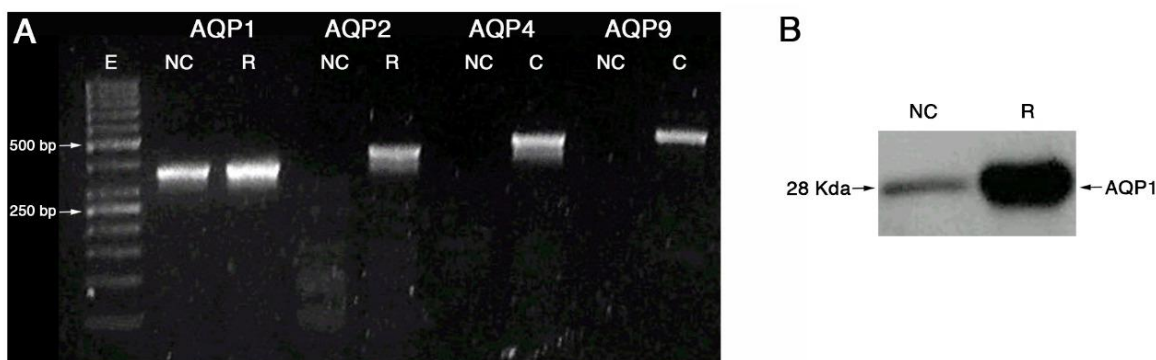


Figura 13. Expresión de AQP1 en el nervio ciático de la rata. (A) RT-PCR de AQP1, AQP2, AQP4, AQP9 en el nervio ciático (NC); el riñón (R) y el cerebro (C) son los tejidos control. Los fragmentos de cada AQP fueron analizados en geles de agarosa al 2% con una escalera de 50 pb (E). (B) Inmunoblot de AQP1 en nervio ciático y riñón de la rata. Anti-AQP1 reconoce una banda de ~28 kDa.

5.2 Localización de AQP1 en el nervio ciático de la rata

La localización de la AQP1 en el NC de la rata se analizó mediante la técnica de inmunofluorescencia; con el fin de determinar el tipo de célula de Schwann en el que se expresa AQP1, se emplearon anticuerpos contra MBP y GFAP que marcan a las CSFM y a las células Remak respectivamente. Los resultados muestran que AQP1 co-distribuye con el marcaje de GFAP en las células Remak (Figura 14 A-C). También AQP1 co-distribuye con

MBP en las CSFM y se localiza en región de mielina no compacta que incluye las ISL y la región nodal (Figura 14 D-F).

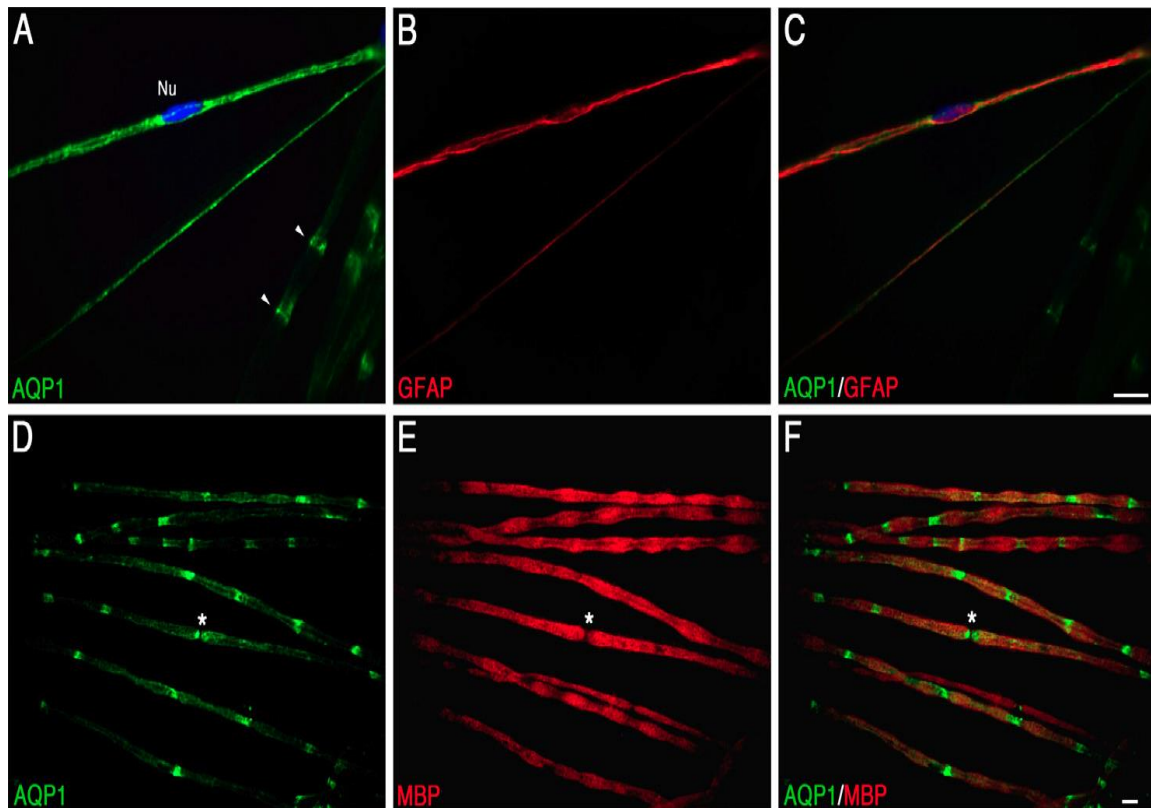


Figura 14. AQP1 se localiza tanto en las células Remak como en las CSFM en el nervio ciático de la rata. Las fibras nerviosas del nervio ciático muestran que AQP1 tiene un fuerte marcaje en las células Remak (A) que fueron marcadas con anti-GFAP (B) y co-distribuye con AQP1 (C). El núcleo de la célula (Nu) está teñido con Hoechst. AQP1 también se localiza en las incisuras de Schmidt-Lanterman (puntas de flecha) de las CSFM (A). La doble inmunofluorescencia de anti-AQP1 (D) con anti-MBP (E) muestra que AQP1 se localiza en los internodos de las CSFM (F) tanto en las incisuras de Schmidt-Lanterman como en los nodos de Ranvier (*) Barra= 50 μ m.

Al realizar el inmunomarcaje de las fibras contra AQP1 se observa su amplia distribución en las ISL a largo del internodo (Figura 15A). Estas regiones de citoplasma que interrumpen la mielina compacta, tienen forma de cono que puede identificarse en preparaciones reveladas con DAB (Figura 15B) o con marcadores fluorescentes (Figura 15C). Las ISL que se caracterizan por la presencia de actina, entre otras proteínas, fueron marcadas con anti-actina

y anti-AQP1 lo que corrobora que AQP1 tiene una distribución en las ISL ya que ambos marcadores co-distribuyen (Figura 15 D-F). La reconstrucción de un internodo teñido contra AQP1, revelado con DAB, muestra la intensa presencia de AQP1 en las ISL, la región nodal (Figura 15G) y la membrana abaxonal, aunque en esta última el marcaje es más tenue. El internodo de la Figura 15G muestra 17 ISL marcadas con AQP1 cuya distribución es asimétrica y no es equidistante. Si dividimos el internodo en 4 regiones de la misma longitud, R1, R2, R3 y R4 resulta que el número de ISL marcadas con AQP1 es: R1=4, R2=5, R3=6 y R4=2. Es decir que con respecto al número de ISL la región $R3 > R2 > R1 > R4$ donde R3 es la región con mayor número de ISL y R4 es la región con menos cantidad. Este resultado es consistente con el reportado por Reynolds y Heath (1995) en el nervio tibial, lo que muestra que existe un patrón en la distribución de las ISL a lo largo del internodo en ambos nervios.

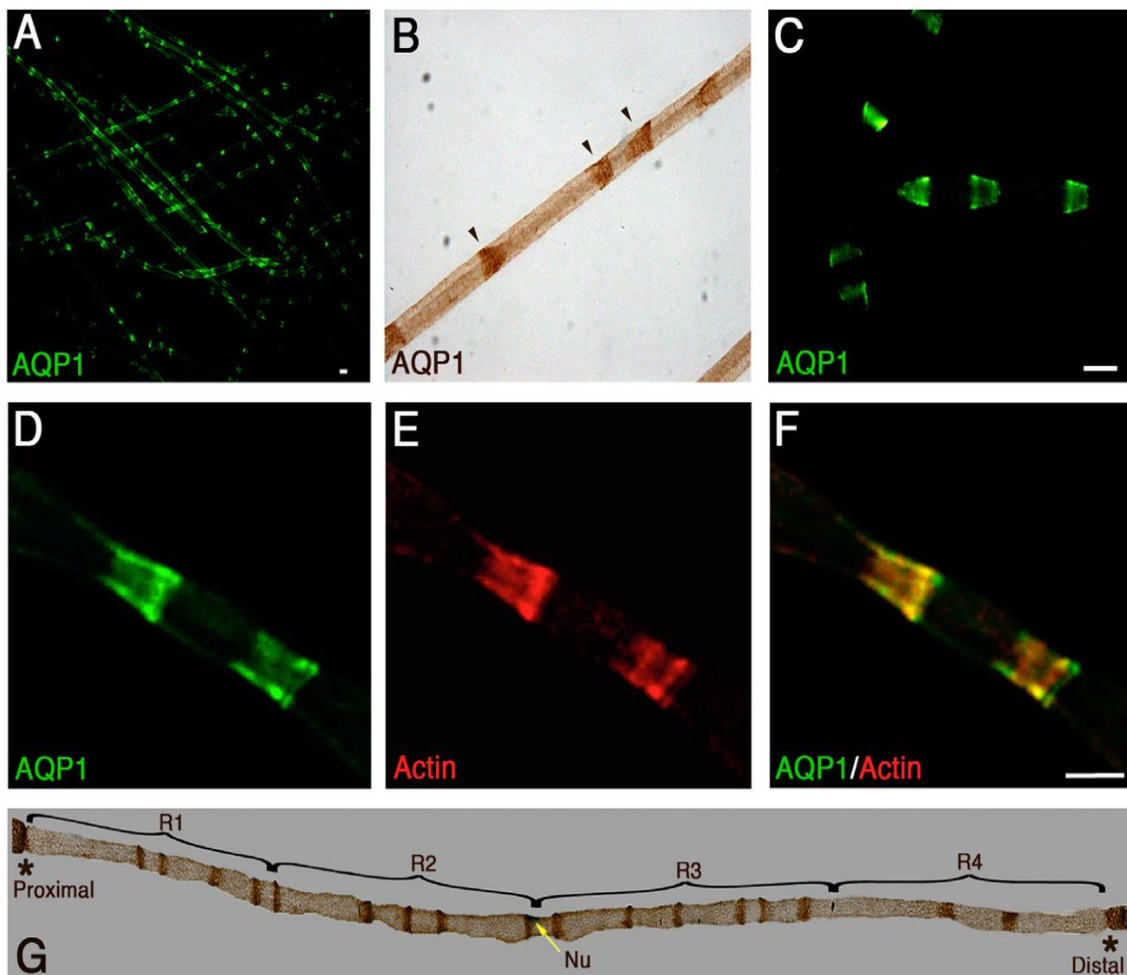


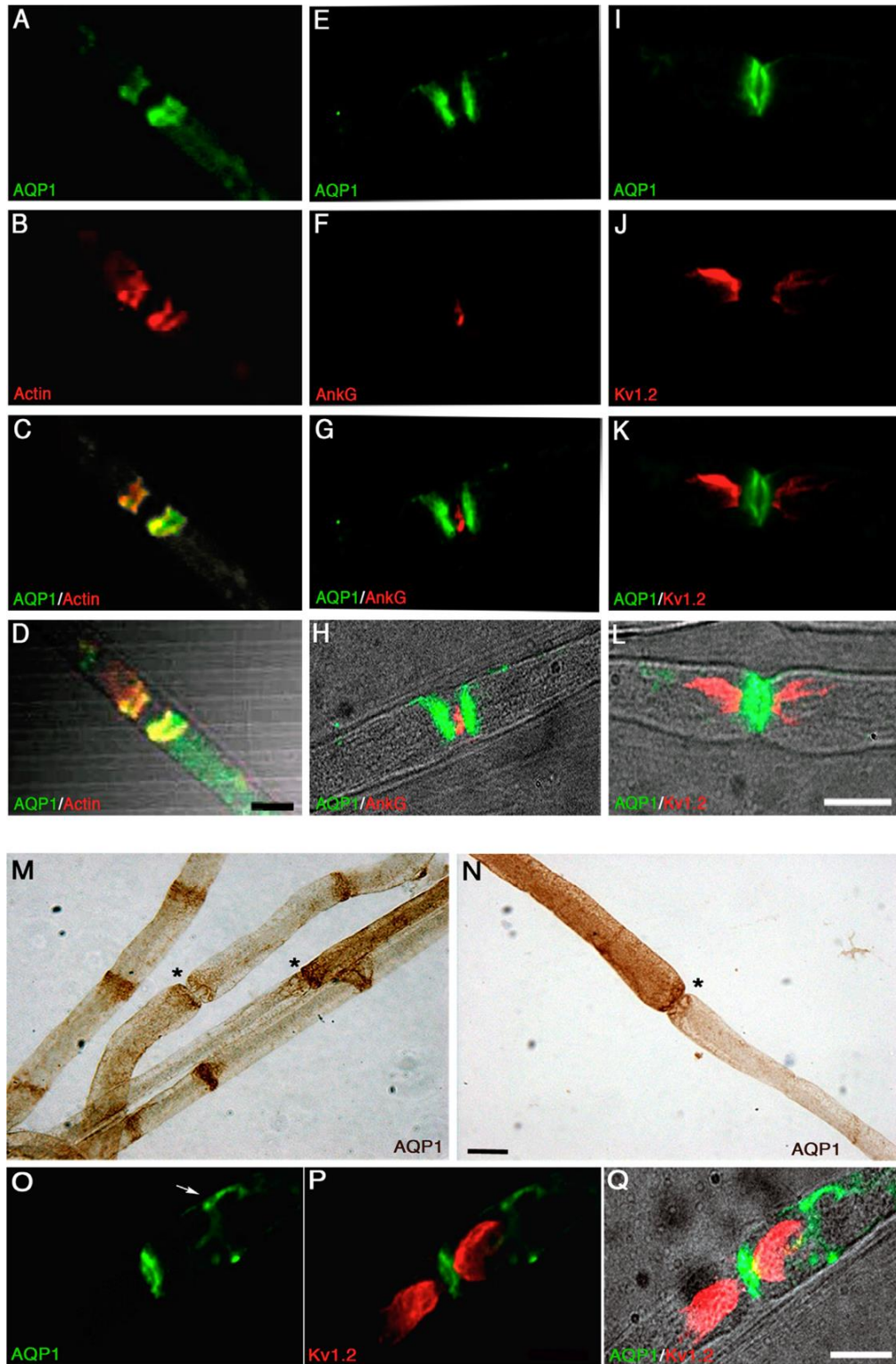
Figura 15. AQP1 se localiza en las incisuras de Schmidt-Lanterman. AQP1 está presente en las incisuras de Schmidt-Lanterman a lo largo del internodo de las CSFM a menor aumento (A) y a mayor aumento teñido con DAB (B) y fluorescencia (C). La doble inmunofluorescencia de anti-AQP1 (D) con anti-actina (E) muestra que ambos marcadores co-distribuyen en las ISL (F). Fotomontaje de un internodo (G) marcado con anti-AQP1 revelado con DAB dividido en cuatro regiones (R1-R4) de la misma longitud, una de las incisuras está asociada con el núcleo (Nu) de la célula teñido con Hoechst. Nodo de Ranvier (*). Barra= 15 μ m (A-C) y 10 μ m (D-F).

Los resultados obtenidos con el inmunomarcaje de AQP1 en las fibras nerviosas también mostraron que AQP1 marca intensamente la región nodal. Para precisar la localización de AQP1 en el nodo se determinó, mediante dobles inmunofluorescencias, la región de los nodos de Ranvier (nodal, paranodal o juxtapanodal) en la que se expresa la AQP1 (Figura 16). Se observó que AQP1 co-distribuye con actina en la región paranodal (Figura 16 A-D), pero no así con ankirina G (Ank G), proteína que se localiza en la región nodal (Figura 16 E-H) y actúa como adaptador entre las proteínas de membrana y elementos del citoesqueleto como la actina y los microtúbulos (Bennett y Lambert, 1999). Tampoco co-distribuye con los canales de potasio activados por voltaje Kv1.2 que se encuentran en la región juxtapanodal (Figura 16 I-L). Estos resultados muestran que AQP1 se localiza en la región paranodal, la cual tiene una forma circular a cada lado del nodo de Ranvier.

En todas las preparaciones analizadas es posible apreciar diferencias en la intensidad del marcaje de AQP1 entre los internodos. En algunos casos, AQP1 está muy presente en el internodo, en el que las ISL, los paranodos y la membrana abaxonal están intensamente marcados (Figura 16M, N). Sin embargo, la mayoría de los internodos muestra un fuerte marcaje en las ISL y el paranodo, pero poco marcaje en la membrana abaxonal. También se observó que el marcaje de los internodos muestra un patrón de alternancia, ya que cuando un internodo se marca intensamente con AQP1, el siguiente presenta el marcaje solo en las ISL y los paranodos (Figura 16M, N) y el patrón se repite en los siguientes internodos. Asimismo, en varios nodos se observó una asimetría en el marcaje de AQP1 entre las dos tinciones paranodales siendo un lado más fuerte que el otro (Figura 16A, E, M). En muy pocas ocasiones el marcaje de AQP1 fue positivo sólo en un paranodo (Figura 16 O-Q). Además en algunos internodos, la tinción de la membrana abaxonal por fluorescencia es similar a las

bandas de Cajal (Figura 16O). Sin embargo, en todos los internodos resalta el marcaje en las ISL, los paranodos (Figura 16M, N). En conclusión, AQP1 se localiza en ambas células de Schwann. En las CSFM, se encuentra en la mielina no-compacta que corresponde a las ISL y los paranodos. Estos resultados se publicaron en la revista Neuroscience (Segura-Anaya et al., 2015).

Figura 16. AQP1 se localiza en la región paranodal de los nodos de Ranvier. El marcaje de las fibras nerviosas doblemente marcados con anti-AQP1 (A) y anti-actina (B) co-distribuyen en la región paranodal (C y D). Sin embargo, cuando los nervios fueron marcados con anti-AQP1 (E, I) y anti-AnkG (F) o el canal de potasio anti-Kv1.2 (J), AQP1 no co-distribuye ni con anti-AnkG (G-H) en la región nodal ni con anti-Kv1.2 (K y L) en la región juxtapanodal. El marcaje de AQP1 revelado con DAB muestra un marcaje intenso en las ISL, la región paranodal y de la membrana abaxonal en algunos internodos (M y N). En algunos nervios marcados con anti-AQP1 (O) y anti-Kv1.2, AQP1 solo está presente en la región paranodal de un internodo (Q). AQP1 se localiza en la membrana abaxonal de algunos internodos con un patrón similar a las bandas de Cajal (flecha en O). Nodo de Ranvier (*). Barra= 15µm (A-D) y 10µm (E-Q).



5.3 Fibras nerviosas marcadas con la tinción de plata

Dado que el NC es muy complejo, a veces es necesario tener más información sobre el sistema para determinar la localización precisa de las moléculas, sobre todo cuando se lleva a cabo una lesión. Es necesario visualizar el crecimiento de los axones para tener una idea más clara de lo que sucede con ciertos eventos. Por ello, se desarrolló la combinación de la técnica de tinción de plata la cual permite la visualización de los axones mielinizados en campo claro con gran definición, junto con la inmunofluorescencia de diferentes moléculas.

La tinción de plata (SS, *silver stain*), es una técnica muy antigua empleada originalmente por Camilo Golgi y Santiago Ramón y Cajal los cuales fueron galardonados con el Premio Nobel de medicina en 1906 por sus contribuciones sobre neuroanatomía empleando el método de la tinción de plata desarrollado por Golgi o método de Golgi. Este procedimiento histopatológico permitió impregnar una célula nerviosa completa y ayudó a precisar aspectos clave en la comunicación interneuronal. Esta técnica ha sufrido diversas modificaciones a lo largo del tiempo, para obtener resultados reproducibles y sensibles con bajofondo en las preparaciones, como el método de Bielschowsky, Bodian, Gallyas (GAL) y Campbell–Switzer (Uchihara, 2007). Sin embargo, a mediados del siglo XX, estas técnicas argentícas empezaron a caer en desuso a la par del surgimiento de nuevas tecnologías de marcaje celular. En el NP, la tinción argéntica se ha desarrollado sobre fibras embebidas en parafina que afectan la impregnación completa de los axones (Holmes, 1943). La impregnación con plata es caprichosa y de difícil manejo, por lo fácil con que la plata precipita (Freund y Somogyi, 1983; Torres- Fernández, 2006), por lo que esta técnica se fue abandonando con el tiempo, sustituyéndola con nuevas técnicas.

Como parte del proyecto se implementó el método de Bielschowsky (BSSM) sobre el NC. El principio del BSSM se basa en una doble impregnación con soluciones de plata concentradas. La primera impregnación con nitrato de plata (AgNO_3) sensibiliza al tejido para favorecer el depósito selectivo de la plata en algunas estructuras. Posteriormente, en la segunda impregnación se forman los depósitos opacos intracelulares que se depositan de manera selectiva en los axones (reacción negra). Entre ambas impregnaciones se realiza la reducción con formol. Finalmente, la plata ionizada (Ag^+) que se forma por la adición de

hidróxido de amonio a la solución de AgNO_3 , se convierte en plata metálica (Rivas et al., 2014).

Una de las modificaciones que se realizaron a la técnica fue cambiar los cortes de parafina por tejido fresco cuidadosamente separado en haces de axones y fibras individuales del nervio ciático. Al estandarizar el método, para obtener un marcaje óptimo con la tinción de plata en los axones, se observó que cuando se emplea una solución reveladora fresca el marcaje es bueno, y se pueden manejar tiempos de incubación de 7 min. Sin embargo, este debe reducirse a 3 min si la solución se almacena por más de dos semanas para evitar un marcaje intenso y fondo en las preparaciones. En la figura 17 se muestra el resultado de la impregnación de plata sobre el tejido nervioso. Se observa una impregnación uniforme color negro en los axones de las fibras mielinizadas (Figura 17 B-D) que se diferencia con facilidad de las CS que adquieren un color marrón dorado claro (Figura 17A, G). Todavía no está claro por qué existen estas diferencias en la intensidad del marcaje entre el axón y las CS, pero es posible que se relacione con la argirofilia, capacidad de las células para unirse a las sales de plata. También se observa que los núcleos (Nu) de ambas CS presentan un marcaje granular con la tinción (Figura 17D, F). En las CSFM, se puede identificar la región nodal (Figura 17C) que permite apreciar fácilmente la longitud de un internodo (Figura 17J).

La figura 17J es una reconstrucción con 5 fotografías teñidas con el BSSM que muestran una gran sensibilidad por la plata en los axones y un buen marcaje de contraste sobre las fibras mielinizadas, sobre el núcleo de la CSFM y la región nodal. Además, la impregnación de las estructuras tiene la ventaja de mantenerse a través del tiempo para futuras observaciones.

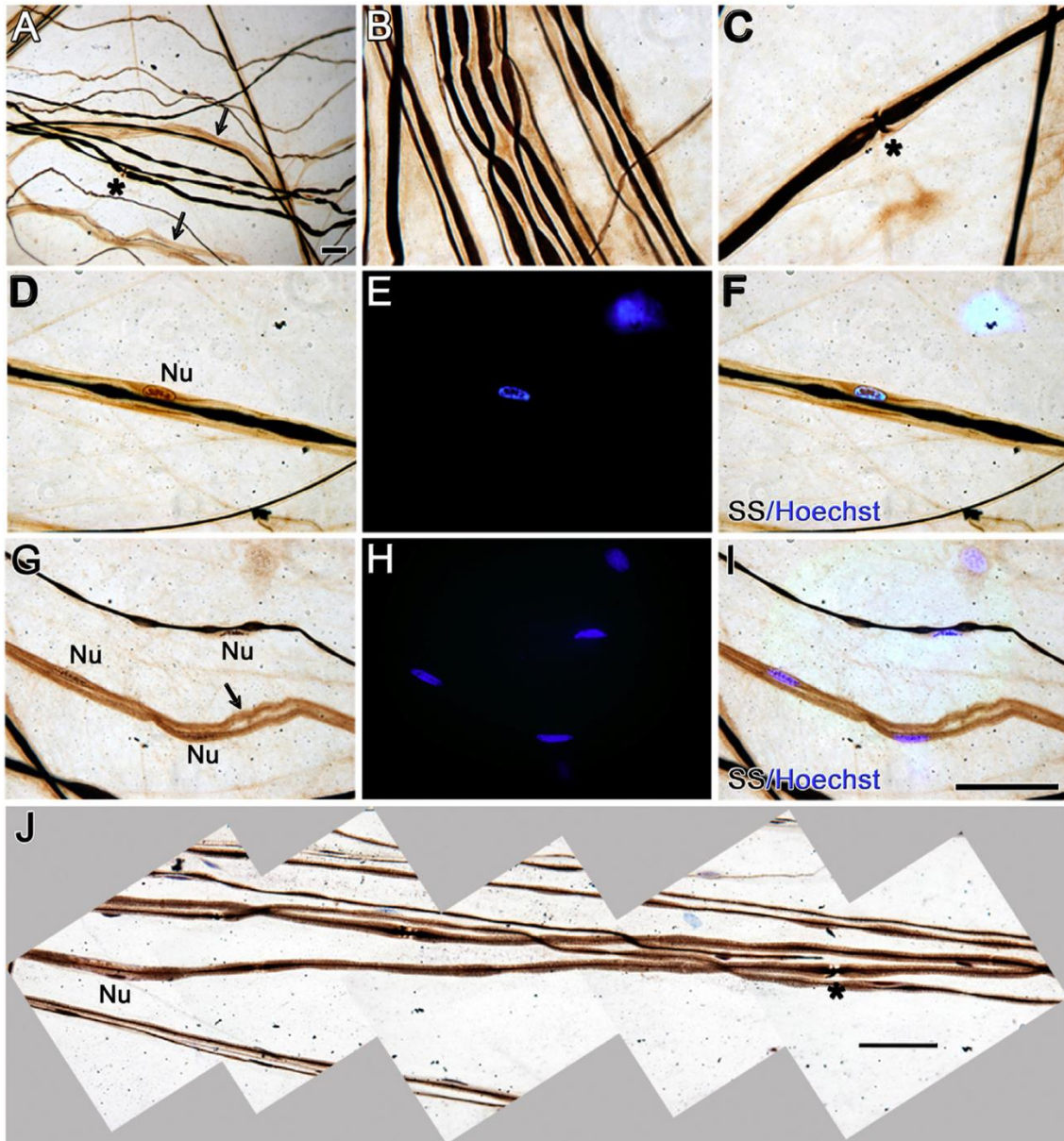


Figura 17. Tinción de plata sobre el nervio ciático. La impregnación con plata (SS) es uniforme en los axones (A-C), permite visualizar el nodo de Ranvier (*) (C). El núcleo (Nu) se observa granular con la impregnación de plata (D, G) las cuales se marcan con Hoechst (E, H) y son visibles en la imagen compuesta (F, I). Las células Remak se tiñen de color marrón claro (flecha larga) (A, G). La reconstrucción de fibras nerviosas marcadas con plata (J) muestran la mitad de un internodo desde el Nu (marcado con Tionina) hasta el nodo de Ranvier (*). Barra= 50 μ m.

Una vez que se estandarizó el método Bielschowsky en el NP se realizaron las pruebas para saber si era posible realizar el marcaje simultáneo con inmunofluorescencia, que sirve para localizar proteínas específicas. Se realizaron extensiones de fibras nerviosas en donde se marcaron las células Remak (anti-GFAP), la vaina de mielina de las CSFM (anti-MBP) y las ISL (anti-AQP1). Las imágenes muestran que es posible combinar el inmunomarcaje con anticuerpos fluorescentes y la contratinción con AgNO_3 para obtener la localización de ciertas moléculas, aun cuando en el inmunomarcaje se utilizan fijadores como 4% PF o metanol. Se puede observar la presencia de GFAP en los nervios teñidos con AgNO_3 (Figura 18 A, C). También la expresión de AQP1 en las ISL, la región paranodal y la membrana abaxonal (Figura 18 D, F) son fáciles de identificar empleando AgNO_3 . Con MBP la mielina se aprecia muy clara en las preparaciones con AgNO_3 (Figura 18 G, I), a pesar de que la mielina se tiñe ligeramente de color marrón claro en algunas preparaciones con AgNO_3 (Figura 18 H).

En este trabajo también se realizaron experimentos con los neurofilamentos presentes en el axón (anti-NF200) y con el canal de potasio dependiente de voltaje (anti-Kv1.2) que marca la región juxtapanodal, así como con el marcador de faloidina fluorescente que reconoce los filamentos de actina (F-actina) presentes en las ISL y la región paranodal. Sin embargo, no se encontraron condiciones favorables para mantener el inmunomarcaje con cada uno de ellos después de la tinción de plata. Aunque se logra obtener un buen marcaje fluorescente, éste se pierde una vez que se lleva a cabo la impregnación de plata. Para la faloidina, posiblemente se debe a que no es un anticuerpo, y el proceso de impregnación de plata hace que se pierda la afinidad de la faloidina por la F-actina. Por lo anterior, se observa que el inmunomarcaje del axón no es compatible con la tinción de plata, y para marcar las ISL y la región paranodal se necesita utilizar un anticuerpo, como anti-AQP1 (Figura 18F) que marca las ISL.

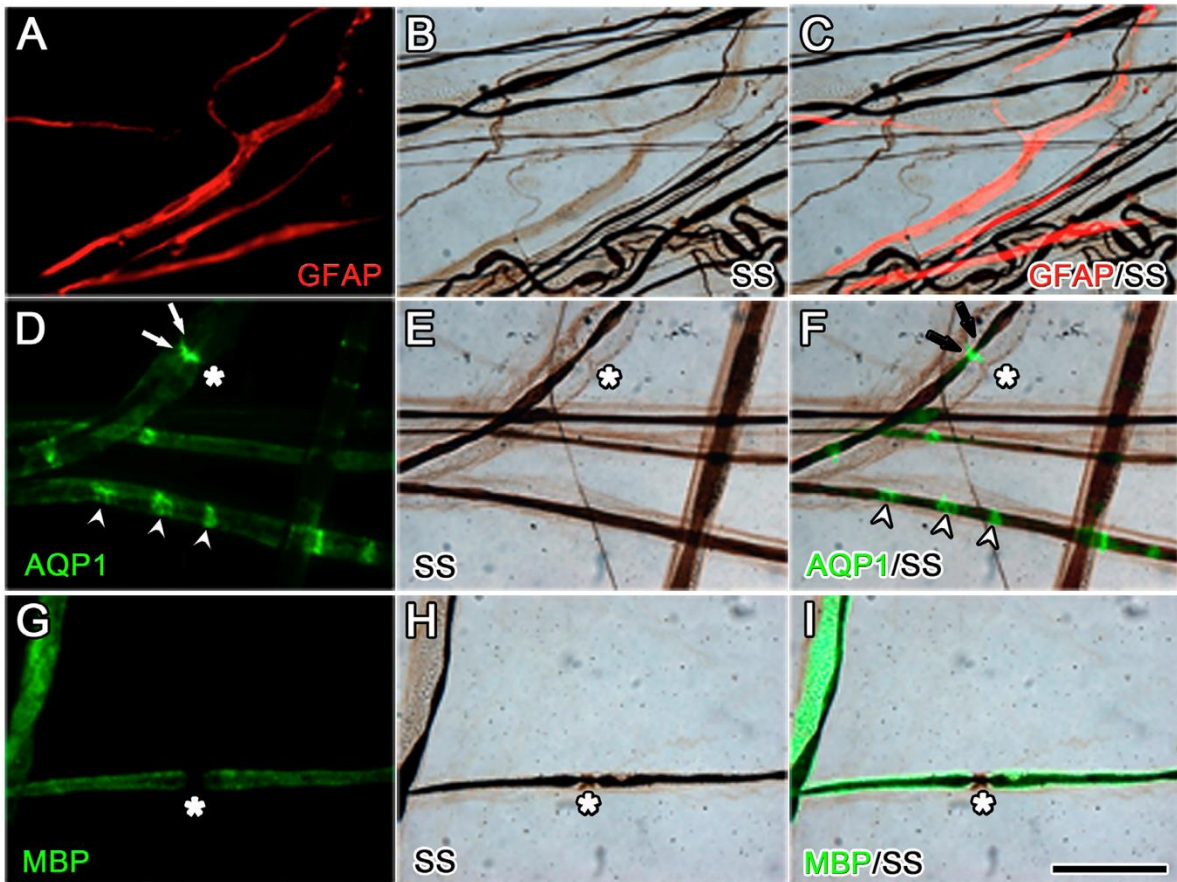


Figura 18. Fibras nerviosas marcadas con inmunofluorescencia y contrateñidas con el método Bielschowsky (BSSM). Las células Remak fueron marcadas con anti-GFAP (A), las ISL (puntas de flecha) y la región paranodal (flechas) con anti-AQP1 (D) y la mielina compacta con anti-MBP (G). La tinción de plata mediante el BSSM se muestra en B, E y H. Las imágenes compuestas muestran la localización específica de cada molécula en el tejido impregnado con plata (C, F, I). Barra= 50 μ m.

También se evaluó la posibilidad de realizar doble inmunomarcaje con la tinción de plata en las fibras nerviosas (Figura 19). Se marcaron primero tanto las CSFM como las células Remak con anti-MBP y anti-GFAP respectivamente seguido de la tinción de AgNO_3 (Figura 19 A-F). Después se realizó el doble inmunomarcaje con anti-AQP1 y anti-GFAP seguida de la tinción de AgNO_3 (Figura 19 G-I). En ambos casos se obtuvieron las condiciones favorables para mantener el marcaje de dos anticuerpos fluorescentes después de finalizar la tinción de plata. En la mayoría de las preparaciones se observó que el marcaje es bueno, aunque en algunas fibras es menos intenso debido a que la transformación química que se

realiza con la impregnación de plata disminuye un poco la señal de los anticuerpos, pero en general permite una visualización clara de cada marcaje.

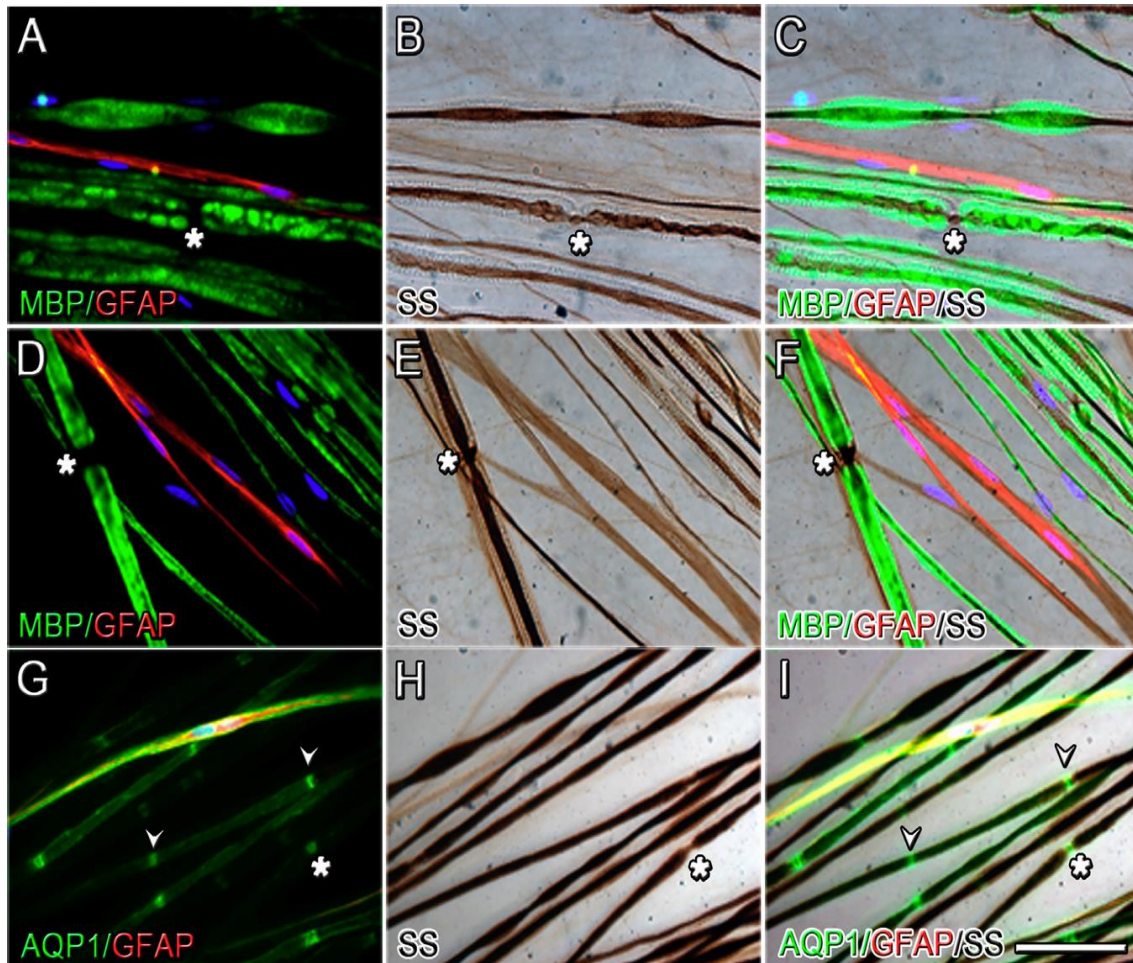


Figura 19. Fibras nerviosas marcadas con doble-inmunofluorescencia y BSSM. Fibras nerviosas fueron marcadas contra anti-MBP, anti-GFAP (A, D) y contrateñidas con plata (SS) (B, E). Las imágenes compuestas (C, F) muestran el marcaje específico de las células Remak (GFAP) y la mielina (MBP) sobre la tinción de plata (SS). También se empleó el doble marcaje contra AQP1, GFAP (G) y el BSSM (H). La imagen compuesta (I), muestra la localización de las ISL (puntas de flecha), la región paranodal en los nodos de Ranvier (*) con AQP1, y las células Remak con GFAP y AQP1 (amarillo) con la impregnación de plata en los axones (SS). El núcleo de la célula fue teñido con Hoechst (azul). Barra= 50 μ m

En conclusión, estos resultados muestran que se puede utilizar la combinación de inmunofluorescencia con el método Bielschowsky o tinción de plata que es un método menos costoso que revela la morfología completa del nervio con una gran definición en campo claro, la cual es una herramienta útil para estudiar con precisión la localización de ciertos dominios celulares que no tengan localización axonal, directamente sobre la tinción de AgNO_3 . Aunque la tinción de plata ha perdido popularidad, observamos que el BSSM promete seguir siendo una herramienta vigente para el estudio del SNP al ofrecer detalles estructurales de las fibras nerviosas dentro de su entorno tisular y posiblemente también en el SNC. Es importante recalcar que, como cualquier procedimiento de histoquímica, el BSSM exige pureza en los reactivos y ejecución exacta del protocolo para obtener resultados reproducibles, además de un manejo responsable de las soluciones.

Esta técnica puede tener un gran valor para el estudio de diferentes enfermedades, por ejemplo, para estudiar los cambios en los dominios moleculares que ocurren en diversas condiciones patológicas, como la degeneración del NP, o con diferentes neuropatías que se presentan en los nervios periféricos. La implementación de esta técnica dio lugar a una segunda publicación (Segura-Anaya et al., 2018).

5.4 Expresión de AQP1 durante la degeneración Walleriana en la rata

La expresión de la AQP1 durante la DW se determinó mediante RT-PCR. El nervio ciático de las ratas fue lesionado por compresión y analizado a las 12h y 1, 3, 5, 7, 9, 14, 21 y 30 días después de la lesión. Los nueve tiempos estudiados corresponden a diferentes eventos que ocurren en el proceso de degeneración: 12h y 1d, cuando inicia la fragmentación y degeneración de los axones; 3d, cuando ocurre la fragmentación de la mielina y se observan restos de axones degenerados; 5 y 7d, cuando las SC se desdiferencian y proliferan, los macrófagos se infiltran al sitio de la lesión, ocurre la eliminación de los restos de la mielina y se observa un mayor crecimiento de axones; 9 y 14d, cuando las CS se organizan en las bandas de Bungner, los axones crecen sobre ellas y hay remielinización; y finalmente, 21 y 30d, cuando los axones conectan con su blanco y el nervio se regenera.

Los resultados muestran que la expresión de AQP1 permanece constante en todos los tiempos estudiados posteriores a la lesión por compresión, sin mostrar diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) al comparar cada punto con el nervio ciático sin lesionar (control) (Figura 20).

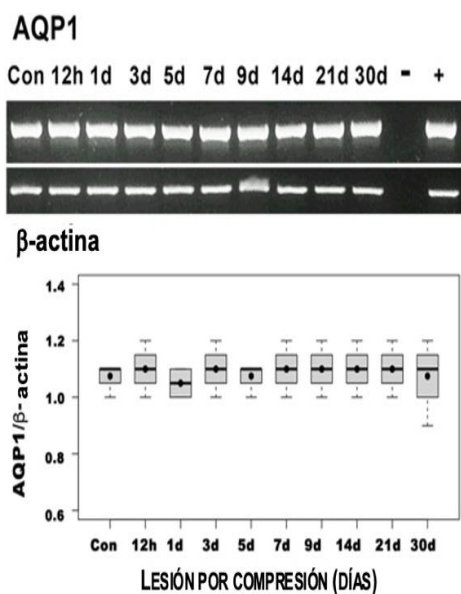


Figura 20. Expresión de AQP1 después de una lesión por compresión en rata. Análisis de la expresión de AQP1 después de 12h, 1, 3, 5, 7, 9, 14, 21 y 30 días posteriores a la lesión mediante RT-PCR. El nervio ciático sin lesionar se empleó como control (Con). El diagrama de caja constituye el rango intercuartílico de los datos, la mediana y la media se representan con una línea sólida y un punto negro respectivamente. Los bigotes (*whiskers*) muestran el punto máximo y mínimo de los datos ($n = 4$). Se observa que no hay cambios temporales en la expresión de AQP1 en todos los tiempos estudiados posteriores a la lesión ($p > 0.05$). La expresión relativa del ARNm de AQP1 fue normalizada con β -actina.

También se realizó el análisis de la expresión de la proteína AQP1 durante la DW en rata, dado que AQP1 se expresa en las ISL y la región nodal y estas regiones tienen gran relevancia en el proceso de degeneración del nervio. Se analizó el patrón de expresión de la proteína en la región distal del nervio ciático lesionado por compresión a las 12h, 1, 3, 5, 7, 9, 14, 21 días posteriores a la lesión mediante *western blot*. Como se mencionó anteriormente el anticuerpo para AQP1 reconoce dos bandas: una fracción de 28 kDa y otra de ~40 kDa. Los resultados muestran que en la rata, la expresión de la proteína AQP1 no presenta cambios significativos durante los tiempos estudiados después de la lesión ($P>0.05$), en ninguna de las dos fracciones ni en la de 28 kDa, ni en la fracción glicosilada de 40 kDa (Figura 21).

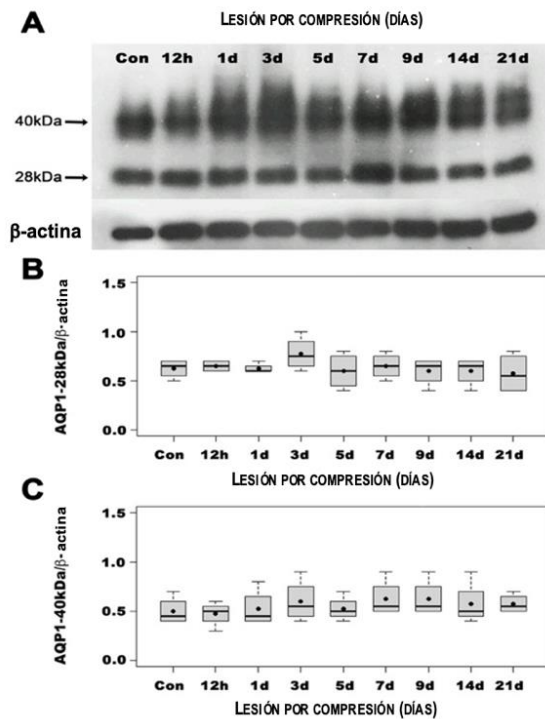


Figura 21. Expresión de la proteína AQP1 durante la degeneración Walleriana en rata. (A) La expresión de AQP1 en el nervio control (Con) y 12h, 1, 3, 5, 7, 9 y 21 días posteriores a la lesión fue analizada mediante Western blot y normalizada con β -Actina. (B) Se representa el diagrama de cajas para la fracción de 28 kDa y (C) la fracción glicosilada de 40 kDa. Cada caja constituye el rango intercuartílico de los datos, la mediana y la media se representan con una línea sólida y un punto negro respectivamente. Los bigotes (whiskers) muestran el punto máximo y mínimo de los datos ($n=4$). No se observan cambios temporales en la expresión de AQP1 de la rata ($p>0.05$) al comparar cada punto con el nervio ciático sin lesionar (control).

5.5 Localización de actina en nervios lesionados y tratados con CD

Para llevar a cabo el estudio sobre la localización de AQP1 durante la DW en los nervios, primero se determinó la localización de actina. Esto con el fin de contar con un marco de referencia respecto a AQP1, ya que la actina se localiza, al igual que la AQP1, en la mielina no compacta, principalmente en las ISL y los paranodos (Trapp et al., 1989), pero su localización durante la DW no ha sido reportada. También para tratar de explorar si existe una posible relación entre el citoesqueleto de actina y AQP1, se llevaron a cabo experimentos colocando primero citocalasina D (CD) en el nervio ciático, la cual inhibe la polimerización de los filamentos de F-actina, y se determinó la localización de actina; después se colocó CD en el nervio ciático y se estudió la localización de AQP1.

Se realizó la localización de actina en los nervios lesionados por compresión mediante inmunofluorescencias contra MBP y el marcador de F-actina (faloidina fluorescente) en fibras nerviosas del nervio control (normal y normal con DMSO), los nervios lesionados por compresión y los tratados con CD después de 1, 3, 5 y 7 días.

En el nervio control, sin lesionar (Figura 22A, B) y en los tratados solo con DMSO, libre de CD (Figura 22C), el marcaje de actina está presente en las células Remak y las ISL con su forma característica de cono.

A 1 día después de la lesión, se observan algunos ensanchamientos en la vaina de mielina, pero no hay cambios en la localización y estructura de actina en la región distal, y ésta se mantiene en las ISL, así como en las células Remak (Figura 22D, E); con CD se observa la formación de ovoides de mielina en algunas fibras y restos de mielina desprendida en la zona (Figura 22F). El marcaje muestra que la actina, paulatinamente, pierde la estructura en forma de cono que la caracteriza en las ISL y se presentan reminiscencias de ésta en algunos fragmentos de mielina (Figura 22F).

A los 3 días después de la lesión se observan ovoides de mielina marcados con anti-MBP (Figura 22G, H), que en la mayoría de los casos están delimitados por las ISL, que

corresponden al punto de quiebre de la vaina de mielina (Ghabriel y Allt, 1979). El marcaje con faloidina muestra que la actina se desensambla y pierde la forma de cono característica, se encuentran restos de la proteína al interior de los fragmentos de mielina y marcaje tenue en el citoplasma de las células de reparación (Figura 22G, H); con CD se observa una franca degeneración en las fibras con la fragmentación de la mielina, la cual se presenta cerca de la región nuclear y permite identificar el aumento del citoplasma de la CS, además se observan residuos de actina claramente desestructurada al interior de la mielina (Figura 22I) y no se observa el marcaje de actina en el citoplasma de las células.

A los 5 y 7 días después de la lesión, se observan fibras degeneradas con algunos ovoides de mielina que mantienen reminiscencias de actina en su interior (Figura 22J, K, M, N); también se observa un citoplasma multinucleado que sugiere que las CS de reparación, fenotipo que adquieren las CS cuando se desdiferencian, están proliferando. En este periodo también se aprecia el marcaje de actina en el citoplasma de las células de reparación (Figura 22J, K, M, N). Dado que el proceso es completamente asincrónico es posible identificar a los 5 y 7 días pequeños internodos remielinizados en la región distal con ISL marcadas con actina (Figura 22J, K, M, N) que muestran un patrón parecido al nervio control. En comparación, después de 5 y 7 días con CD se observa un intenso daño en las fibras nerviosas que revelan la desorganización de la mielina en un mayor número de fibras: hay ovoides de mielina marcados con anti-MBP (Figura 22L, O) y también se observa proliferación de algunos núcleos (Figura 22L), lo que sugiere que ocurre la desdiferenciación de las CS al fenotipo de reparación que expresan el marcador c-jun o ERK (Jessen y Mirsky, 2018). Todavía hay un débil marcaje de actina desensamblada al interior de los ovoides de mielina, sin embargo destaca el marcaje de actina en el citoplasma de algunas fibras, lo que refleja la disminución del efecto de la CD (Figura 22L, O), no se distinguen internodos pequeños que refiera que los axones se estén remielinizando a diferencia de lo que ocurre 7d después de la lesión por compresión (Figura 22N).

Estos resultados sugieren que al inicio de la DW ocurre la remodelación del citoesqueleto de actina en dos pasos. Primero, es necesario la despolimerización de actina para que se lleve a cabo la degeneración del nervio ya que, si se bloquea la polimerización de actina con CD, el

nervio se degenera con si hubiera una lesión, contrario a lo reportado por Jung et al. (2011). Además, la formación de ovoides de mielina ocurre de manera inmediata con la CD. Segundo, se observa marcaje de actina en el citoplasma de las CS de reparación a partir de un día de la lesión, mientras que en nervios tratados con CD el marcaje de actina en el citoplasma se presenta a partir de 5d, cuando posiblemente disminuye el efecto de esta droga sobre las fibras.

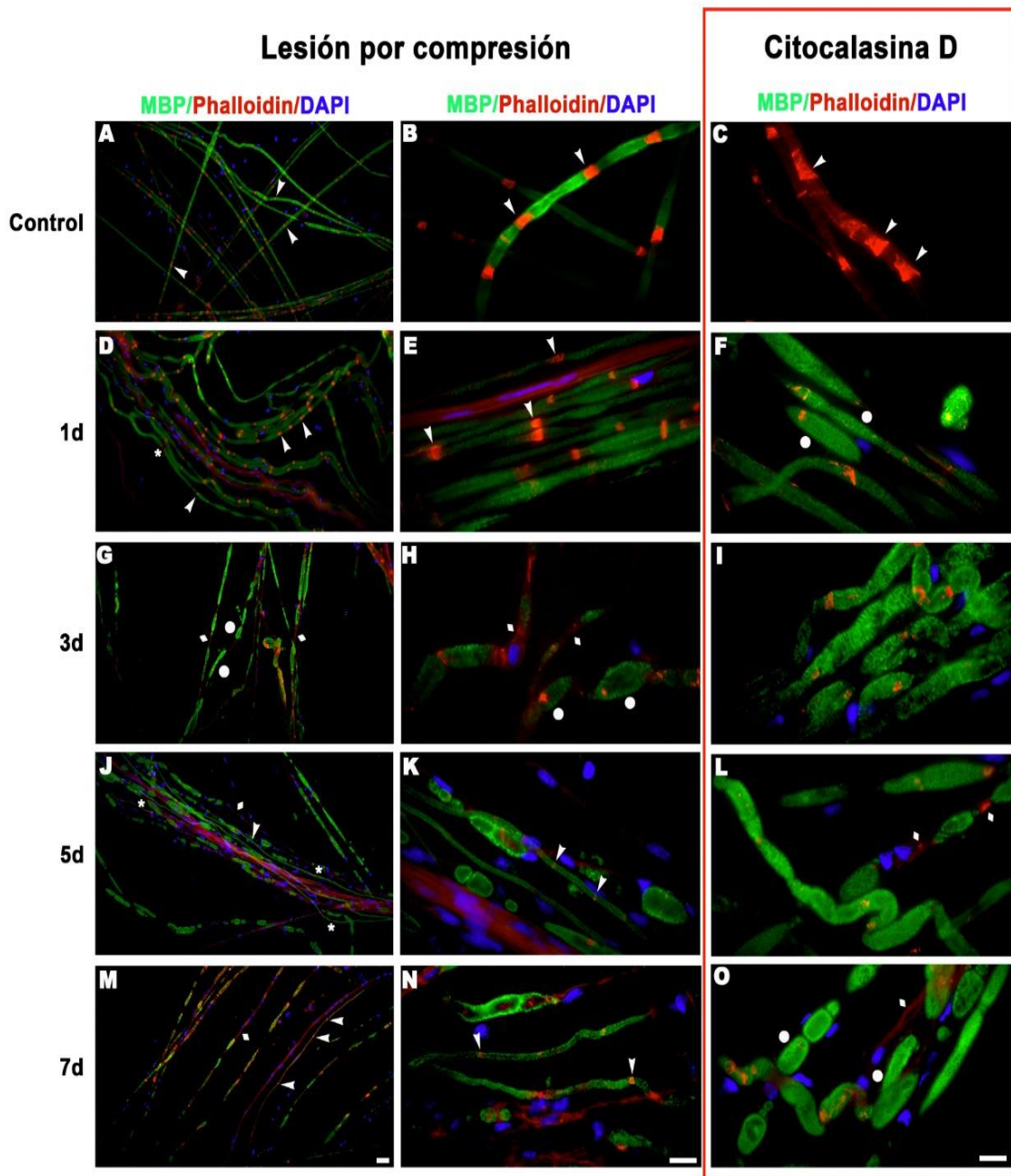


Figura 22. Localización de actina en nervios lesionados y tratados con citocalasina D. Las fibras nerviosas del nervio control (normal y con DMSO), lesionados por compresión y tratados con CD (recuadro rojo) después de 1, 3, 5, y 7 días fueron marcadas con anti-MBP y faloidina. En los controles, faloidina marca las ISL (puntas de flecha) y la región paranodal (A-C). A 1d después de la lesión por compresión se observa el marcaje de actina en las ISL y la región paranodal (*), así como en las células Remak (D, E). A 1d con CD se observan ovoides de mielina marcados con MBP que contienen actina desestructurada marcada con faloidina (F). A partir de 3d (G, H), 5d (J, K) y 7d (M,

N) después de la lesión por compresión se observan ovoides de mielina (círculos) marcados con anti-MBP, con reminiscencias de actina marcada con faloidina que en algunos casos delimita la extensión del ovoide; también se observa un marcaje tenue de actina en el citoplasma de las células de reparación (rombos) y algunos internodos pequeños a 5 y 7d. Después de 3d (I), 5d (L) y 7d (O) con CD se observan ovoides de mielina (círculos); el marcaje de actina en el citoplasma de las células (rombos) se identifica a 5 y 7 d. Los núcleos fueron marcados con Dapi (azul). Barra=15 μ m.

5.6 Fragmentación del axón por la inhibición de la polimerización de F-actina

Se analizó el efecto de la CD a nivel de los axones y se comparó con la lesión por compresión. Las fibras del nervio lesionado por compresión y con CD fueron marcadas con anti-MBP y contrateñidas con la tinción de plata o anti-NF200 después de 1, 3, 5 y 7 días.

En las fibras de tejido control se observa la continuidad de los axones, teñidos con el BSSM, así como las CSFM (Figura 23A, B). A 1 día después de la lesión por compresión se observan ensanchamientos en los axones mielinizados y en algunos casos fibras sin axón (Figura 23C), pero las fibras con CD muestran un proceso de degeneración más avanzado con fragmentos de mielina y de axones (Figura 23D).

A los 3 días después de la lesión por compresión se observan restos de axones al interior de los ovoides de mielina y también la presencia de algunos axones delgados que avanzan sobre periferia de la CS de reparación evadiendo los ovoides (Figura 23E), aunque las fibras con CD también presentan restos de axones al interior de los ovoides (Figura 23F), no se encuentran axones en la periferia de las CS, lo que pone en evidencia el efecto inhibitorio del crecimiento axonal de la CD. A los 3 y 5 días después de la lesión por compresión se observan fragmentos de mielina de diferentes tamaños y axones que avanzan sobre el citoplasma de las CS de reparación evadiendo los ovoides de mielina guiados por la presencia de los núcleos que se alinean formando las bandas de Bungner (Figura 23G, I) y posiblemente por la presencia de actina, como se aprecia en la Figura 23. Después de 5 y 7 días con CD también se observan ovoides y en algunas fibras se localizan algunos axones creciendo (Figura 23H, J), lo que sugiere que el efecto de la CD ha disminuido y permite el ensamble de actina en el citoplasma de las células. Sin embargo, el crecimiento axonal es menor al de una

degeneración normal y hay muy poca evidencia de remielinización a diferencia de lo que ocurre en una lesión por compresión a 7 días (Figura 23I). En conjunto estos resultados muestran que la CD induce la fragmentación del axón e inhibe el crecimiento axonal, como sucede en una lesión por compresión del nervio ciático.

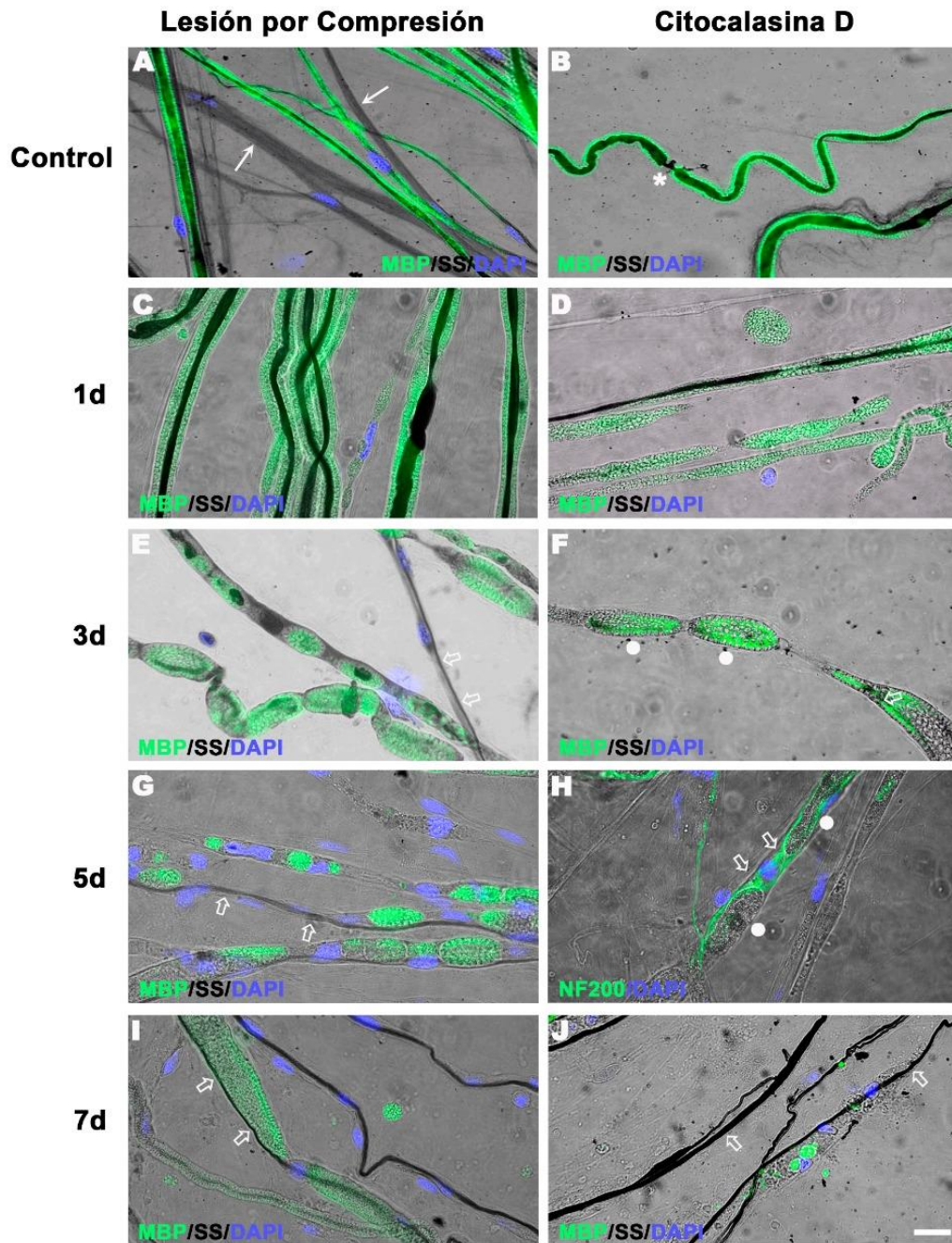


Figura 23. Citocalasina D induce la fragmentación del axón similar a lo observado al inicio de la DW. Las fibras nerviosas del nervio control, lesionado por compresión y con CD después de 1, 3, 5, y 7 días fueron impregnados con plata (SS) o marcados con anti-NF200 y la vaina de mielina con anti-MBP. (A, B) En el control se presenta una impregnación uniforme y completa del axón (negro), las células Remak se marcan en gris (flechas) y se distingue la región nodal (*). (C) A 1d después de la lesión se observa ensanchamiento de los axones y varicosidades en la mielina, así como fibras sin axones. (D) Después de 1d con CD se observan fragmentos de axón y mielina y fibras degeneradas sin axón similar a una degeneración por compresión. (E) A 3d después de la lesión se observan ovoides de mielina con restos de axón y axones delgados (flechas sin rellenar). En contraste, después de 3d con CD solo hay fragmentos de axones al interior de los ovoides (F). A 5d (G) y 7d (I) después de la lesión se observan núcleos alineados sobre el citoplasma formando las bandas de Bungner que guían el crecimiento axonal, se observa un axón remielinizado (*) y proliferación de núcleos; con CD a los 5d (H) y 7d (J) también se observan axones creciendo sobre el citoplasma. Los núcleos fueron marcados con Dapi (azul). Barra=15 μ m.

5.7 Localización de AQP1 durante la degeneración Walleriana

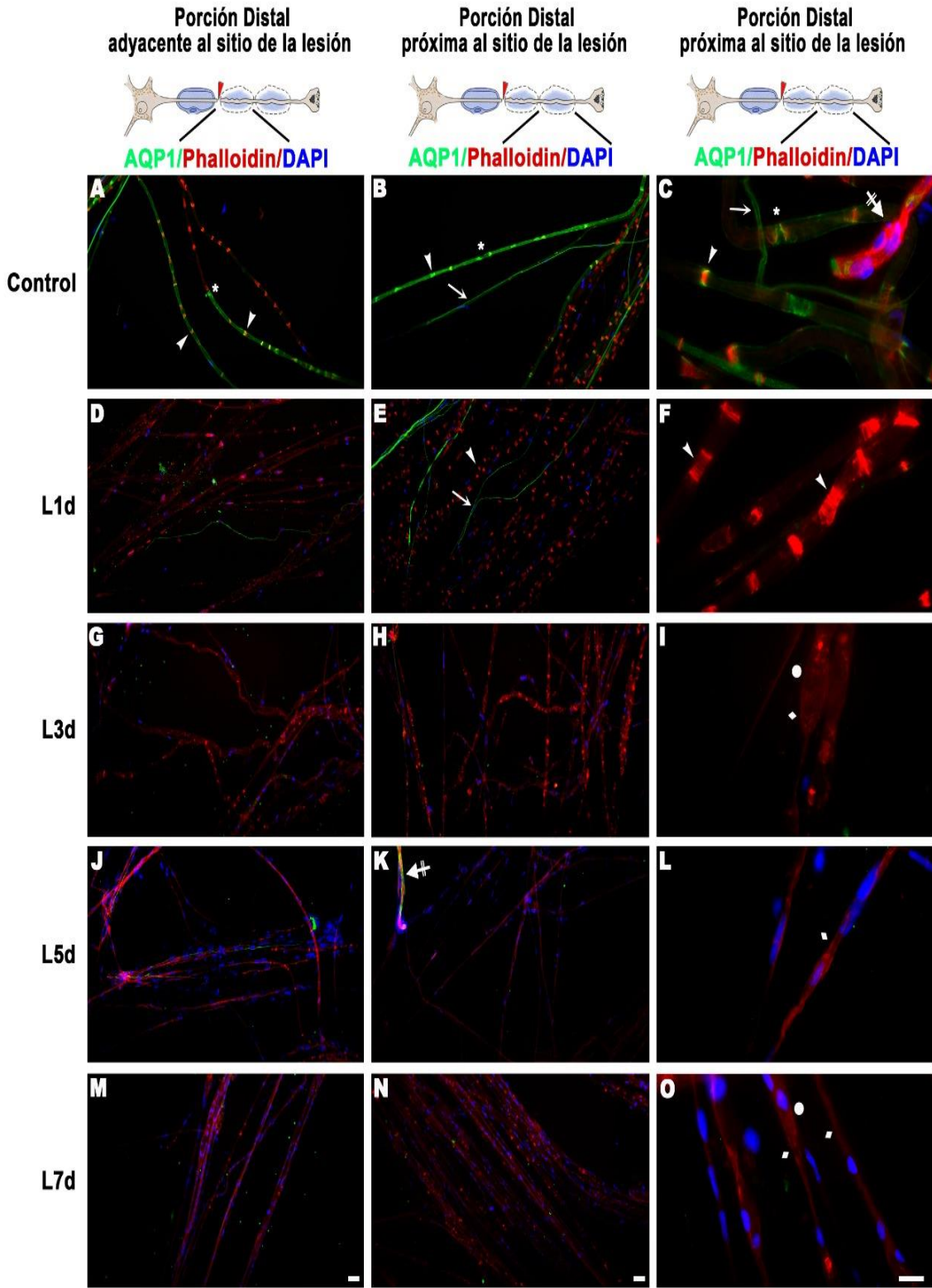
Se analizó la localización de AQP1 en el NC después de una lesión por compresión. Se realizaron inmunofluorescencias contra AQP1 y el marcador de F-actina (faloidina fluorescente) sobre el nervio a 1, 3, 5 y 7 días después de la lesión.

En el nervio control se observa que el marcaje característico de AQP1 en las ISL, las células Remak y la región paranodal (Figura 24 A-C), también se aprecia marcaje de AQP1 en la membrana abaxonal de algunos internodos (Figura 24A-C), en las células endoteliales y los eritrocitos (Figura 24C). A 1 día después de la lesión por compresión se observa que en la región distal, adyacente al sitio de la lesión, la actina de las ISL se desestructura (Figura 24D); hacia la región más distal las ISL mantienen el marcaje de F-actina con su forma de cono característico (Figura 24E, F). Sin embargo, el marcaje de AQP1 disminuye drásticamente en las CSFM (Figura 24D-F) y solo se marcan las células Remak (Figura 24D, E).

A los 3 días después de la lesión se observa que con la fragmentación de la mielina ocurren cambios en las ISL de toda la región distal, éstas se colapsan con un incremento o dilatación del citoplasma (Ghabriel MN y Allt G, 1979), se observan reminiscencias de F-actina al interior de los ovoides y marcaje de actina en el citoplasma de las células de reparación. Sin embargo, no se encuentra marcaje de AQP1 en las fibras degeneradas de la región distal (Figura 24 G-O).

A los 5 y 7 días después de la lesión, se observa el progreso de la degeneración en la región distal que mantiene restos de actina en los ovoides y se acentúa el marcaje de actina en el citoplasma (Figura 24 G-L). En contraste, el marcaje de AQP1 en la región distal, solo se observa en los vasos sanguíneos (Figura 24K). Estos resultados muestran que al inicio de la DW, el marcaje de AQP1 en las fibras degeneradas disminuye a partir de un día después de la lesión, aun cuando la molécula de actina sigue presente en las ISL y no hay marcaje de AQP1 en los ovoides de mielina durante la fase de degeneración de la mielina. Además, se observa que durante el proceso de degeneración ocurren cambios importantes en la actina, que no se han reportado, los cuales favorecen la degeneración del nervio.

Figura 24. Localización de AQP1 durante la DW en el nervio ciático de la rata. Las fibras nerviosas del nervio control y lesionados (L) después de 1, 3, 5, y 7 días fueron marcadas con anti-AQP1 y faloidina. En el nervio control se marcan con anti-AQP1 las ISL de cada internodo (A-C), los paranodos, la membrana abaxonal y las células Remak (flechas en B, C). 1d después de la lesión se observa que en la región distal (sitio de la lesión) actina se desestructura y el marcaje de AQP1 solo está presente en las células Remak (D); en una región más distal se observan ISL estructuradas, pero con poco o nulo marcaje de AQP1 (E, F). A partir de 3d después de la lesión se observa que la actina de la región distal se desestructura, también se observa un tenue marcaje de actina en el citoplasma de las células de reparación (G-H); no se observa marcaje con anti-AQP1 en la región distal. A 5d y 7d después a la lesión el marcaje de actina se encuentra principalmente en el citoplasma de las CS, fuera de los ovoides de mielina (L, O). A 5d se observa únicamente AQP1 en los vasos sanguíneos (flechas con doble trazo vertical, K), pero no en las células degeneradas. También se observa un incremento de núcleos en cada fibra que forman las bandas de Bungner (L, O). Los núcleos fueron marcados con Dapi (azul). Barra=15 μ m.



5.8 Localización de AQP1 en nervios tratados con citocalasina D

Se analizó el efecto de la CD sobre la AQP1. Después de 3 días las fibras del nervio con CD fueron marcadas con anti-AQP1 y faloidina.

En el nervio control se observa el marcaje AQP1 en las ISL de las CSFM (Figura 25 A-C). Después de 3 días con CD, se observa un proceso de degeneración avanzado con ovoides de mielina y reminiscencias de actina marcadas con faloidina. Sin embargo, no se observa marcaje de AQP1 en las fibras degeneradas como lo observado cuando se produce una lesión (Figura 25).

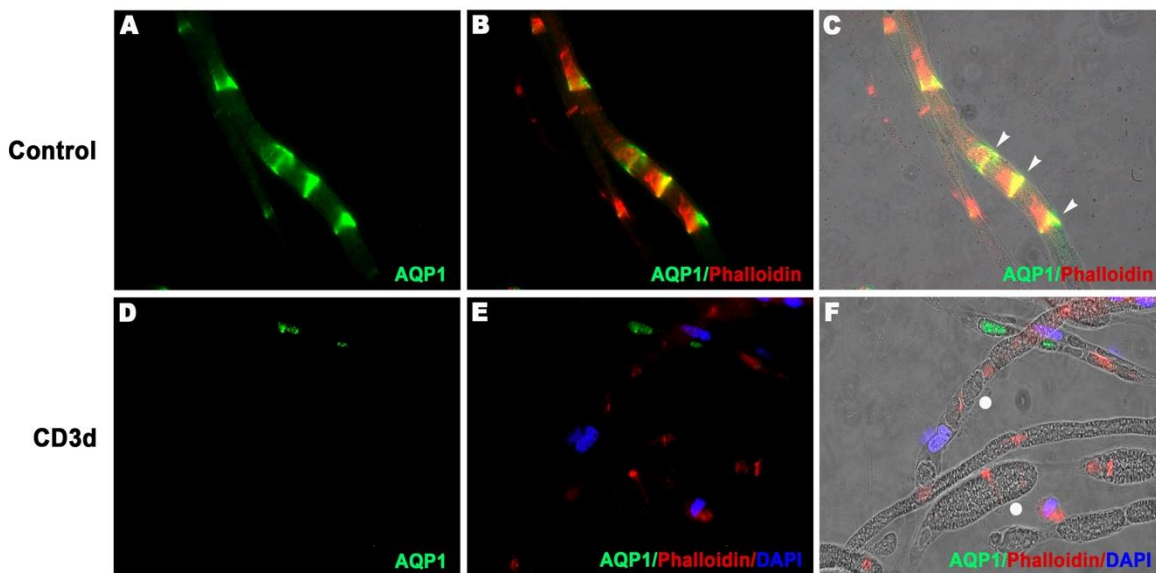


Figura 25. La Citocalasina D induce cambios en AQP1 similar a lo observado en la DW. Las fibras nerviosas del control y con CD después de 3d (CD3d) fueron marcadas con faloidina y anti-AQP1. En el control F-actina se localiza en las ISL (puntas de flecha) (A, C). Después de 3d con CD se aprecian ovoides (círculos) de mielina con restos de F-actina en el interior de los ovoides, pero sin AQP1 (C, D). Los núcleos fueron marcados con Dapi (azul). Barra 15 μ m.

5.9 Expresión de AQP1 en el nervio ciático de ratón

Dado que hasta la fecha no se han identificado inhibidores selectivos no tóxicos para la AQP1 que pudieran ser utilizados para realizar ensayos funcionales se planteó la posibilidad de utilizar ratones transgénicos (Knockout, AQP1-KO) Entretanto, para tratar de entender el papel fisiológico de la AQP1 en el NC. Los ratones AQP1-KO se le solicitaron al Dr. Verkman y se comenzó a realizar el trámite correspondiente. Sin embargo, como control, se determinó la expresión y localización de la AQP1 en el ratón obteniéndose resultados inesperados.

Inicialmente se determinó la expresión de AQP1 en el NC tanto de la rata como del ratón mediante RT-PCR, empleando *primers* específicos de AQP1 para ambos roedores. Los productos de amplificación muestran la presencia del ARNm de AQP1 en ambas especies (Figura 26A). Posteriormente, se realizó el mismo análisis a nivel de proteína mediante la técnica de *western blot*. Los resultados revelan dos bandas en ambas especies, 25-28 kDa que corresponde a la forma nativa de AQP1 y otra de 40 kDa que representa la fracción N-glicosilada (Figura 26B). En el ratón la banda glicosilada presenta un ligero aumento en el peso molecular con respecto a la rata. Estos resultados muestran que AQP1 se expresa tanto en el nervio ciático de la rata como del ratón.

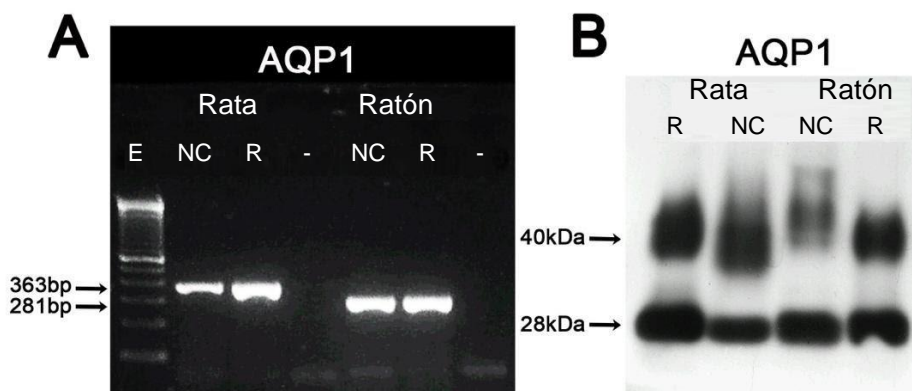


Figura 26. Expresión de AQP1 en el nervio ciático de la rata y del ratón. (A) RT-PCR de AQP1 en el nervio ciático (NC) y en el riñón (R) (control) de la rata y del ratón. Los fragmentos de 363pb y 281pb fueron analizados en geles de agarosa al 2% con una escalera de 100 pb (E). (B) Inmunoblot de AQP1 de nervio ciático y riñón de rata y ratón. Anti-AQP1 reconoce dos bandas de ~28 kDa y ~40kDa.

5.10 Localización de AQP1 en el nervio ciático de ratón

Se determinó la localización de AQP1 en el NC de rata y ratón. En la rata ya lo reportamos anteriormente (Segura-Anaya et al., 2015) (Sección 5.2), pero se incluye nuevamente en la figura para visualizar la diferencia con el ratón. Se realizó el inmunomarcaje contra MBP para mielina y contra GFAP para marcar las células Remak y la contracción con el BSSM (Figura 27A, D, G, J). En la rata, AQP1 está fuertemente presente en las células Remak que co-distribuyen con GFAP (Figura 27B) y también se observan con la tinción de plata (Figura 27C); en las CSFM, AQP1 tiene un fuerte marcaje en las ISL de los internodos marcados contra MBP (Figura 27E) y la tinción de plata (Figura 27F). En ratón, AQP1 co-distribuye con GFAP en las células Remak (Figura 27H, I). Sin embargo, en la imagen compuesta con MBP (Figura 27K) y con la impregnación de plata (Figura 27L), no se observa marcaje de AQP1 en las ISL de las células mielinizadas. Para comprobar que el NC del ratón también presenta ISL, que no se marcan con AQP1, se marcó el nervio con faloidina (marcador de F-actina) (Figura 27 M-O), mostrando la presencia de las ISL en cada internodo, pero a diferencia de la rata, en el ratón no se expresa AQP1. También se llevaron a cabo experimentos preliminares con otro roedor, el cuyo, y se observó que AQP1 se expresa sólo en las células Remak ya que co-distribuye muy fuerte con el marcaje de faloidina en estas células (Figura 28C) y también se distinguen en la imagen de las células impregnadas con plata (Figura 28F), pero no hay presencia de AQP1 en las ISL de las CSFM marcadas con faloidina (Figura 28C), o en las fibras de los axones impregnados con plata (Figura 28F). Estos resultados muestran diferencias en la localización de AQP1 entre la rata, el ratón y el cuyo; mientras que AQP1 está presente únicamente en células Remak del ratón y cuyo, en la rata se localiza en ambas células de Schwann.

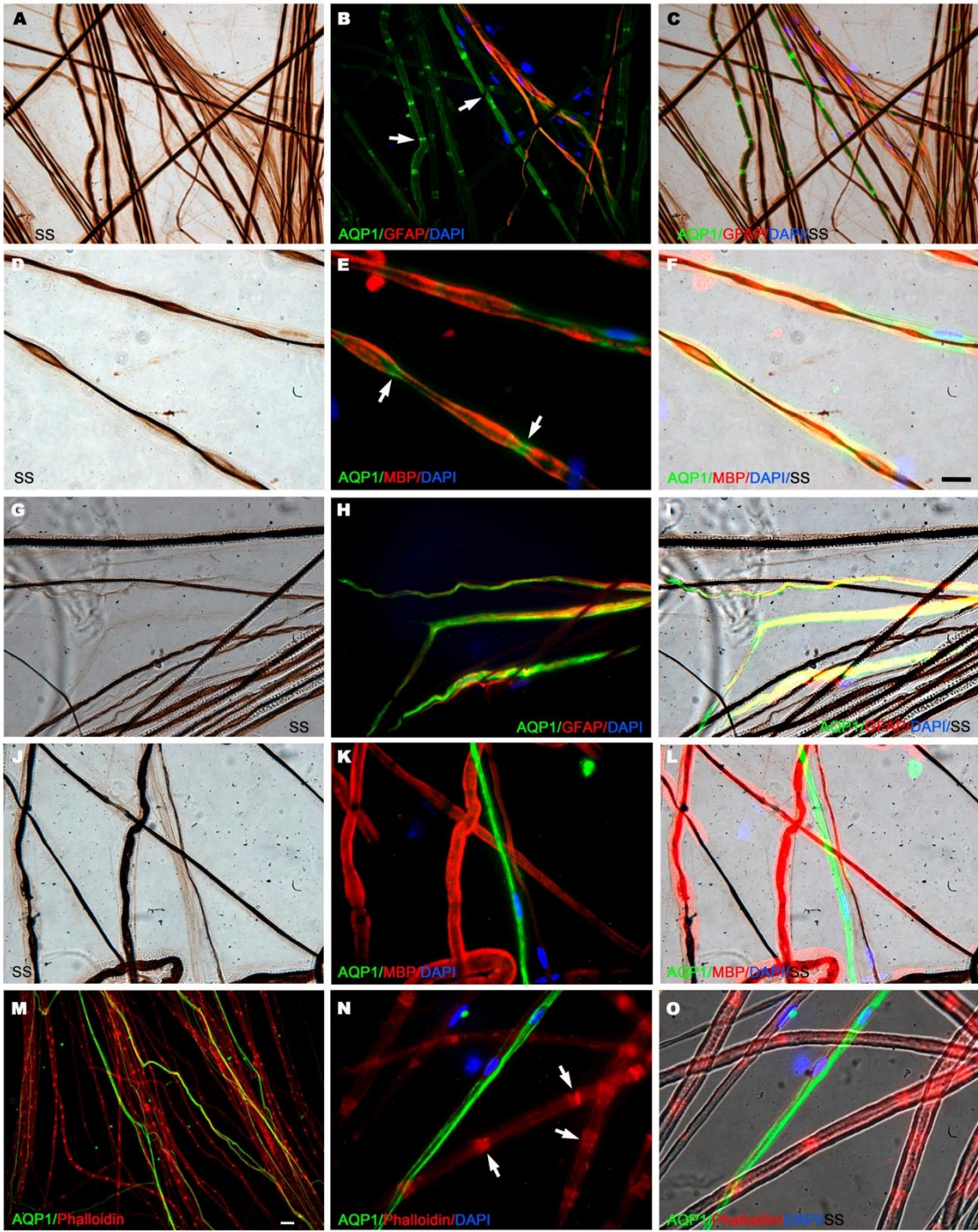


Figura 27. AQP1 se localiza en ambas células de Schwann en la rata, pero en el ratón sólo en las células Remak. Fibras nerviosas de la rata y del ratón fueron impregnadas con el BSSM (A, D, G, J) y marcadas contra AQP1 y GFAP (B, H) o contra AQP1 y MBP (E, K). Las imágenes compuestas (C, F, I, L) tienen la impregnación del axón con plata (SS). En rata, AQP1 co-distribuye con GFAP (B, C) en las células Remak y está presente principalmente en las ISL (flechas en B, E) de las CSFM que tienen el marcaje con MBP (E, F). En el ratón, AQP1 co-distribuye con GFAP (H, I) en las células Remak, pero no con las CSFM (K, L). Las fibras del ratón fueron doblemente marcadas con AQP1 y faloidina (M, N, O) mostrando la presencia de ISL (flechas en H) que se marcan con faloidina, pero no con AQP1, mientras que en la rata, AQP1 se encuentra enriquecida en las ISL (flechas en B, E). Los núcleos fueron marcados con Dapi (azul). Barra= 15 μ m.

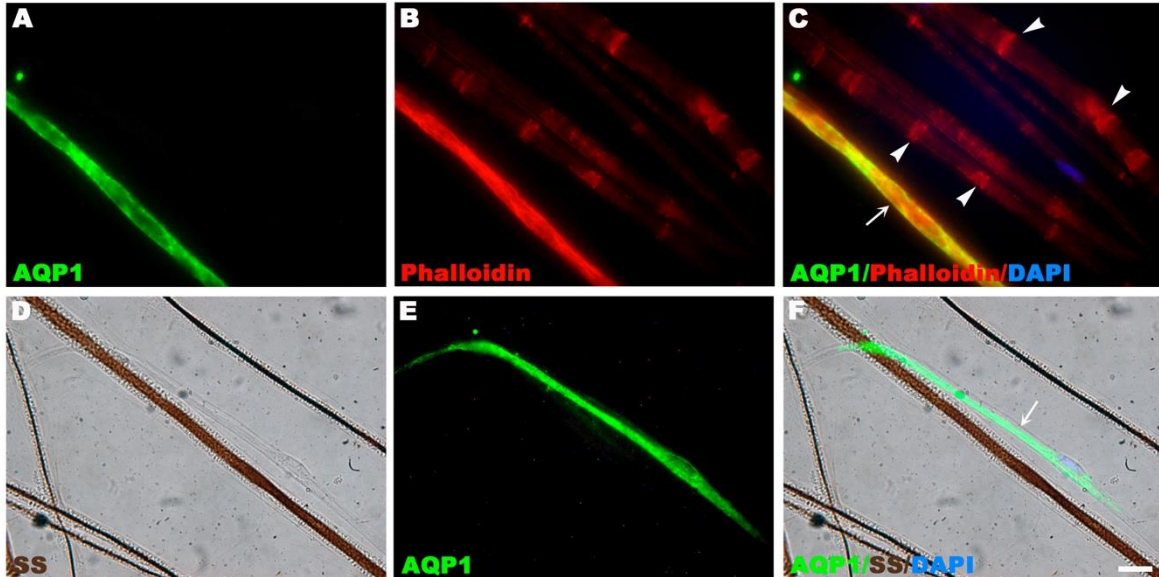


Figura 28. En cuyo, AQP1 se localiza únicamente en las células Remak. Fibras nerviosas del cuyo fueron marcadas con anti-AQP1 (A, E) y faloidina (B). La imagen compuesta (C) muestra el marcaje específico de AQP1 en las células las Remak (flecha), pero no hay marcaje en las ISL de las CSFM (puntas de flecha). Con la tinción de plata (SS) se identifica que AQP1 se encuentra en las células Remak (flecha, F). Los núcleos fueron marcados con Dapi (azul). Barra= 15 μ m.

5.11 Expresión de diferentes isoformas de AQPs en el nervio ciático de la rata y del ratón

La diferencia de expresión de AQP1 entre roedores sugirió la presencia de otras AQPs en el NC, por lo que se amplió el análisis de la familia de AQPs en el SNP de los roedores. Se determinó la expresión de las AQPs 1-9 mediante RT-PCR en el NC de ambos roedores (Figura 29). Para ello se emplearon *primers* específicos para cada AQP (Tabla I) los cuales fueron diseñados con base en las consideraciones que permitieran la obtención de un producto específico capaz de amplificarlos de manera eficiente bajo las mismas condiciones (Sección 4.11).

Se realizaron distintas pruebas de PCR para estandarizar las condiciones de amplificación, que incluyeron la determinación óptima de $MgCl_2$ (0.5, 1.0, 1.5, 2.0) así como la cantidad de templado para lograr un resultado exitoso. Las condiciones de amplificación para las AQPs (2-9) fueron a partir de 5 μ l de cDNA y 1.0 μ l de $MgCl_2$, con la intención de favorecer a la expresión de las AQPs que se expresan en baja cantidad, mientras que AQP1 amplifica fuertemente con 2 μ l de cDNA. Además, se empleó una enzima muy eficiente en el proceso, GoTaq polimerasa (Promega). Los resultados muestran que en el nervio ciático de la rata se expresan cinco AQPs: AQP1, AQP4, AQP5, AQP7 y AQP9. AQP1, AQP4 y AQP7 se expresan en gran cantidad, mientras que AQP5 y AQP9 se expresan en bajas cantidades. En el ratón se expresan todas las AQPs, excepto la AQP8. AQP1, AQP2, AQP3, AQP4 Y AQP7 se expresan en gran cantidad, mientras que la AQP5 y AQP6 se expresan en bajas cantidades y solo la AQP9 muestra una expresión muy débil (Figura 29). En rata, la amplificación de AQP2 en la rata la mayoría de las veces no estuvo presente, pero en algunos experimentos sí se observó aunque muy débilmente. Estos resultados muestran que en el NC la expresión de las AQPs es diferente entre la rata y el ratón.

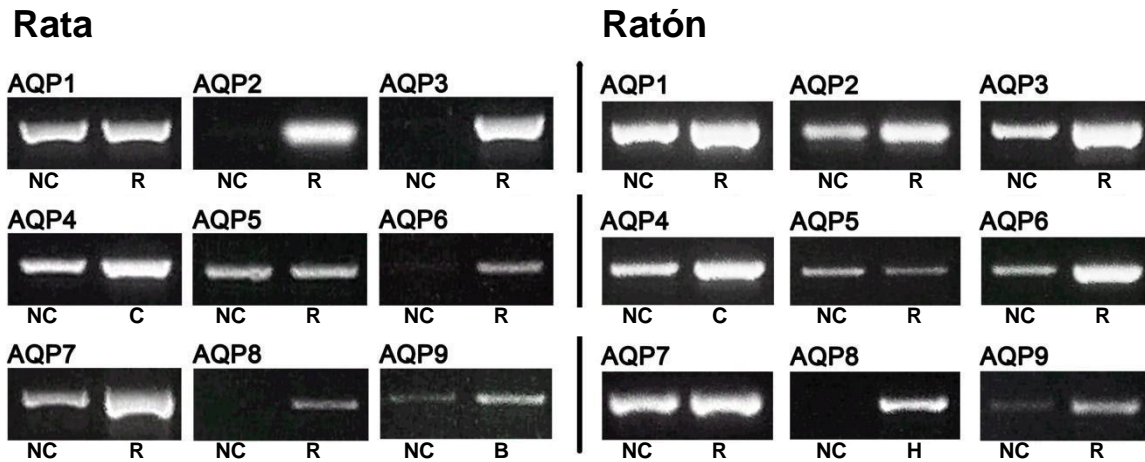


Figura 29. Expresión de las AQPs en el nervio ciático de la rata y del ratón. Se analizó la expresión de nueve AQPs (AQP1-AQP9) en el nervio ciático (NC) de rata y ratón mediante RT-PCR. El riñón (R), cerebro (C) e hígado (H) fueron empleados como tejidos control. En rata, sólo se expresan AQP1, AQP4, AQP5, AQP7 y AQP9, mientras que en el ratón se expresan todas las AQPs, excepto AQP8.

Dadas las diferencias entre las AQPs de rata y ratón, se pensó estudiar la localización de algunas AQPs en ratón con la finalidad de encontrar si alguna marcaba la ISL y la región nodal. Se hicieron inmunohistoquímicas contra AQP4 (AQP-004, Alomone Labs), AQP5 (AQP-005, Alomone Labs), AQP6 (AQP-006, Alomone Labs), AQP7 (AQP-007, Alomone Labs), y AQP9 (AQP-009, Alomone Labs) en los tejidos control y el NC. A pesar de encontrar marcaje con cada uno de los anticuerpos en NC los resultados no mostraron especificidad en los controles, por lo tanto, tampoco son confiables en el NC. Así, la localización del resto de las AQPs en rata y ratón puede ser objeto de estudio de futuras investigaciones empleando anticuerpos específicos.

5.12 Cambios en la expresión de AQPs de la rata después de una lesión por compresión

Dado que en el nervio ciático de la rata se expresan cinco AQPs, se planteó estudiar la expresión de estas AQPs, así como AQP2, durante la DW (Figura 30). El nervio ciático de las ratas fue lesionado por compresión y analizado a las 12h, 1, 3, 5, 7, 9, 14, 21 y 30 días después de la lesión mediante RT-PCR.

Los resultados muestran que la expresión de AQP1, AQP4 y AQP7 permanece constante en todos los tiempos estudiados después de la lesión por compresión, sin mostrar diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) al comparar cada punto con el nervio ciático sin lesionar (control) (Figura 30). En contraste, AQP2, que en condiciones normales no se expresa o se expresa muy poco, muestra una banda a partir de 5 días y un pico estadísticamente significativo a 9 días después de la lesión ($P < 0.01$), comparado con el nervio sin lesionar, y regresa a niveles normales a 30d. AQP5 muestra un incremento significativo desde el día 3 que permanece hasta el día 14 ($P < 0.001$), y regresa a su nivel basal el día 30. AQP9, que también presenta niveles bajos en el nervio normal, incrementa su expresión significativamente ($P < 0.01$) entre las 12 y 24 h después de la lesión y más tarde bajan los niveles hasta llegar a condiciones similares al tejido normal. Estos resultados muestran que la expresión del ARNm de AQP1, AQP4 y AQP7 permanece constante después de una lesión por compresión, mientras que la expresión de AQP2, AQP5 y la AQP9 aumentan.

En el NC del ratón también se realizaron lesiones para estudiar si existe un patrón en la expresión temporal de AQP1 y AQP7 (Figura 31). El nervio del ratón es mucho más pequeño que el de la rata y es más complicado obtener suficiente ARN de la región distal con un solo animal, por lo que se emplearon dos animales por lesión. Los resultados muestran que, al igual que en rata, la expresión de AQP1 y AQP7 permanece constante en todos los tiempos estudiados después de la lesión por compresión y no hay diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$) al comparar cada punto con el nervio ciático sin lesionar (control) (Figura 31). Estos resultados se publicaron en la revista *IBRO Neuroscience Reports* (Segura-Anaya et al., 2021)

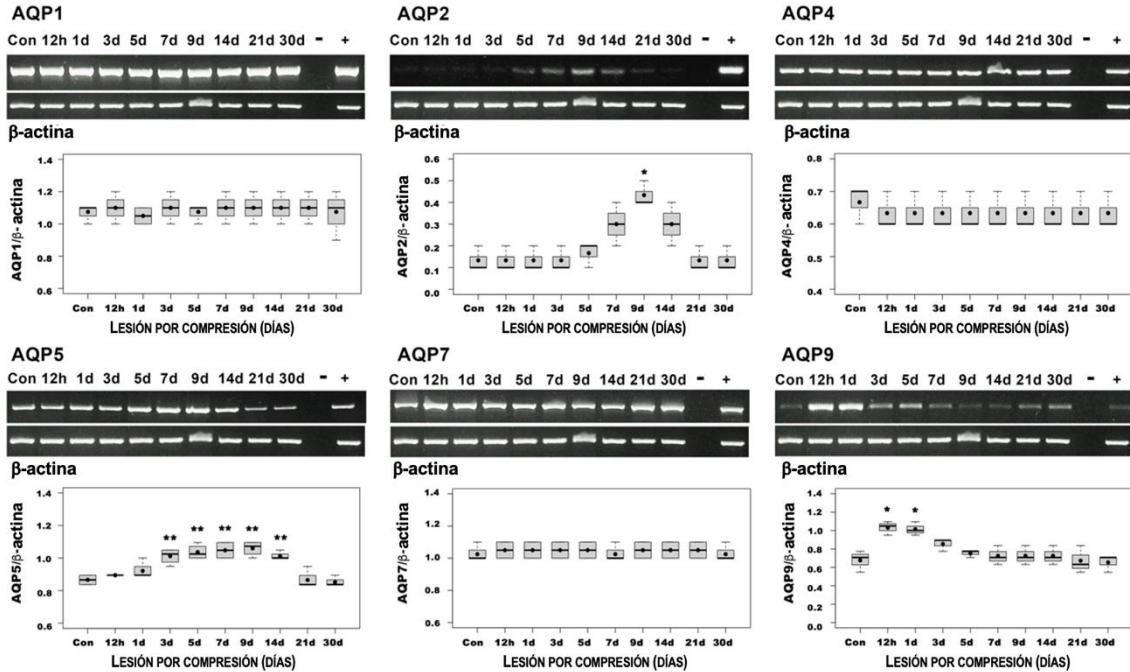


Figura 30. Expresión de las AQPs de rata después de una lesión por compresión. Análisis de la expresión de AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP7 y AQP9 después de 12h, 1, 3, 5, 7, 9, 14, 21 y 30 días después de la lesión mediante RT-PCR. El nervio ciático sin lesionar se empleó como control (Con). Cada diagrama de caja constituye el rango intercuartílico de los datos, la mediana y la media se representan con una línea sólida y un punto negro respectivamente. Los bigotes (*whiskers*) muestran el punto máximo y mínimo de los datos (n=3 o 4). Se observa que no hay cambios temporales en la expresión de AQP1, AQP4 y AQP7 en todos los tiempos estudiados después de la lesión ($p > 0.05$). Sin embargo, existe un incremento significativo de AQP2 a los 9 días ($p < 0.01$, *), y de AQP5 a los 3, 5, 7, 9 y 14 días ($p < 0.001$, **), mientras que la expresión de AQP9 aumenta rápidamente a las 12h y 1d después de la lesión ($p < 0.01$, *). La expresión relativa del ARNm de cada AQP fue normalizada con β -actina.

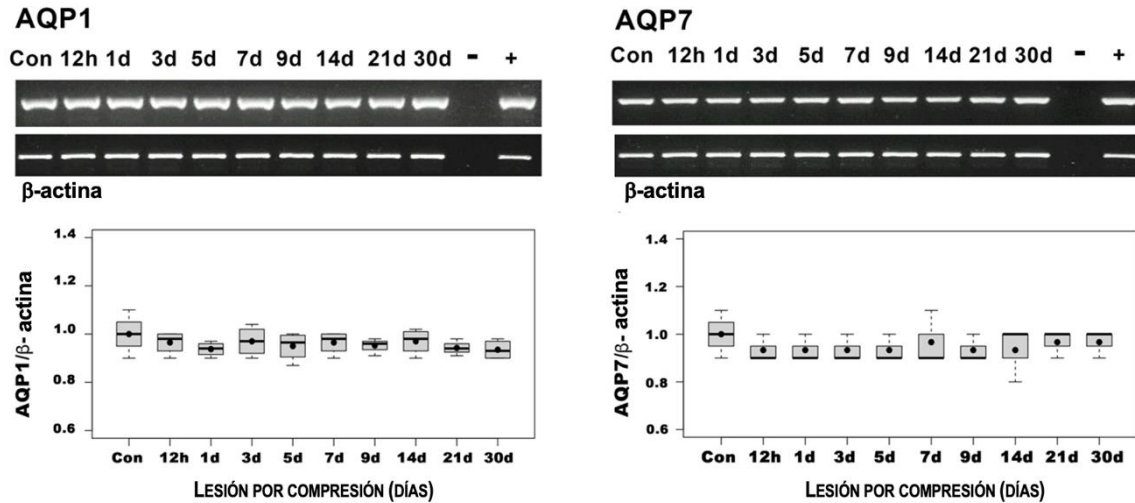


Figura 31. Expresión de AQP1 y AQP7 del ratón después de una lesión por compresión. Análisis de la expresión de AQP1 y AQP7 después de 12h, 1, 3, 5, 7, 9, 14, 21 y 30 días después de la lesión mediante RT-PCR. El nervio ciático sin lesionar se empleó como control (Con). Cada diagrama de caja constituye el rango intercuartílico de los datos, la mediana y la media se representan con una línea sólida y un punto negro respectivamente. Los bigotes (*whiskers*) muestran el punto máximo y mínimo de los datos (n=3). Se observa que no hay cambios temporales en la expresión de AQP1 y AQP7 en todos los tiempos estudiados después de la lesión ($p > 0.05$). La expresión relativa del ARNm de cada AQP fue normalizada con β -actina.

VI. DISCUSIÓN

6.1 Localización de AQP1 en el NC de roedores

El estudio de las AQPs ha mejorado mucho nuestra comprensión sobre la base molecular del transporte de agua a través de la membrana, sin embargo, sabemos que la distribución y la permeabilidad al agua en los tejidos varían según el órgano y el contexto. Se ha reportado la distribución y función de las AQPs en órganos como el cerebro, riñón, pulmón, ojo, glándulas secretoras, entre otros (King y Yasui, 2002; Verkman et al., 2014), pero hay menos información de lo que acontece en el SNP. Inicialmente en este trabajo se estudió la expresión de AQP1 en el nervio ciático de la rata. Los resultados mostraron que AQP1 se localiza en los dos tipos de células de Schwann, tanto en las CSFM como en las células Remak. En las CSFM AQP1 se localiza en la mielina no compacta, principalmente en las ISL y en los paranodos (Segura-Anaya et al., 2015). En ambas regiones las uniones gap autotípicas conectan cada membrana adyacente para formar canales citoplasmáticos. Por sus características estructurales, estas regiones o dominios probablemente facilitan el transporte de nutrientes, moléculas y electrolitos tanto a la mielina como a la región periaxonal del internodo (Balice-Gordon et al., 1998; Meier et al., 2004). El mantenimiento de los internodos y la formación de dominios especializados es muy importante. Cada dominio contiene un único subconjunto de proteínas críticas para la función de cada región. Uno de los pasos finales de la mielinización es la formación de asas paranodales que se adhieren estrechamente al axón formando una unión axo-glial, que es muy similar a las uniones septadas de los invertebrados (Rosenbluth, 2009). En este trabajo se encontró que, en los nodos de Ranvier, la AQP1 tiene un particular marcaje en la región paranodal, en forma de dos collares a cada lado del nodo. Esta distribución sugiere que AQP1 tiene un papel importante en el mantenimiento de la mielina mediante la interacción entre el axón y la CS. También se observó que en algunos internodos hay expresión de AQP1 en la membrana abaxonal similar a las bandas de Cajal, que proporcionan una vía para el transporte de ARN y proteínas que se originan en el soma de la célula hacia la región paranodal (Salzer, 2015) vía que podría servir para la homeostasis del agua.

También se llevó a cabo la reconstrucción del internodo de rata teñido con AQP1 (Figura 15G) en la que se observa que existe una distribución asimétrica de las ISL sobre la región internodal. La división del internodo en 4 regiones de la misma longitud (R1-R4) mostró un patrón en la distribución de las ISL consistente con el obtenido en el nervio tibial (Reynolds y Heath, 1995), en la que el mayor número de ISL se localiza en R3 cerca del núcleo, seguido por R2, R1 y en R4 en los que se observó una menor cantidad ($R3 > R2 > R1 > R4$). Esto sugiere que hay un patrón en estas regiones de citoplasma, el cual es importante para el correcto funcionamiento y la homeostasis del agua en el internodo.

Posteriormente se identificó la expresión de AQP1 en el nervio ciático de ratón y cuyo, en los que se observó, sorpresivamente, que la AQP1, a diferencia de la rata, se encuentran únicamente en las células Remak (Figura 28 y 29). Para corroborar la presencia de ISL en ratón, se marcaron con faloidina, mostrando un gran número de ISL en los internodos (Figura 28 M, N), sugiriendo que muy probablemente otra AQP se debe expresar en esta región.

Recientemente se han utilizado datos de secuenciación de célula única del nervio periférico de ratón para construir un atlas con el transcriptoma del nervio ciático (*Sciatic Nerve Atlas, SNAT*) desde el desarrollo temprano hasta la etapa adulta (Gerber et al., 2021). Estos autores realizaron un análisis de secuenciación de ARN unicelular de CS en diferentes etapas de diferenciación posnatal, lo que permitió seguir la trayectoria de las CSFM y las células Remak en diferentes etapas del desarrollo hasta la etapa adulta. Consultado este atlas para AQP1 (<https://www.snat.ethz.ch/>) se observa la expresión de AQP1 en ratón al día posnatal 60 (P60) en las células Remak y en las células endoteliales. Por lo tanto, estos resultados coinciden con lo descrito en nuestro trabajo que muestra la localización de AQP1 en las células Remak del nervio ciático de ratón. La ausencia de AQP1 en las ISL y paranodos sugiere que al menos otra AQP se localiza en las CSFM siendo la AQP11 un fuerte candidato ya que, en los datos de secuenciación de célula única, el ARNm de esta proteína se expresa en las CSFM del nervio ciático de ratón adulto (Gerber et al., 2021).

El hecho de que AQP1 se localice en las células Remak, sugiere que AQP1 podría estar relacionada con la percepción del dolor, ya que estas células agrupan a las fibras C que

transmiten señales sensoriales relacionadas con el dolor, hacia los GRD (Griffin y Thompson, 2008; Yam et al., 2018). La AQP1 también se ha identificado en las CS asociadas a las fibras amielínicas de las terminaciones periodontales de Ruffini (Nandasena et al., 2007). En la médula espinal, la AQP1 se expresa en las células ependimarias que recubren el canal central y más robustamente en las neuronas pequeñas del GRD que dan lugar a las fibras C amielínicas (Oshio et al., 2005; Shields et al., 2007) lo que apoya su participación en el procesamiento del dolor, aunque existen estudios contradictorios al respecto, ya que por un lado se ha reportado que los ratones deficientes de AQP1 tienen un umbral de dolor más alto para capsaicina y a estímulos térmicos (Oshio et al., 2005; Zhang y Verkman, 2010), mientras que Shields et al. (2007) demostraron que estos ratones no tienen un procesamiento sensorial alterado. Esta discrepancia en los resultados se puede deber a los diferentes modelos experimentales empleados o a la posible expresión *de novo* de otras AQPs (Bufolli et al., 2009). Es claro que se requieren más estudios para determinar el papel de la AQP1 en la percepción del dolor, sin embargo, como ya se mencionó, la localización de AQP1 en las células Remak, en los tres roedores, sugiere la participación de esta AQP en la transmisión del dolor en el SNP.

Dado que existe la posibilidad de que las diferencias en la localización de AQP1 entre rata y ratón se deban a cambios en la estructura de la proteína, se realizó el alineamiento de la secuencia de aminoácidos (BLAST), encontrándose 98% de identidad de la proteína AQP1, y un alto nivel de homología entre las secuencias. A nivel del gen, la zona con mayores diferencias se ubica en la región 3'-UTR. Estos resultados sugieren que la diferencia encontrada en la localización de AQP1 en el nervio ciático entre los roedores, no es a nivel de la estructura de la proteína sino a posibles diferencias en su regulación.

La diferencia de expresión entre rata y ratón que se encontró en este proyecto es similar a otros estudios en diferentes tejidos. Por ejemplo, existen diferencias en la localización de AQP1 en el nervio trigémino entre humanos y ratones (Gao et al., 2012) en donde AQP1 se expresa en las neuronas del trigémino de pequeño y mediano tamaño, tanto en humanos como en ratones, pero mientras que todas las células satélite humanas expresan AQP1, solo algunas células satélites que rodean a las neuronas del trigémino en ratones son AQP1 positivas (Gao

et al., 2012). En el SNP, AQP1 se ha observado en el sistema nervioso entérico de ratas y ovejas, pero no en humanos. Las diferencias en la distribución de otras AQPs entre especies también se ha reportado en los astrocitos corticales de humano y ratón que difieren en la polarización de AQP4 hacia los microvasos (Eidsvaag et al., 2017). En el tracto respiratorio existe una distribución similar de las AQPs 3-5 entre humanos y ratas, pero ésta cambia con AQP5 en el tracto respiratorio de ratones (Krane et al., 2001). Desafortunadamente, hasta la fecha no se han podido esclarecer dichas diferencias; por el contrario, éstas abren muchas interrogantes sobre los mecanismos de distribución y regulación de las AQPs en cada especie.

6.2 Expresión de las isoformas de AQP en el nervio ciático de rata y ratón

Las diferencias de localización de AQP1 en rata y ratón sugirieron la presencia de otras AQPs en el nervio ciático. Se realizó el análisis de expresión de nueve AQPs (AQP1-AQP9) que incluyen a dos grupos de AQPs, tanto acuaporinas como acuagliceroporinas, favoreciendo las condiciones de amplificación para detectar la señal de expresión de las AQPs cuya expresión fuera muy baja. Se observó que en el NC de ambos roedores se expresan varias AQPs pero existen diferencias en las isoformas que expresan cada uno de estos organismos. En el nervio ciático de la rata, se expresan AQP1, AQP4, AQP5, AQP7 y AQP9, mientras que en ratón se expresan todas las AQPs, excepto AQP8. Por lo tanto, los resultados muestran que existen diferencias en la expresión de las isoformas de AQP entre rata y ratón. Al comparar nuestros resultados con el atlas del nervio ciático del ratón (<https://www.snat.ethz.ch/>) para las AQPs se observa que, con excepción de la AQP6, el resto de las AQPs estudiadas coinciden con nuestros resultados.

La expresión de varias AQPs en el NC de roedores coincide con estudios similares en otros tejidos como la médula ósea del ratón en la que se identificó, mediante RT-PCR, la expresión de cuatro AQPs (AQP4, AQP5, AQP8 y AQP9) (Oshio et al., 2004). Por otro lado, Tenckhoof et al. (2005) mostraron que la retina humana expresa todas las AQPs (AQP0-AQP12), mientras que la retina de la rata expresa AQP1, AQP3, AQP4, AQP5, AQP6, AQP8, AQP9 y AQP11, pero no expresan AQP2, AQP10 y AQP12. En el corazón también existen diferencias en la expresión de las AQPs (AQP3, AQP4, AQP5, AQP9 y AQP11) entre rata,

ratón y humano (Butler et al., 2006). Estos resultados y los obtenidos en este trabajo muestran que existen proteínas que regulan el volumen celular en los tejidos, que en algunos casos hay una similitud en la expresión entre especies, en otros casos se observan diferencias que podrían asociarse a los diferentes mecanismos de regulación de las AQP's entre especies. En la familia de las AQP's se han identificado diferencias en la regulación transcripcional de los genes, así como modificaciones a nivel postransduccional, en la estabilidad y distribución de las proteínas (King et al., 2004).

6.3 Expresión de las isoformas de AQP en el nervio ciático de rata después de una lesión por compresión

Como se señaló anteriormente, los resultados mostraron que en el NC se expresan cinco AQP's (AQP1, AQP4, AQP5, AQP7 y AQP9) lo que sugiere que la homeostasis del agua está altamente regulada. Para estudiar si existen cambios en la expresión de las AQP's en la rata que se relacionen con los eventos que acompañan a la DW se estudió la expresión de las AQP's en nueve tiempos después de la lesión. Se empleó el modelo de degeneración *in vivo* mediante la compresión del nervio ciático de la rata. Las lesiones traumáticas suelen estar acompañadas de un flujo sanguíneo insuficiente que puede deteriorar la homeostasis iónica y del agua, además de la presión osmótica extracelular (Suzuki et al., 2018). Como se ha descrito, las AQP's están asociadas con la formación y resolución del edema en el SNC. La ausencia de la AQP4 en los pies de los astrocitos disminuye el desarrollo del edema cerebral causado por un estrés hiposmótico (Manley et al., 2000; Thrane et al., 2011) y es esencial en la reabsorción del agua en el edema cerebral vasogénico (Papadopoulos et al., 2004). En el edema del nervio óptico (NO) causado por una lesión traumática se han reportado cambios de expresión de AQP4 y AQP9 que se asocian con el desarrollo del mismo (Suzuki et al., 2014). La expresión de AQP4 se incrementa en el NO después de 24h de una lesión por compresión y posteriormente disminuye, mientras que los niveles de expresión de AQP9 se incrementan lentamente y alcanzan un pico a los 14 días. Estas características sugieren que en el NO el cambio de expresión de AQP4 está asociado con el desarrollo del edema, mientras que AQP9 refleja un mecanismo compensatorio al daño (Suzuki et al., 2014).

Aunque no ha sido estudiado a profundidad, en el NC también se ha descrito la presencia de edema después de una lesión (Pettersson y Tengvar, 1986) y se han reportado cambios en la expresión de la AQP1 en algunos modelos de nervios lesionados. Por ejemplo, la axotomía del nervio facial provoca cambios en la expresión de la AQP1 que coinciden con edema en el canal facial (Wang et al., 2012). En la lesión al nervio ciático, también se incrementan los niveles de expresión de AQP1 en las neuronas pequeñas del GRD y en ratones deficientes de AQP1 la regeneración axonal del GRD está alterada (Kaya et al., 2014; Zhang y Verkman, 2015). Dado que se expresan varias AQPs en el NP, se estudió si existían cambios temporales en la expresión de seis AQPs en la rata (AQP1, AQP2, AQP4, AQP5, AQP7 y AQP9) y dos del ratón (AQP1 y AQP7) después de una lesión por compresión en el nervio ciático. Los resultados mostraron que los niveles de expresión de AQP1, AQP4 y AQP7 permanecen constantes durante el proceso de DW, mientras AQP2, AQP5 y AQP9 presentan un aumento significativo en los niveles de expresión después de una lesión. Estos cambios de expresión podrían estar asociados con los eventos de desmielinización y remielinización que ocurren durante la DW. En este trabajo se observó que la expresión del ARNm de AQP2 estaba ausente en la mayoría de los nervios de rata estudiados; sin embargo, en unas pocas muestras se detectaron niveles muy bajos de AQP2, por lo que se incluyó en el estudio. Estos resultados están de acuerdo con otros trabajos donde no se observa AQP2 en el nervio ciático normal de rata y ratón (Borsani et al., 2009; Buffoli et al., 2009; Albertini y Bianchi, 2010). Sin embargo, se ha descrito que después de una constricción crónica del nervio ciático se induce la localización de AQP2 en neuronas pequeñas y en las CS del GRD (Buffoli et al., 2009; Albertini y Bianchi, 2010). Nuestros resultados mostraron que los niveles de AQP2 se incrementan 5 días después de la lesión y tienen un pico a los 9 días, período en el que ocurre la formación de las bandas de Bungner y los axones se regeneran; AQP5 se incrementa a los 3 días después de la lesión y se mantiene alto hasta el día 14, período en el que ocurre el proceso de regeneración y remielinización axonal. Estos resultados difieren de lo observado para AQP9, cuya expresión se incrementa rápidamente las primeras 24 h después de la lesión y posteriormente disminuye a los niveles basales sugiriendo que ésta contribuye en la degeneración axonal y la formación de los ovoides de mielina que ocurre al inicio de la DW. En consecuencia, estos resultados muestran que cada una de estas AQPs está involucrada en diferentes etapas de la DW y, por lo tanto, sugieren que tienen un papel diferente en estos

eventos. Sería interesante conocer la localización detallada de estas AQPs durante este proceso.

Es posible que las AQPs que se expresan en altos niveles (AQP1, AQP4 y AQP7) en el nervio ciático, pero permanecen constantes después de la lesión se encuentren reguladas, no a través de la transcripción del ARNm, sino por modificaciones postranscripcionales a través de miRNAs que regulen la actividad de la proteína. Varias patologías humanas se han asociado con la desregulación de miRNAs que modulan la expresión de las AQPs (Gomes et al., 2018). En la isquemia cerebral de rata, miR-320a inhibe la expresión de AQP1 y AQP4, mientras que anti-miR-320a aumenta su expresión, lo que identifica a miR-320a como un modulador potencial de estas AQPs (Sepramaniam et al., 2010). Por lo tanto, existe la posibilidad de que los niveles de expresión de ARNm de AQP1, AQP4 y AQP7 no cambien, sino que se encuentren regulados por miRNAs después de la lesión. Otra posibilidad es que ocurran cambios en la localización subcelular de las AQPs. Se ha propuesto que un mecanismo regulador de las isoformas de AQP es un evento dependiente del calcio o de la fosforilación, incluida la translocación hacia y desde la membrana plasmática y, en el caso de la activación, si la AQP está abierta o cerrada (Nesverova y Thörnroth-Horsefield, 2019; Conner et al., 2013). Se ha informado que las AQPs (AQP0–12) identificadas en mamíferos se expresan y regulan de manera dependiente del tejido (Nesverova y Thörnroth-Horsefield, 2019). En este trabajo, los resultados muestran que de las nueve AQP estudiadas (AQP1–9), solo cinco AQPs se expresan en ratas, mientras que ocho AQPs están presentes en ratón. Además, la localización de AQP1 es diferente entre rata y ratón. Por lo tanto, los resultados sugieren que la regulación de las AQPs difiere entre especies y podría diferir con respecto a los tejidos. Los roedores han sido ampliamente utilizados como modelos en la investigación biomédica: ratas (*Rattus norvegicus*) y ratones (*Mus musculus*) pertenecientes al orden Rodentia. Sin embargo, el hecho de que la expresión de AQP1 sea diferente entre rata y ratón debe ser considerado al extrapolar los hallazgos fisiológicos y fisiopatológicos en humanos en un entorno clínico.

6.4 Papel del citoesqueleto de actina durante la degeneración Walleriana

Dado que los eventos que ocurren cuando se lleva a cabo una lesión son bastante complejos, es necesario estudiarlos por etapas con diferentes marcadores para entender el proceso. Esto nos llevó a incorporar al proyecto la combinación de una técnica muy antigua, utilizada por Santiago Ramón y Cajal, conocida como tinción de plata para estudiar la organización del nervio y distinguir los axones mielinizados por las CSFM de los haces de Remak, con la fluorescencia. De esta forma se puede detectar la localización de AQP1, y otras moléculas que no se encuentren sobre el axón, directamente sobre la región teñida con plata para obtener un campo amplio de la estructura anatómica del nervio.

Este método fue de gran utilidad para estudiar la complejidad de los nervios durante la degeneración del nervio periférico, ya que se pueden identificar los cambios en la estructura de las fibras, por ejemplo, la fragmentación de los axones y la vaina de mielina, además del crecimiento del axón y los axones remielinizados.

Por otro lado, estudiando inicialmente la actina (con y sin CD) durante la DW para tener un marco de referencia con el cual comparar la localización de AQP1 después de generada una lesión, se observó que la despolimerización de actina es un componente necesario para la degeneración del nervio. Los resultados mostraron que la CD induce la fragmentación de la mielina y del axón a partir de las primeras 24h de su aplicación; también afecta la distribución de AQP1 de tal manera que se pierde el marcaje en las ISL y la región nodal, como ocurre con una lesión normal por compresión, y es capaz de inhibir la regeneración axonal, al menos durante los primeros 3d después de su aplicación lo que sugiere que ésta además de afectar la actina presente en la mielina no compacta, también, inhibe la actina presente en los conos de crecimiento lo que obstaculiza la elongación del axón (Wang et al., 2018). La CD es una toxina fúngica usada comúnmente para alterar la polimerización de F-actina. La CD se une a los filamentos de F-actina y previene la adición de la G-actina del filamento polimerizado, despolimerizándolo eventualmente (Wang et al., 2015). Estos resultados contrastan con lo reportado por Jung et al. (2009) quienes propusieron que la polimerización de actina es necesaria para la fragmentación de la mielina ya que en explantes de nervio ciático en cultivo en presencia de CD observaron que la inhibición de la polimerización de actina suprimió la

formación de los ovoides de mielina después de 3 días de lesión (Jung et al., 2009). El contraste en los resultados puede deberse a las diferencias entre el modelo experimental *in vitro* que emplea Jung con respecto al sistema *in vivo* que utilizamos nosotros. Trabajos realizados a nivel del SNC han sugerido que es necesario la remodelación de los filamentos de actina, en particular el desensamble de actina, durante el proceso de mielinización (Zuchero et al., 2015; Samanta y Salzer, 2015). Asimismo, la mielina no compacta de las CS contiene gelsolina, proteína involucrada en la remodelación de la red de actina, y su expresión se eleva durante la degeneración del nervio (Tanaka y Sobue, 1994). También se ha reportado que después de una lesión, la desestabilización del citoesqueleto activa un programa de regeneración retrógrada a través de DLK/JNK y la posterior fosforilación y activación del factor de transcripción c-jun que favorece la regeneración del axón en neuronas sensoriales, células del ganglio retinal y neuronas del GRD (Valakh et al., 2015). Además, la CD tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento axonal (Wang et al., 2018) ya que no se observan axones creciendo en la zona afectada por la CD y tampoco se observa actina en el citoplasma de las células. Se aprecia que las CS que experimentan una transición al fenotipo de reparación, después de una lesión, sufren la remodelación del citoesqueleto en el proceso, desde el desensamble de actina para fragmentar la mielina al inicio de la degeneración y su ulterior ensamble para favorecer el crecimiento y remielinización del axón.

6.5 AQP1 durante la degeneración Walleriana

Como se mencionó anteriormente, el análisis de expresión de RNAm y de la proteína de AQP1 mostró que permanecen constantes después de una lesión. En el músculo cardíaco, AQP1 es la AQP dominante del tejido y los niveles de expresión del transcrito y la proteína tampoco se afectan si existe estrés isquémico u osmótico (Butler et al., 2006). Sin embargo, el análisis de inmunolocalización de la proteína en el NC muestra una disminución considerable de la proteína AQP1 en la región distal a partir de un día después de la lesión, aun cuando la actina, presente en las ISL, no se ha desestructurado, y desaparece durante la fragmentación de la mielina (3-7 días), lo que sugiere que la intensa señal de AQP1 en el inmunoblot puede estar relacionado con el marcaje de AQP1 en las células endoteliales y vasos sanguíneos ya que en estos casos el marcaje de AQP1 es muy intenso. También sugiere

que AQP1 no participa en la degeneración axonal o en la formación de los ovoides de mielina al inicio del proceso. Tampoco hay evidencia sobre la participación de AQP1 en la regeneración axonal como se propuso en el modelo murino (Zhang y Verkmann, 2015) ya que no hay marcaje de AQP1 en el citoplasma de las CS de reparación que sustente su contribución al crecimiento axonal.

VII. CONCLUSIONES

1. La localización de AQP1 es diferente entre rata y ratón. En la rata, AQP1 está presente en ambos tipos de CS tanto en las CSFM como en las células Remak. En las CSFM AQP1 se localiza en la mielina no compacta, principalmente en las ISL y en la región paranodal. En el ratón y el cuyo únicamente se localiza en las células Remak.
2. La tinción de plata y el marcaje simultáneo con marcadores fluorescentes permite identificar la localización de la AQP1 en las CS tanto de rata como de ratón en condiciones normales o durante el proceso de degeneración.
3. Además de AQP1 también hay expresión de otras isoformas de AQPs en el nervio ciático con un patrón de expresión diferente entre rata y ratón. En la rata se expresan cinco AQPs (AQP1, AQP4, AQP5, AQP7 y AQP9), mientras que en el ratón se expresan todos las AQPs (AQP1-AQP9), excepto AQP8.
4. En la rata, el patrón de expresión de las isoformas AQP2, AQP5 y AQP9 se regula al alza después de una lesión por compresión, mientras que el patrón de expresión de AQP1, AQP4 y AQP7 se mantiene constante.
5. En el ratón, el patrón de expresión de las isoformas AQP1 y AQP7 se mantiene constante después de una lesión por compresión.
6. La despolimerización de actina es un componente necesario para la degeneración del nervio, ya que si se inhibe la polimerización de actina con CD el nervio se degenera igual que en una lesión normal por compresión.

7. En la rata, después de una lesión por compresión del nervio ciático los niveles de expresión de AQP1 disminuyen casi de inmediato y desaparecen con el avance de la degeneración de la mielina. AQP1 se restablece cuando las fibras han sido remielinizadas y presentan ISL.
8. Los axones que crecen, para conectar con su blanco, evaden los ovoides de mielina y avanzan sobre el citoplasma de las CS de reparación que contiene actina. La despolimerización de actina con CD retrasa la regeneración y remielinización axonal.
9. La AQP1 disminuye o desaparece de las CS después de una lesión por compresión del NC, e igualmente cuando se trata el NC con CD y la actina se despolimeriza.
10. Los resultados muestran que la expresión de las AQPs es especie específica; además, la localización no solo es tejido específico como ya se ha reportado, sino también es especie específica. Por lo tanto, los resultados obtenidos en la rata y el ratón deben ser considerados al extrapolar los hallazgos fisiológicos y fisiopatológicos en humanos.

LOCALIZATION OF AQUAPORIN 1 WATER CHANNEL IN THE SCHMIDT–LANTERMAN INCISURES AND THE PARANODAL REGIONS OF THE RAT SCIATIC NERVE

E. SEGURA-ANAYA, A. MARTÍNEZ-GÓMEZ AND M. A. R. DENT*

Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Apartado Postal 428, Toluca, Edo. de México CP 50000, Mexico

Abstract—Aquaporin 1 (AQP1) is a member of a family of small, integral membrane water-transporting proteins, which facilitate water movement across cell membranes in response to osmotic gradients. Several papers have studied the expression and function of the AQPs in the central nervous system. However, little is known about the AQPs in the peripheral nervous system (PNS). In the PNS, AQP1, AQP2 and AQP4 have been reported in both peripheral neurons and glial cells. In this work we studied the expression and localization of AQP1 in the rat sciatic nerve. We found that from the four AQPs we studied (AQP1, AQP2, AQP4 and AQP9) only AQP1 is expressed in the nerve by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). AQP1 is also observed at the protein level by Western blot analysis. We also studied the localization of AQP1 in the sciatic nerve by immunohistochemistry. The results show that AQP1 is present in both myelinating and non-myelinating Schwann cells. In myelin internodes AQP1 is enriched in the Schmidt–Lanterman incisures and in some internodes it is also present in the abaxonal membrane. At the nodes of Ranvier, AQP1 co-localizes with actin in the paranodal regions of the nerve. Therefore, AQP1 might play an important role in myelin homeostasis maintaining the thermodynamic equilibrium across the plasma membrane in myelinated axons during electrical activity. Also the expression of AQP1 in non-myelinating Schwann cells supports the involvement of AQP1 in pain perception. © 2014 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Key words: Schwann cells, peripheral nervous system, nodes of Ranvier, axon–glia interaction, myelinated peripheral nerve, myelin.

*Corresponding author. Tel: +52-722-174-1882, +52-722-270-2899x222; fax: +52-722-217-4142.

E-mail address: md@uaemex.mx (M. A. R. Dent).

Abbreviations: AQP, aquaporin; DAB, 3,3'-diaminobenzidine; DRG, dorsal root ganglia; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; EGTA, ethylene glycol tetraacetic acid; GFAP, glial fibrillary acidic protein; MBP, myelin basic protein; PBS-A, Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ free phosphate-buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; PNS, peripheral nervous system; RT-PCR, reverse transcription polymerase chain reaction; SDS, sodium dodecyl sulfate; SLI, Schmidt–Lanterman incisures; TBST, Tris-buffered saline with Tween 20.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.10.060>
0306-4522/© 2014 IBRO. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

INTRODUCTION

There are two types of glial cells in the peripheral nerves myelinating Schwann cells and non-myelinating Schwann cells. The axons exhibit an intimate anatomical and functional relationship with myelinating glia, establishing a 1:1 relationship (Jessen and Mirsky 2005, 2010). Myelinating Schwann cells have unique structural and molecular adaptations that promote saltatory conduction and exhibit a striking radial and longitudinal polarity that is essential for impulse propagation. This domain organization can be divided in compact myelin and non-compact myelin regions of specialized junctions between the layer of the myelin lamellae, which correspond to the abaxonal and adaxonal membranes and the Schmidt–Lanterman incisures (SLI), and the domains at the nodes of Ranvier the nodal, paranodal and juxtaparanodal regions (Arroyo and Scherer, 2007; Buttermore et al., 2013). This domain organization is crucial for axon function and integrity and its disruption seems to be important in myelin disorders. Along the internode are cytoplasmic channels known as SLI spiraling within the myelin sheath that provide a conduit between the inner and outer cytoplasmic compartments. The role of the SLI is unknown, but it has been proposed that they act as highways for transport of metabolic substances (Martini, 2005). Also, at the bilateral ends of myelin there are the paranodal axoglial junctions which attach the sheath to the axon at each end of each myelin segment (Rosenbluth, 2009). There are several proteins present in both the SLI and the paranodal region, these include F-actin, spectrin and myelin-associated glycoprotein (MAG) (Trapp et al., 1989), GAP junctions (Balice-Gordon et al., 1998; Meier et al., 2004), E-cadherin (Tricaud et al., 2005), protein 4.1G (Ohno et al., 2006), IP3 receptors (Martínez-Gómez and Dent, 2007; Toews et al., 2007), Necl4 (Spiegel et al., 2007), annexin II (Hayashi et al., 2007) among others, suggesting the importance of these molecules for the stabilization and function of myelin in the peripheral nervous system (PNS). Also, it has been shown that Po myelin protein is required for and can induce the formation of SLI (Yin et al., 2008).

Aquaporins (AQPs) are a family of water-selective channels found in prokaryotes and eukaryotes implicated in mediating bidirectional movement of water across cell membranes in response to osmotic gradients. There are at least 13 different members of the AQP protein family described in mammals. In the nervous system, the studies on the expression and

IX. ANEXO II

Journal of Neuroscience Methods 304 (2018) 46–51



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Neuroscience Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jneumeth



A novel histochemical method of simultaneous detection by a single- or double-immunofluorescence and Bielschowsky's silver staining in teased rat sciatic nerves



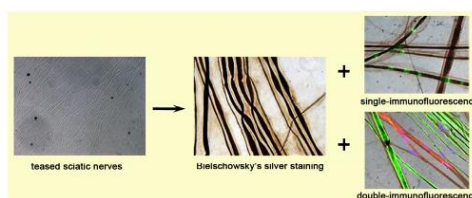
Edith Segura-Anaya, Rommel Flores-Miranda, Alejandro Martínez-Gómez, Myrna A.R. Dent*

Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Tollocan y Jesús Carranza, Toluca, Edo. de México, CP 50180, Mexico

HIGHLIGHTS

- Teased sciatic nerves were stained with Bielschowsky's silver staining method (BSSM).
- BSSM is useful for the study of normal and pathological morphology of nerve fibers.
- Simultaneous BSSM and single-immunofluorescence was performed in teased nerves.
- Simultaneous BSSM and double-immunofluorescence was performed in teased nerves.
- This method is useful for the study of molecular nerve organization.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:
Received 26 February 2018
Received in revised form 17 March 2018
Accepted 17 March 2018
Available online 27 March 2018

Keywords:
Silver staining
Schwann cells
Peripheral nervous system
Nodes of Ranvier
Axon-glia interaction
Myelin

ABSTRACT

Background: The Golgi silver method has been widely used in neuroscience for the study of normal and pathological morphology of neurons. The method has been steadily improved and Bielschowsky's silver staining method (BSSM) is widely used in various pathological conditions, like Alzheimer's disease.

New method: In this work, teased sciatic nerves were silver impregnated using BSSM. We also developed simultaneous staining by silver impregnation and single- or double-immunofluorescence of the same section in teased nerve preparations. We immunostained against non-myelinating Schwann cells and different myelinating Schwann cell domains.

Results: BSSM teased nerves show a strong staining of axons (black) and a gold-brown staining of myelinating and non-myelinating Schwann cells. We were also able to stain by immunofluorescence these BSSM teased nerves with specific molecular markers against non-myelinating Schwann cells, also against non-compact myelin such as the Schmidt-Lanterman incisures or paranodal regions and compact myelin, but not axons.

Abbreviations: PBS-A, Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ free phosphate buffered saline; GFAP, glial fibrillary acidic protein; MBP, myelin basic protein; AQP1, aquaporin 1; NF200, neurofilament heavy polypeptide 200 kDa.

* Corresponding author.

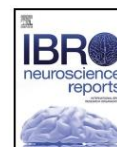
E-mail addresses: segura.edith@gmail.com (E. Segura-Anaya), rommel.flores@infcto.mx (R. Flores-Miranda), amartinezgo@uaemex.mx (A. Martínez-Gómez), md@uaemex.mx (M.A.R. Dent).

<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2018.03.007>
0165-0270/© 2018 Published by Elsevier B.V.



Contents lists available at ScienceDirect

IBRO Neuroscience Reports

journal homepage: www.sciencedirect.com/journal/IBRO-Neuroscience-Reports

Differences in the localization of AQP1 and expression patterns of AQP isoforms in rat and mouse sciatic nerve and changes in rat AQPs expression after nerve crush injury

Edith Segura-Anaya, Alejandro Martínez-Gómez, Myrna A.R. Dent*

Laboratorio de Neurociencias, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Tollocan y Jesús Carranza, Toluca, Edo. de México CP 50180, México

ARTICLE INFO

Keywords:
Peripheral nervous system
Aquaporins
Wallerian degeneration
Remak cells
Schwann cells
Nerve injury

ABSTRACT

In the peripheral nervous system aquaporins (AQPs) have been reported in both peripheral neurons and glial cells. Previously we described the precise localization of AQP1 in the rat sciatic nerve, which is present in both Remak and myelin Schwann cells, and is enriched in the Schmidt-Lanterman incisures. In this work, we found that AQP1 in mouse is only present in Remak cells, showing a different localization between these species. However, after nerve crush injury the level of AQP1 mRNA expression remains constant at all times studied in rat and mouse. We then performed RT-PCR of nine AQP (AQP1–9) isoforms from rat and mouse sciatic nerve, we found that in rat only five AQPs are present (AQP1, AQP4, AQP5, AQP7 and AQP9), whereas in mouse all AQPs except AQP8 are expressed. Then, we studied the expression by RT-PCR of AQPs in rat after nerve crush injury, showing that AQP1, AQP4 and AQP7 expression remain constant at all times studied, while AQP2, AQP5 and AQP9 are upregulated after injury. Therefore, these two closely related rodents show different AQP1 localization and have different AQPs expression patterns in the sciatic nerve, possibly due to a difference in the regulation of these AQPs. The expression of AQP1 in Remak cells supports the involvement of AQP1 in pain perception. Also, in rat the upregulation of AQP2, AQP5 and AQP7 after nerve injury suggests a possible role for these AQPs in promoting regeneration following injury.

1. Introduction

In the peripheral nervous system (PNS) there are a number of distinct glial cells. In peripheral nerve trunks, axons are ensheathed by non-myelinating or myelinating Schwann cells. Remak fibers grouped unmyelinated small-caliber C nociceptor fiber axons, which are enfolded by non-myelin Schwann cells or Remak cells processes. Each axon is sunk into an individual mesoaxon and each Remak fiber bundle is surrounded by basal lamina (Griffin and Thompson, 2008). Remak fibers have been associated with pain perception mainly due to the activation of nociceptor receptors in the primary afferent fibers, stimulated by thermal, mechanical or chemical stimuli (Yam et al., 2018). Myelin Schwann cells have an intimate relationship with axons, establishing a 1:1 relationship forming an internode and promoting saltatory conduction. Myelinated axons are organized in a series of distinct sub-domains, each internode exhibits a striking longitudinal (from node to

node) and radially (from the axon to the basal lamina) polarity that is essential for nerve impulse propagation (Pereira et al., 2012; Salzer et al., 2008; Salzer, 2015). This domain organization can be divided in compact myelin and non-compact myelin regions of specialized junctions between the layer of the myelin lamellae, which correspond to the abaxonal and adaxonal membranes. Along the internode are cytoplasmic pockets spiraling within the myelin known as Schmidt-Lanterman incisures (SLI) that provide a conduit between the inner and outer cytoplasm compartments, although the role of SLI is unknown. The adaxonal membrane and the axolemma are further organized into a series of distinct domains at the nodes of Ranvier: the nodal, paranodal and juxtapanodal regions. This domain organization is crucial for axon function and integrity and its disruption seems to be important in myelin disorders (Buttermore et al., 2013).

When a peripheral nerve is injured a series of events occur referred to as Wallerian degeneration, involving axonal degeneration and myelin

* Corresponding author.

E-mail addresses: eseguraa@uaemex.mx (E. Segura-Anaya), amartinezgo@uaemex.mx (A. Martínez-Gómez), mdent6@gmail.com, md@uaemex.mx (M.A.R. Dent).

<https://doi.org/10.1016/j.ibneur.2021.12.004>

Received 27 September 2021; Received in revised form 14 November 2021; Accepted 16 December 2021

Available online 24 December 2021

2667-2421/© 2021 The Author(s). Published by Elsevier Ltd on behalf of International Brain Research Organization. This is an open access article under the CC

BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Albertini R, Bianchi R. (2010). Aquaporins and Glia. *Curr Neuropharm.* 8:84-91.
- Arroyo EJ, Scherer SS. (2000). On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem Cell Biol.* 113:1-18.
- Arroyo EJ, Scherer SS. (2007). The molecular organization of myelinating Schwann cells. In: Armati PJ, editor. *The biology of Schwann cells.* Cambridge: Cambridge University Press. p. 37–54.
- Arslantunali D, Dursun T, Yucel D, Hasirci N, Hasirci V. (2014). Peripheral nerve conduits: technology update. *Med devices.* 7:405-24.
- Arthur-Farraj PJ, Latouche M, Wilton DK, Quintes S, Chabrol E, Banerjee A, Jessen KR. (2012). C-Jun reprograms Schwann cells of injured nerves to generate a repair cell essential for regeneration. *Neuron.* 75, 633–647.
- Badaut J, Fukuda AM, Jullienne A, Petry KG. (2014). Aquaporin and brain diseases. *Biochim Biophys Acta.* 1840:1554–1565.
- Balice-Gordon RJ, Bone LJ, Scherer SS. (1998). Functional gap junctions in the Schwann cell myelin sheath. *J Cell Biol.* 142:1095–1104.
- Bauer, S., Kerr, B. J., Patterson, P. H. (2007). The neuropoietic cytokine family in development, plasticity, disease and injury. *Nat Rev Neurosci.* 8: 221–232.
- Belin S, Zuloaga KL, Poitelon Y. (2017). Influence of mechanical stimuli on Schwann cell biology. *Front Cell Neurosci* 11:347.
- Benga G. (2009). Water channel proteins (later called aquaporins) and relatives: past, present, and future. *IUBMB Life.* 61:112-33
- Bennett V, Lambert S. (1999). Physiological roles of axonal ankyrins in survival of premyelinated axons and localization of voltage-gated sodium channels. *J Neurocytol.* 28:303-18.
- Berger BL, Gupta R. (2006). Demyelination secondary to chronic nerve compression injury alters Schmidt–Lanterman incisures. *J Anat.* 209:111–118.
- Bestetti S, Galli M, Sorrentino I, Pinton P, Rimessi A, Sitia R, Medraño-Fernandez I. (2020). Human aquaporin-11 guarantees efficient transport of H₂O₂ across the endoplasmic reticulum membrane. *Redox Biol.* 28:101326.
- Bhatheja K, Field J. (2006). Schwann cells: origins and role in axonal maintenance and regeneration. *Int J Biochem Cell Biol.* 38:1995-9.
- Bijkerk R, Trimpert C, van Solingen C, de Bruin RG, Florijn BW, Kooijman S, van den Berg R, van der Veer EP, Bredewold EOW, Rensen PCN, Rabelink TJ, Humphreys BD, Deen PMT, van Zonneveld AJ. (2018). MicroRNA-132 controls water homeostasis through regulating MECP2-mediated vasopressin synthesis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 315:F1129-F1138.

- Boerboom A, Dion V, Chariot A, Franzen R. (2017). Molecular mechanisms involved in Schwann cell plasticity. *Front. Mol. Neurosci.* 10:38.
- 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* 449:183–188.
- Buffoli B, Borsani E, Rezzani R, Rodella LF. (2009). Chronic constriction injury induces aquaporin-2 expression in the dorsal root ganglia of rats. *J Anat* 215:498–505.
- Bunge MB, Clark MB, Dean AC, Eldridge CF, Bunge RP. (1990). Schwann cell function depends upon axonal signals and basal lamina components. *Ann N Y Acad Sci.* 580:281-287.
- Burnett MG, Zager EL. (2004). Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurg Focus.* 16:E1.
- Butler TL, Au CG, Yang B, Egan JR, Tan YM, Hardeman EC, North KN, Verkman AS, Winlaw DS. (2006). Cardiac aquaporin expression in humans, rats and mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:H705-713.
- Caldwell JH, Schaller KL, Lasher RS, Peles E, Levinson SR. (2000). Sodium channel Na(v)1.6 is localized at nodes of Ranvier, dendrites, and synapses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:5616-20.
- Carbrey JM, Agre P. (2009). Discovery of the aquaporins and development of the field. *Handb Exp Pharmacol.* 190:3-28.
- Cattin AL, Burden JJ, Van Emmenis L, Mackenzie FE, Hoving JJ, Garcia Calavia N, Guo Y, McLaughlin M, Rosenberg LH, Quereda V, Jamecna D, Napoli I, Parrinello S, Enver T, Ruhrberg C, Lloyd AC. (2015). Macrophage-induced blood vessels guide Schwann cell-mediated regeneration of peripheral nerves. *Cell.* 162:1127-39.
- Coleman MP, Perry VH. (2002). Axon pathology in neurological disease: a neglected therapeutic target. *Trends Neurosci.* 25:532-7.
- Conner AC, Bill RM, Conner MT. (2013). An emerging consensus on aquaporin translocation as a regulatory mechanism. *Mol Membr Biol* 30:101-112.
- 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.* 287:11516-25.
- Court FA, Sherman DL, Pratt T, Garry EM, Ribchester RR, Cottrell DF, Fleetwood-Walker SM, Brophy PJ. (2004). Restricted growth of Schwann cells lacking Cajal bands slows conduction in myelinated nerves. *Nature.* 431:191-5.
- Denker BM, Smith BL, Kuhajda FP, Agre P. (1988). Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J Biol Chem.* 263:15634–15642.
- Dodd J, Jessell TM. (1988). Axon guidance and the patterning of neuronal projections in vertebrates. *Science.* 242:692–699.

- Dubový P. (2011). Wallerian degeneration and peripheral nerve conditions for both axonal regeneration and neuropathic pain induction. *Ann Anat.* 193:267-75.
- Eidsvaag VA, Enger R, Hansson H-A, Eide PK, Nagelhus EA. (2017). Human and mouse cortical astrocytes differ in aquaporin-4 polarization toward microvessels. *Glia* 65:964–973.
- Elkjaer M, Vajda Z, Nejsum LN, Kwon T, Jensen UB, Amiry-Moghaddam M, Frøkiaer J, Nielsen S. (2000). Immunolocalization of AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 276:1118-28.
- Einheber S, Milner TA, Giancotti F, Salzer JL. (1993). Axonal regulation of Schwann cell integrin expression suggests a role for alpha 6 beta 4 in myelination. *J Cell Biol.* 123:1223-1236.
- English, A. (2021). Axon Regeneration in Peripheral Nerves. *Oxford Research Encyclopedia of Neuroscience.* pp: 1-31.
- Eshed-Eisenbach Y, Peles E. (2013). The making of a node: a co-production of neurons and glia. *Curr Opin Neurobiol.* 23:1049-56.
- Feltri ML, Poitelon Y, Previtali SC. (2016). How Schwann Cells Sort Axons: New Concepts. *Neuroscientist* 3:252-265.
- Frick A, Eriksson UK, de Mattia F, Oberg F, Hedfalk K, Neutze R, de Grip WJ, Deen PM, Tornroth-Horsefield S. (2014). X-ray structure of human aquaporin 2 and its implications for nephrogenic diabetes insipidus and trafficking. *Proc Natl Acad Sci USA.* 111:6305-6310.
- Fu D, Libson A, Miercke LJ, Weitzman C, Nollert P, Krucinski J, Stroud RM. (2000). Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science.* 290:481-6.
- Fu SY, Gordon T. (1997). The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol.* 14:67-116.
- 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.
- Gao J, Tan M, Gu M, Marshall C, Ding J, Hu G, Xiao M. (2012). Cellular localization of aquaporin-1 in the human and mouse trigeminal systems. *PLoS ONE.* 7:e46379.
- Gaudet AD, Popovich PG, Ramer MS. (2011). Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation.* 8:110.
- Gazerani P. (2017). Aquaporins in peripheral nociception. *Future Neurol.* 12:1-4.
- Geuna S, Raimondo S, Ronchi G, Di Scipio F, Tos P, Czaja K, Fornaro M. (2009). Histology of the peripheral nerve and changes occurring during nerve regeneration. *Int Rev Neurobiol.* 87:27-46.
- Gerber D, Pereira JA, Gerber J, Tan G, Dimitrieva S, Yángüez E, Suter U. (2021). Transcriptional profiling of mouse peripheral nerves to the single-cell level to build a sciatic nerve Atlas (SNAT). *Elife.* 10:e58591.

- Ghabriel MN, Allt G. (1979). The role of Schmidt-Lanterman incisures in Wallerian degeneration. I. A quantitative teased fibre study. *Acta Neuropathol.* 48:93-93.
- Gomes A, da Silva IV, Rodrigues CM, Castro RE, Soveral G. (2018). The emerging role of microRNAs in aquaporin regulation. *Front Chem.* 6:238.
- Gomez-Sanchez JA, Pilch KS, van der Lans M, Fazal SV, Benito C, Wagstaff LJ, Mirsky R, Jessen KR. (2017). After nerve injury, lineage tracing shows that myelin and remak Schwann cells elongate extensively and branch to form repair Schwann cells, which shorten radically on remyelination. *J Neurosci.* 37:9086-9099.
- Goodman CS. (1996). Mechanisms and molecules that control growth cone guidance. *Annu Rev Neurosci.* 19:341-77.
- Gorelick DA, Praetorius J, Tsunenari T, Nielsen S, Agre P. (2006). Aquaporin-11: a channel protein lacking apparent transport function expressed in brain. *BMC Biochem.* 7:14.
- Griffin JW, Thompson WJ. (2008). Biology and pathology of nonmyelinating Schwann cells. *Glia* 56:1518-1531.
- Hess A, Young JZ. (1957). The nodes of Ranvier. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 140:301-20.
- Hiscoe HB. (1947). Distribution of nodes and incisures in normal and regenerated nerve fibers. *Anat Rec.* 99:447-75.
- Holmes W. (1943). Silver staining of nerve axons in paraffin sections. *Anat. Rec.* 86, 157-187.
- Jessen KR, Arthur-Farraj P. (2019). Repair Schwann cell update: Adaptive reprogramming, EMT, and stemness in regenerating nerves. *Glia.* 67:421-437.
- Jessen KR, Mirsky R. (2005). The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci.* 6:671-82.
- Jessen KR, Mirsky R. (2008). Negative regulation of myelination: relevance for development, injury, and demyelinating disease. *Glia* 56:1552-65.
- Jessen KR, Mirsky R. (2010). Control of Schwann cell myelination. *Biol Rep.* 2:1-4.
- Jessen KR, Mirsky R, Lloyd AC. (2015). Schwann cells: development and role in nerve repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 7:a020487.
- Jessen KR, Mirsky R. (2016). The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *J Physiol.* 594:3521-31.
- Jessen KR, Mirsky R. (2019). The success and failure of the Schwann cell response to nerve injury. *Front Cell Neurosci.* 13:33.
- 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.* 31:2009-2015.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ. (2012). Principles of Neural Science, Fifth Edition. McGraw Hill Professional.

Kato J, Takai Y, Kato Hayashi M, Kato Y, Tanaka M, Sohma Y, Abe Y, Yasui M. (2014). Expression and localization of aquaporin-4 in sensory ganglia. *Bioch Bioph Res Comm.* 451:562-567.

Kaya Y, Ozsoy U, Demir N, Hizay A, Bilkem Suzen L, Angelov DN, Sarikcioglu L. (2014). Temporal and spatial distribution of the aquaporin 1 in spinal cord and dorsal root ganglia after traumatic injuries of the sciatic nerve. *Childs Nerv Syst.* 30:1679-1686.

King LS, Kozono D, Agre P. (2004). From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:687-98.

King LS, Yasui M. (2002). Aquaporins and disease: lessons from mice to humans. *Trends Endocrinol Metab.* 13:355-60.

Koike S, Tanaka Y, Matsuzaki T, Morishita Y, Ishibashi K. (2016). Aquaporin-11 (AQP11) Expression in the Mouse Brain. *Int J Mol Sci.* 17:861.

Krane CM, Fortner CN, Hand AR, McGraw DW, Lorenz JN, Wert SE, Towne JE, Paul RJ, Whitsett JA, Menon AG. (2001). Aquaporin 5-deficient mouse lungs are hyperresponsive to cholinergic stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:14114-9.

Krause TL, Fishman HM, Ballinger ML, Bittner GD. (1994). Extent and mechanism of sealing in transected giant axons of squid and earthworms. *J Neurosci.* 14:6638-51.

Kreida S, Törnroth-Horsefield S. (2015). Structural insights into aquaporin selectivity and regulation. *Curr Opin Struct Biol.* 33:126-34.

Krystosek A, Seeds NW. (1981). Plasminogen activator release at the neuronal growth cone. *Science.* 213:1532-4.

Li C, Wang W. (2017). Molecular Biology of Aquaporins. *Adv Exp Med Biol.* 969:1-34.

Li S, Li C, Wang W. (2020). Molecular aspects of aquaporins. *Vitam Horm.* 113:129-181.

Lim EF, Nakanishi ST, Hoghooghi V, Eaton SE, Palmer AL, Frederick A, Stratton JA, Stykel MG, Whelan PJ, Zochodne DW, Biernaskie J, Ousman SS. (2017). AlphaB-crystallin regulates remyelination after peripheral nerve injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 114:E1707-E1716.

López-Domínguez A y Pasantes H. (2009). Acuaporinas y edema cerebral. *REB* 28:132-140.

Lubinska L. (1977). Early course of Wallerian degeneration in myelinated fibers of the rat phrenic nerve. *Brain Res.* 130:47-63.

Ma T, Gao H, Fang X, Yang H. (2012). Water channel proteins in the peripheral nervous system in health and disease. *Mol Asp Med.* 33:605-611.

Manley GT, Fujimura M, Ma T, Noshita N, Filiz F, Bollen AW, Chan P, Verkman AS. (2000). Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med.* 6:159-63.

- Martínez-Gómez A, Dent MAR. (2007). Expression of IP3 receptor isoforms at the nodes of Ranvier in rat sciatic nerve. *Neuroreport*. 18:447–450.
- Martini R. (2005). Schwann cells and myelin. In: Kettenmann H, Ransom BR, editors. *Neuroglia*. New York: Oxford University Press. pp. 48–59.
- Matsumoto I, Nagamatsu N, Arai S, Emori Y, Abe K. (2004). Identification of candidate genes involved in somatosensory functions of cranial ganglia. *Brain Res Mol Brain Res*. 126:98-102.
- Meier C, Dermietzel R, Davidson KGV, Yasumura Th, 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.
- Menorca RM, Fussell TS, Elfar JC. (2013). Nerve physiology: mechanisms of injury and recovery. *Hand Clin*. 29:317-330.
- Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B, Birchmeier C, Role L, Lai C, Schwab MH, Nave KA. (2004). Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science*. 304:700–703.
- Mobasheri A, Wray S, Marples D. (2005). Distribution of AQP2 and AQP3 water channels in human tissue microarrays. *J Mol Histol*. 36:1-14.
- Morishita Y, Sakube Y, Sasaki S, Ishibashi K. (2004). Molecular mechanisms and drug development in aquaporin water channel diseases: aquaporin superfamily (superaquaporins): expansion of aquaporins restricted to multicellular organisms. *J Pharmacol Sci*. 96:276-9.
- Morrel P, Quarles RH, Norton WT. (1989). Formation structure and biochemistry of myelin. In *Basic Neurochemistry Text*, Fourth edition, Raven Press.
- Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A, Fujiyoshi Y. (2000). Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*. 407(6804):599-605.
- Nagahama M, Ma N, Semba R, Naruse S. (2006). Aquaporin 1 immunoreactive enteric neurons in the rat ileum. *Neurosci Lett*. 395:206–210.
- Nandasena BG, Suzuki A, Aita M, Kawano Y, Nozawa-Inoue K, Maeda T. (2007). Immunolocalization of aquaporin-1 in the mechanoreceptive Ruffini endings in the periodontal ligament. *Brain Res* 1157:32–40.
- Nave KA. (2010). Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature*. 468:244-52.
- Nave KA, Werner HB. (2014). Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30:503-33.
- Nemeth-Cahalan KL, Clemens DM, Hall JE. (2013). Regulation of AQP0 water permeability is enhanced by cooperativity. *J Gen Physiol*. 141:287-295.
- Nesic O, Guest JD, Zivadinovic D, Narayana PA, Herrera JJ, Grill RJ, Mokkaapati VUL, Gelman BB, Lee J. (2010). Aquaporins in spinal cord injury: the janus face of AQP4. *Neuroscience*. 168:1019–1035.

- Nesverova V, Thörnroth-Horsefield S. (2019). Phosphorylation-dependent regulation of mammalian aquaporins. *Cells* 8:82.
- Okłinski MK, Choi H-J, Kwon T-H. (2015). Peripheral nerve injury induces aquaporin-4 expression and astrocytic enlargement in spinal cord. *Neuroscience* 311:138-152.
- Oshio K, Binder DK, Yang B, Schechter S, Verkman AS, Manley GT. (2004). Expression of aquaporin water channels in mouse spinal cord. *Neuroscience* 127:685-693.
- 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.
- Papadopoulos MC, Manley GT, Krishna S, Verkman AS. (2004). Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *FASEB J*. 18:1291-1293.
- Papadopoulos MC, Verkman AS. (2013). Aquaporin water channels in the nervous system. *Nature Rev Neurosci*. 14: 265-277.
- Park HT, Kim JK, Tricaud N. (2019). The conceptual introduction of the "demyelinating Schwann cell" in peripheral demyelinating neuropathies. *Glia*. 67:571-581.
- Pereira J.A., Lebrun-Julien F, Suter U. (2012). Molecular mechanisms regulating myelination in the peripheral nervous system. *Trends Neurosci*. 35:123-134.
- Pettersson CA, Tengvar C. (1986). Formation of oedema in transected rat sciatic nerve. A microgravimetric study. *Acta Neuropathol*. 70:177-84.
- Poliak S, Peles E. (2003). The local differentiation of myelinated axons at nodes of Ranvier. *Nat Rev Neurosci*. 12:968-80.
- Potokar M, Jorgačevski J, Zorec R. (2016). Astrocyte aquaporin dynamics in health and disease. *Int J Mol Sci*. 17:1121.
- Ramón y Cajal S. (1928). *Degeneration & Regeneration of the Nervous System*. In *Cajal's degeneration & regeneration of the nervous system*. 1991. (DeFelipe J and Jones EG eds), pp 55-60. Oxford University Press, Oxford, New York.
- Reynolds RJ, Heath JW. (1995). Patterns of morphological variation within myelin internodes of normal peripheral nerve: quantitative analysis by confocal microscopy. *J Anat*. 187:369-378.
- Rivas MP, Chavira RCT, Ortiz HR. (2014). Adaptación de la técnica de impregnación argéntica de Llobart para la demostración de fibras nerviosas, en cualquier tejido en cortes por parafina. *Int J Morphol*. 32:973-980.
- Roche JV, Törnroth-Horsefield S. (2017). Aquaporin Protein-Protein Interactions. *Int J Mol Sci*. 18:2255.

- Rosenbluth J. (2009). Multiple functions of the paranodal junction of myelinated nerve fibers. *J Neurosci Res.* 87:3250–3258.
- Rotshenker S. (2011). Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. *J Neuroinflammation* 8:109.
- Salzer JL. (2003). Polarized domains of myelinated axons. *Neuron.* 40:297-318.
- Salzer JL, Brophy PJ, Peles E. (2008). Molecular domains of myelinated axons in the peripheral nervous system. *Glia.* 56:1532-40.
- Salzer JL. (2015). Schwann cell myelination. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 7:a020529
- Salzer JL, Zalc B. (2016). Myelination. *Curr Biol.* 26:R971-R975.
- Sánchez JC. (2003). Acuaporinas: proteínas mediadoras del transporte de agua. *Colomb Med.* 34:220-227.
- Scherer SS, Arroyo EJ. (2002). Recent progress on the molecular organization of myelinated axons. *J Peripher Nerv Syst.* 7:1-12.
- Scherer SS, Xu T, Crino P, Arroyo EJ, Gutmann DH. (2001). Ezrin, radixin, and moesin are components of Schwann cell microvilli. *J Neurosci Res.* 65:150-64.
- Schröder JM. (1972). Altered ratio between axon diameter and myelin sheath thickness in regenerated nerve fibers. *Brain Res.* 45:49-65.
- Seddon HJ. (1943). Three types of nerve injury. *Brain.* 66:237–288.
- Segura-Anaya E, Martínez-Gómez A, Dent MAR. (2015). Localization of aquaporin 1 water channel in the Schmidt-Lanterman incisures and the paranodal regions of the rat sciatic nerve. *Neuroscience.* 285:119-127.
- Segura-Anaya E, Flores-Miranda R, Martínez-Gómez A, Dent MAR. (2018). A novel histochemical method of simultaneous detection by a single- or double-immunofluorescence and Bielschowsky's silvers staining in teased rat sciatic nerve. *J Neurosci Meth.* 304:46-51.
- Segura-Anaya E, Martínez-Gómez A, Dent MAR. (2021). Differences in the localization of AQP1 and expression patterns of AQP isoforms in rat and mouse sciatic nerve and changes in rat AQPs expression after nerve crush injury. *IBRO Neurosci Rep.* 12:82-89.
- Sepramaniam S, Armugam A, Lim KY, Karolina DS, Swaminathan P, Tan JR, Jeyaseelan K. (2010). MicroRNA 320a functions as a novel endogenous modulator of aquaporin 1 and 4 as well as a potential therapeutic target in cerebral ischemia. *J Biol Chem.* 285:29223–29230.
- Shields SD, Mazario J, Skinner K, Basbaum AI. (2007). Anatomical and functional analysis of aquaporin 1, a water channel in primary afferent neurons. *Pain.* 131:8–20.
- Simons M, Misgeld T, Kerschensteiner M. (2014). A unified cell biological perspective on axon-myelin injury. *J Cell Biol.* 206:335-45.

- Simons M, Trotter J. (2007). Wrapping it up: the cell biology of myelination. *Curr Opin Neurobiol.* 17:533-540.
- Sjöhamn J, Hedfalk K. (2014). Unraveling aquaporin interaction partners. *Biochim Biophys Acta.* 1850:1614-23.
- Somogyi P, Freund TF, Wu JY, Smith AD. (1983). The section-Golgi impregnation procedure 2. Immunocytochemical demonstration of glutamate decarboxylase in Golgi-impregnated neurons and in their afferent synaptic boutons in the visual cortex of the cat. *Neuroscience.* 9:475–490
- Stoll G, Müller HW. (1999). Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol.* 9:313–325.
- Sui H, Han BG, Lee JK, Walian P, Jap BK. (2001). Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature.* 414:872-8.
- Suzuki H, Oku H, Horie T, Morishita S, Tonari M, Oku K, Okubo A, Kida T, Mimura M, Fukumoto M, Kojima S, Takai S, Ikeda T. (2014). Changes in expression of aquaporin-4 and aquaporin-9 in optic nerve after crushing in rats. *PloS one.* 9:e114694.
- Tanaka J, Sobue K. (1994). Localization and characterization of gelsolin in nervous tissues: gelsolin is specifically enriched in myelin-forming cells. *J Neurosci.* 14:1038-52.
- Tenckhoff S, Hollborn M, Kohen L, Wolf S, Wiedemann P, Bringmann A. (2005). Diversity of aquaporin mRNA expressed by rat and human retinas. *Neuroreport.* 16:53-6.
- Thi MM, Spray DC, Hanani M. (2008). Aquaporin-4 water channels in enteric neurons. *J Neurosci Res.* 86:448–456.
- Thrane AS, Rappold PM, Fujita T, Torres A, Bekar LK, Takano T, Peng W, Wang F, Rangroo Thrane V, Enger R, Haj-Yasein NN, Skare Ø, Holen T, Klungland A, Ottersen OP, Nedergaard M, Nagelhus EA. (2011). Critical role of aquaporin-4 (AQP4) in astrocytic Ca²⁺ signaling events elicited by cerebral edema. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108:846-51.
- Torres-Fernández O. (2006). La técnica de impregnación argéntica de Golgi. Conmemoración del centenario del premio nobel de Medicina (1906) compartido por Camillo Golgi y Santiago Ramón y Cajal. *Biomédica.* 26:498-508
- Traka M, Goutebroze L, Denisenko N, Bessa M, Nifli A, Havaki S, Iwakura Y, Fukamauchi F, Watanabe K, Soliven B, Girault JA, Karagogeos D. (2003). Association of TAG-1 with Caspr2 is essential for the molecular organization of juxtaparanodal regions of myelinated fibers. *J Cell Biol.* 162:1161-72.
- Trapp BD. (1990). Myelin-associated glycoprotein. Location and potential functions. *Ann N Y Acad Sci.* 605:29-43.
- Trapp BD, Andrews SB, Wong A, O'Connell M, Griffin JW. (1989). Co-localization of the myelin-associated glycoprotein and the microfilament components, F-actin and spectrin, in Schwann cells of myelinated nerve fibres. *J Neurocytol.* 18:47–60.

Tricaud N, Perrin-Tricaud C, Brusés JL, Rutishauser U. (2005). Adherens junctions in myelinating Schwann cells stabilize Schmidt-Lanterman incisures via recruitment of p120 catenin to E-cadherin. *J Neurosci.* 25:3259-69.

Uchihara T. (2007). Silver diagnosis in neuropathology: principles, practice and revised interpretation. *Acta Neuropathol.* 113:483-99.

Valakh V, Frey E, Babetto E, Walker LJ, DiAntonio A. (2015). Cytoskeletal disruption activates the DLK/JNK pathway, which promotes axonal regeneration and mimics a preconditioning injury. *Neurobiol Dis.* 77:13-25.

Vargas ME, Barres BA. (2007). Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow? *Annu Rev Neurosci.* 30:153-79.

Verkman AS. (2008). Mammalian aquaporins: diverse physiological roles and potential clinical significance. *Expert Rev Mol Med.* 10:e13.

Verkman AS. (2012). Aquaporins in clinical medicine. *Annu Rev Med.* 63:303-16.

Verkman AS, Anderson MO, Papadopoulos MC. (2014). Aquaporins: important but elusive drug targets. *Nat Rev Drug Discov.* 13:259-77.

Wang H, Fang F, Yi J, Xiang Z, Sun M, Jiang H. (2012). Establishment and assessment of the perinatal mouse facial nerve axotomy model via a subauricular incision approach. *Exp Biol Med (Maywood)* 237: 1249–1255

Wang Y, Wang H, Mi D, Gu X, Hu W. (2015). Periodical assessment of electrophysiological recovery following sciatic nerve crush via surface stimulation in rats. *Neurol Sci.* 36:449-56.

Wang Y, Shan Q, Pan J, Yi S. (2018). Actin cytoskeleton affects Schwann cell migration and peripheral nerve regeneration. *Front Physiol.* 9:23.

Xu GY, Wang F, Jiang X, Tao J. (2010). Aquaporin 1, a potential therapeutic target for migraine with aura. *Mol Pain.* 6:68.

Xu M, Xiao M, Li S, Yang B. (2017). Aquaporins in nervous system. *Adv Exp Med Biol.* 969:81–103.

Yam MF, Loh YC, Tan CS, Khadijah AS, Abdul MN, Basir R. (2018). General pathways of pain sensation and the major neurotransmitters involved in pain regulation. *Int J Mol Sci.* 19:2164.

Yamamoto N, Yoneda K, Asai K, Sobue K, Tada T, Fujita Y, Katsuya H, Fujita M, Aihara N, Mase M, Yamada K, Miura Y, Kato T. (2001). Alterations in the expression of the AQP family in cultured rat astrocytes during hypoxia and reoxygenation. *Brain Res Mol Brain. Res.* 90:26-38.

Yang HJ, Vainshtein A, Maik-Rachline G, Peles E. (2016). G protein-coupled receptor 37 is a negative regulator of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Nat Commun.* 7:10884.

Yang M, Gao F, Liu H, Yu WH, He GQ, Zhuo F, Qiu GP, Sun SQ. (2011). Immunolocalization of aquaporins in rat brain. *Anat Histol Embryol.* 40:299-306.

- Zacchigna S, Ruiz de Almodovar C, Carmeliet P. (2008). Similarities between angiogenesis and neural development: What small animal models can tell us. *Curr. Top. Dev. Biol.* 80:1–55.
- Zeidel ML, Nielsen S, Smith BL, Ambudkar SV, Maunsbach AB, Agre P. (1994). Ultrastructure, pharmacologic inhibition, and transport-selectivity of aquaporin CHIP in proteoliposomes. *Biochemistry* 33:1606–1615.
- Zelenina M, Zelenin S, Aperia A. (2005). Water channels (aquaporins) and their role for postnatal adaptation. *Pediatr. Res.* 57, 47R–53R.
- Zelenina M. Regulation of brain aquaporins. (2010). *Neurochem Int.* 57:468-88.
- Zhang H, Verkman AS. (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.
- Zhang H, Verkman AS. (2015). Aquaporin-1 water permeability as a novel determinant of axonal regeneration in dorsal root ganglion neurons. *Exp Neurol.* 265:152-159.
- Zhang J, Xiong Y, Lu LX, Wang H, Zhang YF, Fang F, Song YL, Jiang H. (2013). AQP1 expression alterations affect morphology and water transport in Schwann cells and hypoxia-induced up-regulation of AQP1 occurs in a HIF-1a-dependent manner. *Neuroscience* 252:68-79.
- Zochodne DW. (2008). *Neurology of peripheral nerve regeneration.* Cambridge University Press. United Kingdom. p. 11.
- Zuchero JB, Fu MM, Sloan SA, Ibrahim A, Olson A, Zaremba A, Dugas JC, Wienbar S, Caprariello AV, Kantor C, Leonoudakus D, Lariosa-Willingham K, Kronenberg G, Gertz K, Soderling SH, Miller RH, Barres BA. (2015). CNS myelin wrapping is driven by actin disassembly. *Dev Cell.* 34:152-67.