



**Instituto de Biomedicina de Sevilla**

**Departamento de Fisiología Médica y Biofísica**

**Universidad de Sevilla**

**ACUAPORINAS EN DIVERSAS PATOLOGÍAS NEUROLÓGICAS**

**Ismael Sánchez Gomar**

**Trabajo presentado para optar al grado de Doctor por la Universidad de  
Sevilla, 2016.**





D<sup>ª</sup>. Miriam Echevarría Irusta, Profesora Titular de Fisiología, adscrita al Departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA:

Que Ismael Sánchez Gomar ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado: “Acuaporinas en diversas patologías neurológicas” que presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Fdo. D<sup>ª</sup>. Miriam Echevarría Irusta

Sevilla, 19 de Abril de 2016



**Instituto de Biomedicina de Sevilla**

**Hospital Universitario Virgen del Rocío**

Avda. Manuel Siurot s/n, 41013, Sevilla



# ÍNDICE

Contenido	pág.
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>VI</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
1. Acuaporinas .....	3
1.1 Introducción a las acuaporinas (AQPs).....	3
1.2 Clasificación y distribución de las acuaporinas .....	4
1.3 Estructura de las acuaporinas .....	5
1.4 Acuaporinas en el sistema nervioso central (SNC).....	7
1.5 Acuaporina 4 .....	7
1.6 Acuaporina 1 .....	9
1.7 Acuaporina 9 .....	10
1.8 Funciones de las acuaporinas en el SNC .....	11
1.8.1 <i>Movimiento de agua en el cerebro</i> .....	11
1.8.2 <i>Producción de líquido cefalorraquídeo</i> .....	13
1.8.3 <i>Migración de astrocitos</i> .....	14
1.8.4 <i>Neuroexcitación</i> .....	14
2. Patologías del sistema nervioso central asociado a AQPs .....	16
2.1 Edema.....	16
2.2 Tumores cerebrales.....	18
2.3 Epilepsia.....	18
2.4 Neuromielitis óptica .....	19

2.4.1	<i>Introducción</i> .....	19
2.4.2	<i>Clasificación</i> .....	20
2.4.3	<i>Criterios de diagnóstico y características clínicas</i> .....	22
2.4.4	<i>Patogénesis</i> .....	22
2.4.5	<i>Detección de anticuerpos anti-AQP4 (NMO-IgG)</i> .....	26
2.4.6	<i>Tratamiento</i> .....	28
2.4.7	<i>AQP1 en NMOSD</i> .....	29
3.	Hidrocefalia.....	31
3.1	Definición.....	31
3.2	Producción de líquido cefalorraquídeo. Plexo coroideo .....	32
3.3	Papel de las AQPs en hidrocefalia de humano.....	33
	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
1.	Técnicas de cultivo celular .....	42
1.2	Condiciones de cultivo de la línea celular HEK293 (células embrionarias de riñón humano) .....	42
1.3	Cultivo primario de plexo coroideo de rata .....	43
1.3.1	<i>Disección y dispersión de tejido</i> .....	43
1.3.2	<i>Cultivo</i> .....	44
2.	Técnicas de biología molecular.....	46
2.1	Generación de las construcciones del cDNA de AQP4 humana....	46
2.2	Transfecciones de cultivos celulares de HEK 293.....	52

2.3	Cultivos estables HEK293-pEGFP-N <sub>1</sub> -AQP4 .....	53
2.4	Western Blot.....	54
2.4.1	<i>Extracción de proteínas</i> .....	54
2.4.2	<i>Electroforesis SDS-PAGE, transferencia e inmunodetección</i> .....	54
2.5	Análisis de expresión de ARN mensajeros .....	56
2.5.1	<i>Extracción de ARN total</i> .....	56
2.5.2	<i>Retrotranscripción</i> .....	58
2.5.3	<i>PCR cuantitativa o en tiempo real (PCRq)</i> .....	58
3.	ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) .....	61
3.1	ELISA indirecto.....	61
3.1.1	<i>Extracción de proteínas</i> .....	62
3.1.2	<i>Detección de anticuerpos</i> .....	63
3.2	ELISA <i>sándwich</i> .....	65
4.	Animales de experimentación .....	65
4.1	PCR convencional para genotipado de ratones .....	67
4.1.1	<i>Ratones hidrocefálicos hop gait (hyh)</i> .....	67
4.1.2	<i>Ratones AQP1-KO</i> .....	69
4.2	Exposición de ratones a hipoxia e hipercapnia .....	69
4.3	Obtención de tejidos .....	70
5.	Técnicas inmunológicas .....	72
5.1	Inmunohistoquímica.....	72

5.2	Inmunofluorescencia indirecta .....	72
5.3	Inmunofluorescencia indirecta – Método de diagnóstico .....	73
5.3.1	<i>Optimización del método de diagnóstico</i> .....	75
6.	Procesamiento de muestras de pacientes .....	76
7.	Análisis estadístico.....	77
8.	Anexos .....	78
8.1	Consentimiento informado .....	78
8.2	Clasificación de muestras de pacientes .....	82
8.3	Anticuerpos primarios .....	83
8.4	Anticuerpos secundarios .....	84
<b>RESULTADOS</b>	.....	<b>88</b>
1.	Desarrollo de un sistema de diagnóstico para la Neuromielitis óptica..	89
1.1	Detección de anticuerpos anti-AQP4 .....	89
1.2	Verificación del método de diagnóstico.....	92
1.3	Resultados globales por patología .....	94
1.4	Optimización del método de diagnóstico .....	95
1.5	Falsos positivos producidos por tratamiento con natalizumab.....	98
2.	Presencia de anticuerpos anti-AQP1 en suero de pacientes con desordenes que se incluyen dentro del síndrome de la NMO (NMOSD) .....	102
2.1	Detección de anticuerpos anti-AQP1 por inmunofluorescencia.	103
2.2	Detección de anticuerpos anti-AQP1 por ELISA.....	108

3. Estudio de AQPs en líquido cefalorraquídeo de pacientes con hidrocefalia.....	109
4. Estudio de AQP1 en plexo coroideo de ratón .....	112
5. Detección de AQP4 en plexo coroideo de ratón.....	116
6. Exploración de acuaporinas en otras áreas del cerebro de ratón .....	118
7. Estudio de AQPs en cerebro del ratón mutante <i>hyh</i> (hydrocephalus hop gait) .....	120
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>126</b>
1. Desarrollo de sistema de diagnóstico para NMO.....	126
2. Optimización del sistema de diagnóstico.....	128
3. Falsos positivos producidos por Natalizumab .....	129
4. AQP1 como biomarcador de la NMOSD.....	132
5. Papel de las acuaporinas en la hidrocefalia en humanos .....	134
6. Influencia de la hipoxia en acuaporinas del plexo coroideo .....	135
7. Papel de las acuaporinas en cerebro.....	137
8. Papel de AQPs en ratón hidrocefálico <i>hyh</i> .....	138
9. AQP4 en plexo coroideo .....	139
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>143</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>148</b>

## ABREVIATURAS

<b>AQP</b>	Acuaporina
<b>LCR</b>	Líquido cefalorraquídeo
<b>BHE</b>	Barrera hematoencefálica
<b>KO</b>	<i>Knockout</i>
<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>OAPs</b>	<i>Orthogonal arrays of particles</i>
<b>TRPV</b>	<i>Transient receptor potential vanilloid channel</i>
<b>NMO</b>	Neuromielitis óptica
<b>EM</b>	Esclerosis múltiple
<b>NMO-IgG</b>	Anticuerpos IgG anti-AQP4
<b>NMOSD</b>	Espectro clínico de la NMO
<b>HLA</b>	Antígenos leucocitarios humanos
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>EAAT2</b>	<i>Excitatory aminoacid transporter-2</i>
<b>CBA</b>	<i>Cell based assay</i>
<b>TBA</b>	<i>Tissues based assay</i>
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
<b>MOG</b>	Glicoproteína de mielina de oligodendrocitos

<b>VLA-4</b>	<i>Very late antigen 4</i>
<b>EDSS</b>	Escala expandida del estado de discapacidad
<b>RIPA</b>	Radioinmunoprecipitación
<b>Pb</b>	pares de bases
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico



## **INTRODUCCIÓN**



# INTRODUCCIÓN

## 1. Acuaporinas

### 1.1 Introducción a las acuaporinas (AQPs)

El agua es un compuesto esencial para la vida. La mayoría de las moléculas (iones, azúcares, proteínas, etc.) que forman parte de los seres vivos se encuentran disueltos en medio acuoso. Para realizar sus funciones, las células intercambian moléculas con su entorno a través de la membrana, mediante mecanismos de difusión pasiva o mediante proteínas transportadoras específicas.

El agua tiene una carga total neutra por lo que durante muchos años se pensó que su entrada y salida de las células tenía lugar exclusivamente por difusión simple a través de la membrana plasmática. Sin embargo, la difusión pasiva no permitía explicar la permeabilidad al agua de células en los glóbulos rojos o las células del túbulo renal, donde se observó un flujo de agua a través de la membrana en presencia de un gradiente de concentración superior al flujo en ausencia de dicho gradiente. Además, la energía disipada por la interacción entre agua y membrana distaba de la disipada por la difusión simple a través de la membrana y se parecía a la del movimiento del agua en solución libre. Se descubrió también que el paso del agua a través de estas membranas podía bloquearse mediante fármacos derivados de compuestos mercuriales. Poco a poco todas estas evidencias fueron apuntando a la existencia de canales de agua en la bicapa. No

obstante no fue hasta los años noventa cuando, de forma azarosa al purificar la proteína de 32 kDa de la membrana de los eritrocitos responsable del factor Rh, se aisló otra fracción proteica de 28 kDa la cual fue denominada CHIP28, abreviado del inglés *channel-forming integral protein* de 28 kDa, y que más tarde sería denominada como AQP1 (Preston y Agre, 1991). Poco después, se demostró la capacidad de esta proteína para facilitar el transporte de agua a través de la membrana plasmática mediante la expresión heteróloga en ovocitos de *Xenopus laevis* (Preston y col., 1992). Se estableció así la identidad molecular del primer canal de agua, además la identificación molecular de AQP1 fue el detonante de la búsqueda que condujo al descubrimiento de las trece acuaporinas que hoy se conocen en humanos (Echevarria y col., 1994; Fushimi y col., 1993; Jung y col., 1994; Raina y col., 1995).

## 1.2 Clasificación y distribución de las acuaporinas

En mamíferos se han identificado hasta el momento 13 miembros pertenecientes a la familia de las AQPs. La Tabla 1 muestra la distribución de estas proteínas en diferentes tejidos. Se puede apreciar cómo las acuaporinas se expresan en epitelios y endotelios implicados en el transporte de fluidos, pero también en tejidos donde, en principio, el trasiego de agua es menor; como la piel, tejido adiposo, astrogliá, neuronas, etc.

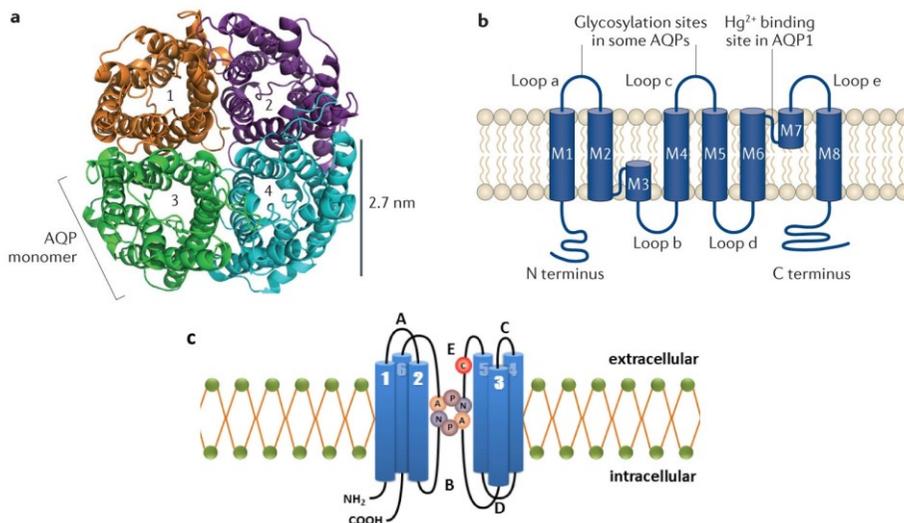
<b>Acuaporina</b>	<b>Expresión</b>
<b>AQP0</b>	Células fibrosas del cristalino
<b>AQP1</b>	Eritrocitos, riñón, corazón plexo coroideo, tráquea, endotelio vascular, vejiga urinaria, uretra, pulmón, testículo, piel, cornea, útero, placenta...
<b>AQP2</b>	Riñón
<b>AQP3</b>	Riñón, epidermis, epitelio de las vías aéreas, tracto gastrointestinal, epitelios glandulares, hígado, pulmón, eritrocitos, útero...
<b>AQP4</b>	Riñón, cerebro, pulmón, estómago, músculo esquelético y retina
<b>AQP5</b>	Epitelios glandulares, córnea, epitelio alveolar, tracto gastrointestinal
<b>AQP6</b>	Riñón
<b>AQP7</b>	Tejido adiposo, testículo, riñón, corazón, tracto gastrointestinal
<b>AQP8</b>	Hígado, páncreas, intestino, glándulas salivares, corazón, riñón, vías aéreas
<b>AQP9</b>	Hígado, leucocitos, testículo, cerebro, riñón, pulmón, médula ósea
<b>AQP10</b>	Intestino delgado
<b>AQP11</b>	Riñón, hígado, cerebro, testículo
<b>AQP12</b>	Células acinares de páncreas, ojo

Tabla 1. Patrón de expresión tisular de las acuaporinas humanas (Modificado de (Verkman, 2005))

### 1.3 Estructura de las acuaporinas

Cada monómero de acuaporina (AQP) pesa alrededor de 30kDa, y en general, contiene 6 segmentos helicoidales transmembrana y dos que no abarcan la totalidad de la membrana (Figura 1b) (Walz y col., 2009). Las AQPs generalmente forman tetrámeros estables en las membranas, aunque cada monómero supone por separado un canal de agua (Figura 1a). Datos estructurales de alta resolución muestran que los dominios transmembranas helicoidales abarcan los espacios citoplasmáticos y

extracelular siendo conectados a través de un poro acuoso (Ho y col., 2009). Simulaciones de dinámica molecular y datos estructurales sugieren que las moléculas de agua se mueven a través de este estrecho poro acuoso y que los factores estéricos y electrostáticos son los responsables de la selectividad del agua de las AQPs (Cui y Bastien, 2011; Hub y col., 2009). La estructura resultante encierra una zona central estrecha que se ensancha abriéndose hacia ambos lados de la membrana formando un poro en forma de reloj de arena. En la zona más estrecha del poro se acercan los dos tripletes NPA (asparagina (N), prolina (P) y alanina (A)), secuencias conservadas en todas las AQPs (Figura 1c) (Echevarria y Ilundain, 1998).



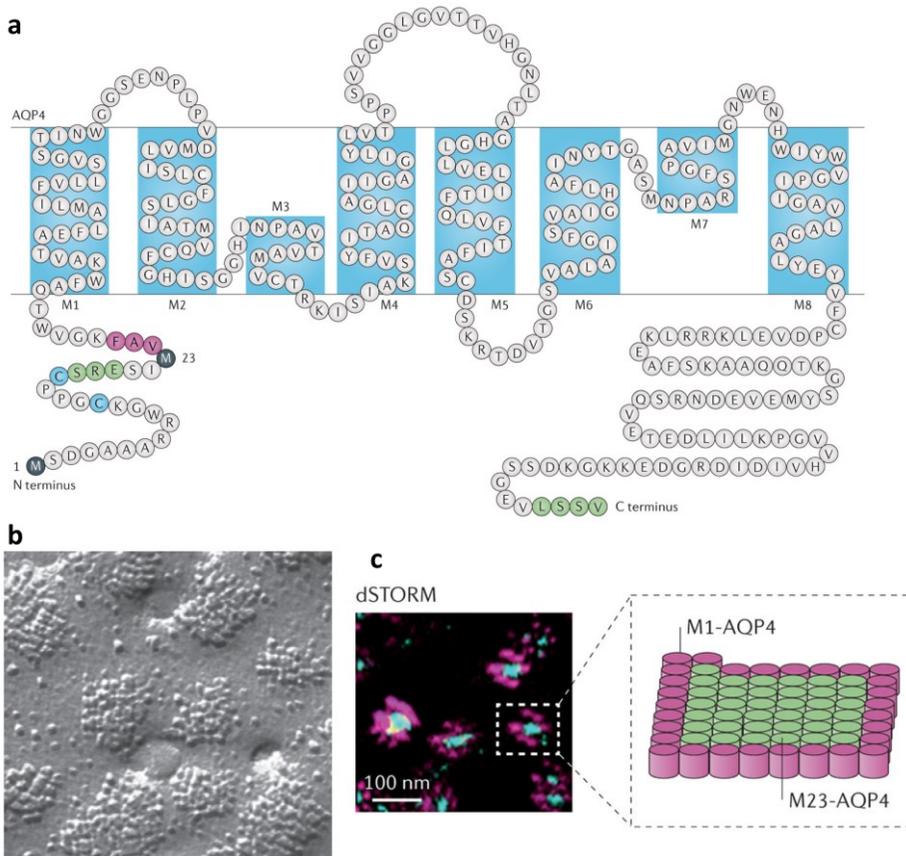
**Figura 1. Estructura de las acuaporinas.** Vista desde arriba de la cara externa de la membrana de un homotetrámero de AQP1, con los monómeros que lo constituyen enumerados del 1-4 (a). La proteína presenta 6 dominios helicoidales transmembrana (M1, M2, M4, M5, M6, Y M8) y otros dos (M3 y M7) donde se encuentran los motivos conservados NPA (b). Los motivos NPA se disponen emparejados en la membrana originando un estrechamiento del poro. En rojo, c, se representa una cisteína sensible a compuestos mercuriales, con actividad bloqueante del canal (c). Modificado de Verkman AS, 2014 y Cheidde y Schorr, 1999.

## 1.4 Acuaporinas en el sistema nervioso central (SNC)

La expresión de acuaporinas ha sido estudiada ampliamente en el sistema nervioso central, órganos sensoriales y sistema nervioso entérico y periférico. Su estudio es de gran relevancia debido a la implicación en la etiología de diferentes patologías neurológicas, siendo AQP1, AQP4 y AQP9 las descritas en el SNC.

## 1.5 Acuaporina 4

Existen dos isoformas principales de la proteína AQP4, M1 y M23, dependiendo de la longitud del extremo amino. M1 es la isoforma que presenta una longitud mayor, siendo M23 más corta, por la falta de 23 aminoácidos en el extremo amino terminal (Figura 2a) (Lu y col., 1996; Yang y col., 1995). AQP4 puede formar agregados supramoleculares en la membrana denominadas OAPs (del inglés *orthogonal arrays of particles*), que se visualizan mediante microscopía electrónica de criofractura como conjuntos ensamblados de partículas (Figura 2b) (Wolburg, 1995). M23 por sí mismo forma grandes OAPs en células transfectadas (Yang y col., 1996), mientras que M1 forma pocos o ningún OAPs. Sin embargo, M1 puede asociarse con M23 y formar OAPs mixtos (Figura 2c), siendo estos de menor tamaño que los que forma M23 por sí sola (Furman y col., 2003). Parece ser que la formación de OAPs viene determinada por la interacción entre los N-terminales de M23-M23 entre tetrámeros, interacción que no se produce en el caso de M1 por la diferencia de residuos de aminoácidos (Crane y Verkman, 2009).



**Figura 2. Secuencia y estructura de AQP4.** El esquema muestra la secuencia de aminoácidos primaria y ubicación en la membrana (AQP4). Esta AQP presenta ocho segmentos helicoidales integrados en la membrana y dos sitios de iniciación, met1 y met23, correspondiente a las isoformas M1 y M23. Tetrámeros de AQP4 pueden formar agrupaciones ortogonales (OAPs) a través de las asociaciones de N-terminales intermoleculares entre isoformas M23 que implican los residuos que aparecen en color morado (A). Fotografía de microscopía electrónica por criofractura de los OAPs en la membrana plasmática (B). En una fotografía obtenida mediante el método dSTORM se observa como en los OAPs se coexpresan las isoformas M1 y M23 (C). Modificado de (Papadopoulos y Verkman, 2013).

AQP4 es el canal de agua más abundante en el cerebro (Papadopoulos y col., 2004), médula espinal (Oshio y col., 2004) y nervio óptico (Nagelhus y col., 1998). En el cerebro, AQP4 se localiza principalmente en las prolongaciones de astrocitos subpiales que forman la membrana glial limitante que actúa como interfase entre el SNC y el líquido cefalorraquídeo

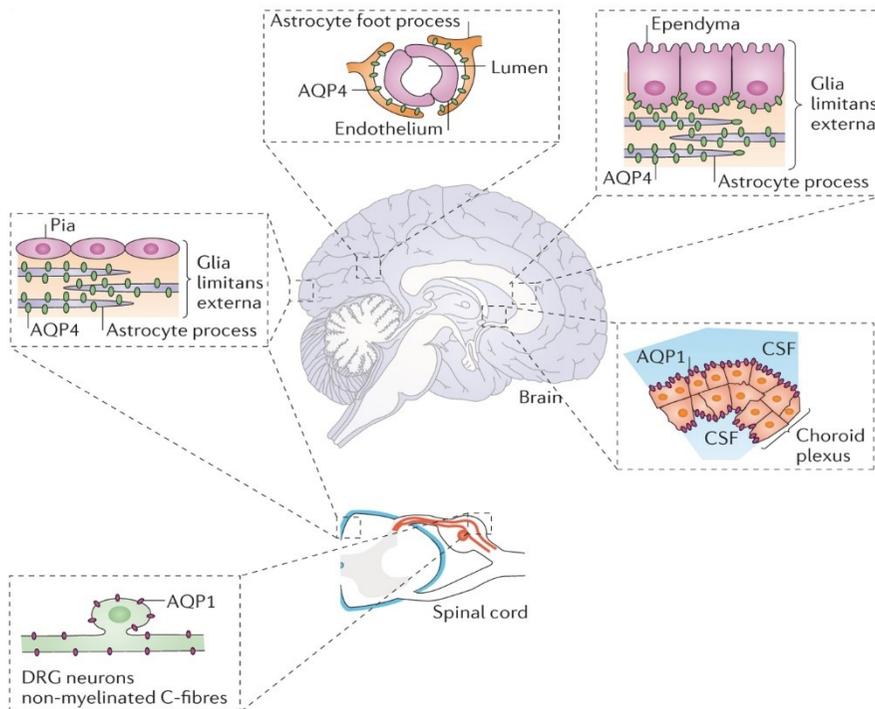
(LCR), los pies de los astrocitos perivasculares que se encuentran en la interfase entre SNC y sangre, y en la membrana basolateral de los podocitos de las células endodiales y subendodiales que forman la interfase entre el SNC y el LCR (Nielsen y col., 1997; Rash y col., 1998). Este patrón de expresión de AQP4 en los límites entre el cerebro y los principales compartimentos que contienen agua sugieren que AQP4 facilita el flujo de agua dentro y fuera del cerebro (Papadopoulos y Verkman, 2013).

### 1.6 Acuaporina 1

AQP1 se encuentra en la membrana plasmática de las células epiteliales del plexo coroideo que dan al ventrículo, lo que sugiere la participación de este canal en la secreción del LCR. AQP1 también se expresa en las células endoteliales vasculares de todo el organismo pero está ausente en el endotelio cerebrovascular a excepción de los órganos circunventriculares. Las células epiteliales cerebrovasculares expresan AQP1 en cultivo y en tumores cerebrales malignos cuando la barrera hematoencefálica está alterada. El cocultivo con astrocitos inhibe la expresión del ARNm de *Aqp1* de las células epiteliales de microvasos vasculares. Esto sugiere que la interacción entre los podocitos y las células endoteliales inhibe la expresión de AQP1 (Papadopoulos y Verkman, 2013).

### 1.7 Acuaporina 9

AQP9 es la acuaporina menos abundante en el cerebro y su localización no ha sido aún bien definida debido a la baja especificidad de los anticuerpos disponibles. Hasta el momento, se ha descrito la presencia de AQP9 en neuronas de la sustancia negra, tanicitos y algunos astrocitos. Participa en el transporte de sustratos energéticos como glicerol y lactato, desempeñando por tanto un papel importante en el control energético del metabolismo cerebral (Badaut y Regli, 2004).



**Figura 3. Expresión y localización de AQPs en el cerebro.** En el cerebro, AQP4 se expresa principalmente en las prolongaciones de los astrocitos de la glía limitans externa y en los pies de los astrocitos perivasculares. También se encuentra en la membrana plasmática basolateral de células ependimarias y en las prolongaciones de astrocitos subependimarios de la glía limitans externa. AQP1 se expresa en la membrana plasmática del epitelio de plexo coroideo, en la cara expuesta al líquido cefalorraquídeo. La expresión de AQP1 y AQP4 también existe en la médula espinal. Los lugares de expresión de AQP9 siguen sin estar claros. Modificado de (Papadopoulos y Verkman, 2013).

## 1.8 Funciones de las acuaporinas en el SNC

El conocimiento de las funciones de las acuaporinas en el SNC se derivan en gran parte de experimentos realizados en ratones *knockout* de AQP4 (AQP4-KO) para diferentes condiciones patológicas, puesto que hasta la fecha no se han descrito inhibidores de AQP4 que no sean tóxicos para el organismo y tampoco han sido identificadas en humanos mutaciones en AQP4 que conlleven pérdida de función de éstas. Al menos tres grupos han generado ratones AQP4-KO que han permitido describir tres principales funciones como son el facilitar el paso de agua hacia dentro y hacia fuera del SNC, migración de astrocitos y neuroexcitación. Experimentos *in vivo* describen la ausencia de AQP4 en astrocitos de ratón, pero sin embargo su expresión si se detecta en astrocitos de mono (Arcienega y col., 2010), sugiriendo esto que puede existir una variación en la funcionalidad o importancia de AQP4 entre roedores y primates. A continuación se describe más en detalle como las AQP4 participan de estas tres funciones principales en el SNC.

### 1.8.1 Movimiento de agua en el cerebro

En adultos, la cavidad intracraneal está comprendida por varios compartimentos (sangre, líquido cefalorraquídeo y los espacios intersticiales e intracelulares del parénquima cerebral) y está rodeada por un cráneo no distensible. El movimiento del agua a través de estos compartimentos se produce en respuesta a cambios osmóticos y fuerzas hidrostáticas. Aunque las moléculas de agua pueden atravesar las membranas directamente y en

menor grado a través de transportadores de glucosa y canales iónicos, AQP4 juega un papel esencial en la determinación de la permeabilidad al agua de la barrera hematoencefálica (BHE). La eliminación de la expresión de AQP4 se asocia a una reducción de siete veces la permeabilidad al agua de la membrana plasmática en cultivo de astrocitos (Solenov y col., 2004) y de diez veces la permeabilidad en la BHE en cerebro de ratón (Papadopoulos y Verkman, 2005). La reducción del 27% de la expresión de AQP4 mediante ARN interferente (siRNA), causó en cerebro de rata una disminución del 50% en el coeficiente de difusión aparente, lo que es consistente con una reducción de la permeabilidad al agua en la membrana plasmática de los astrocitos (Badaut y col., 2011). Sin embargo, en ratones AQP4-KO se ha observado una presión intracraneal normal (Papadopoulos et al., 2004) y tan sólo un pequeño incremento en el contenido de agua total del cerebro (Haj-Yasein y col., 2011; Papadopoulos et al., 2004). Estos resultados sugieren que AQP4 no es necesaria para movimientos relativamente lentos del agua dentro y fuera del cerebro que tiene lugar bajo condiciones fisiológicas normales, ya que estos pueden ocurrir a través de vías independientes de dicha proteína. En enfermedades del SNC, tales como daño cerebral, meningitis, tumor cerebral e hidrocefalia, el flujo de agua hacia dentro y fuera del cerebro aumenta, causando un incremento de la presión intracraneal por el exceso de acumulación de agua en los compartimentos intracraneales. Este aumento de la presión intracraneal es perjudicial, ya que puede causar isquemia cerebral, hernia y, en última instancia, la muerte cerebral (Marmarou, 2007; Papadopoulos y Verkman, 2007). Es en estas situaciones patológicas en las que AQP4 facilita el transporte de agua cerebral, cobrando así importante relevancia funcional.

### 1.8.2 Producción de líquido cefalorraquídeo

La idea general que se tiene en la actualidad en relación a las AQP's y su papel en la homeostásis del LCR es que AQP1 participa en la secreción de LCR y AQP4 en su absorción. El LCR es secretado por el plexo coroideo y absorbido a través de las granulaciones aracnoideas del seno venoso y otras rutas como el flujo transependimal en el cerebro. La producción de LCR involucra el transporte activo de  $\text{Na}^+$ , via la ATPasa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , desde la sangre a los ventrículos, generando un gradiente osmótico que impulsa el flujo de agua. AQP1 se expresa en la cara apical del epitelio del plexo coroideo (Nielsen y col., 1993). La comparación de ratones AQP1-KO respecto a silvestres muestran una reducción de cinco veces la permeabilidad al agua, y un descenso del 50% en la presión intracraneal. En AQP1-KO la producción de LCR se vio reducida en un 25%, sugiriendo la participación de AQP1 en su producción, aunque no de forma exclusiva (Oshio y col., 2005). Por su parte, AQP4 presente en células endimarias y astrocitos subependimarios parece ser determinante en el flujo de LCR entre ventrículos y parénquima cerebral, no quedando claro sin embargo el papel que desempeña en los plexos coroideos (Mobasheri y col., 2007; Speake y col., 2003; Suzuki y col., 2013; Venero y col., 1999). El beneficio clínico de la inducción de AQP4, es predicho por un modelo de análisis de múltiples compartimentos, en el que tan sólo duplicando la permeabilidad de AQP4 se reduciría la dilatación ventricular y la presión intracraneal en más de un 40%, y podría tener un impacto significativo en el resultado clínico de las hidrocefalias (Bloch y col., 2006).

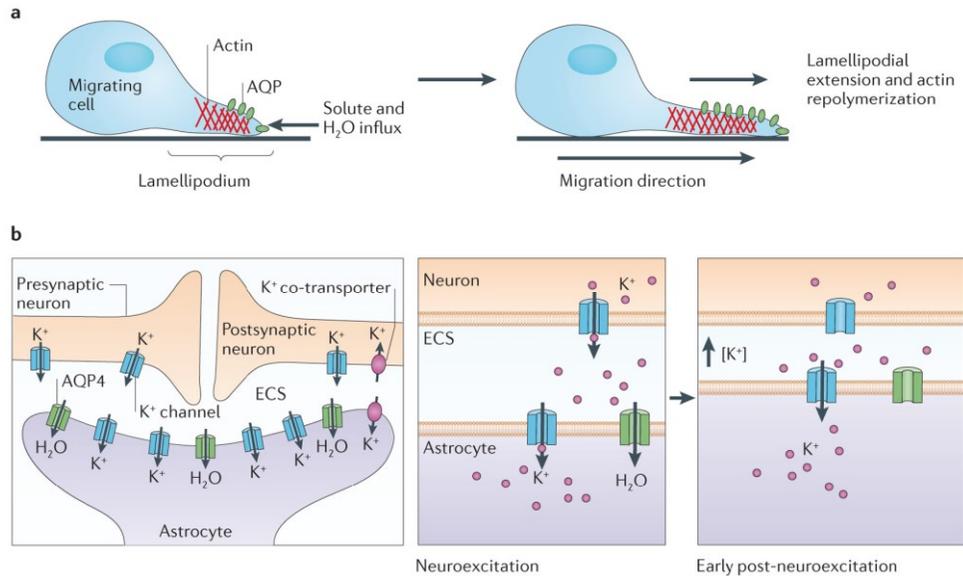
### 1.8.3 Migración de astrocitos

La expresión de AQP4 parece fundamental para la migración de astrocitos ya que da lugar a células polarizadas en el frente de migración (Saadoun y col., 2005). Experimentos *in vitro*, muestran que cultivos de astrocitos de ratones silvestres migran más rápidamente que los de ratones AQP4-KO, aunque no se apreciaron alteraciones en proliferación o adhesión celular (Auguste y col., 2007). En ensayos *in vivo*, la formación de la cicatriz glial se vio alterada en ratones AQP4-KO (Saadoun et al., 2005). Se ha propuesto por tanto que la migración en astrocitos dependiente de AQP4 puede facilitar la formación de la cicatriz glial. Como mecanismo para explicar la migración de astrocitos dependiente de AQPs, se ha propuesto que las AQPs facilitan el transporte de agua en el frente de migración incrementando la extensión del lamelipodio. De acuerdo a este mecanismo, la despolimerización de la actina y/o la entrada de soluto en el lamelipodio crean un gradiente osmótico que impulsa la entrada de agua a través de la membrana plasmática. El resultante aumento de la presión hidrostática causa la expansión local de la membrana plasmática, seguida por una repolimerización de actina para estabilizar la protrusión de la membrana celular (Charras y col., 2005).

### 1.8.4 Neuroexcitación

Los estudios en ratones *knockout* y rodajas de cerebro han sugerido que AQP4 está implicada en la transducción de señales neurales. Ratones AQP4-KO tienen un menor umbral para la iniciación de una crisis epiléptica

con estimulación química o eléctrica, muestran crisis más prolongadas y una cinética de recaptación de  $K^+$  alterada (Lee y col., 2012). En el modelo de ácido kaínico intra-hipocampal de epileptogénesis, ratones AQP4-KO muestran un aumento en la frecuencia de convulsiones espontáneas durante la primera semana después del estado epiléptico (Lee et al., 2012). Estudios con microelectrodos e imagen de fluorescencia en el cerebro *in vivo* y en rodajas de cerebro de ratones deficientes en AQP4 también muestran una lenta acumulación de  $K^+$  en el espacio extracelular del cerebro durante la neuroexcitación y un retraso en la recaptación de  $K^+$  después de la neuroexcitación. Esta lenta recaptación de  $K^+$  podría ser el motivo de los diferentes fenotipos de neuroexcitación, como la prolongada duración de las crisis, que se observan en ratones AQP4-KO. La relación mecanicista entre la recaptación de  $K^+$  por los astrocitos y la permeabilidad al agua mediada por AQP4 todavía no está clara. Una de las hipótesis es que AQP4 facilitaría la entrada de agua en los astrocitos, lo que provocaría la disminución del volumen del espacio extracelular y el aumento de la concentración de  $K^+$  en el mismo, favoreciendo una mayor recaptación de  $K^+$  por los astrocitos. Esta hipótesis, que está apoyada por modelos matemáticos, es muy interesante puesto que relaciona directamente los fenotipos de neuroexcitación obtenidos con el transporte de agua mediado por AQP4. Sin embargo, la posibilidad de que dichos fenotipos resultantes de la deficiencia de AQP4 puedan explicarse por la expresión alterada de otros genes distintos de AQP4 no puede ser excluida (Papadopoulos y Verkman, 2013).



**Figura 4. Implicación de AQP4 en la migración de astrocitos y neuroexcitación.** Durante la migración, el agua se introduce en el citoplasma principalmente a través del AQP4 por un gradiente osmótico creado por la despolimerización de la actina y la entrada de soluto, facilitando la extensión lamelipodial en la dirección de la migración celular (A). También se propone que AQP4 tenga un papel en la neuroexcitación fuera de la hendidura sináptica. La neuroexcitación implica una liberación de  $K^+$  por las neuronas, y una captación de  $K^+$  y agua por el astrocito. Tomado de (Papadopoulos y Verkman, 2013)

## 2. Patologías del sistema nervioso central asociado a AQPs

### 2.1 Edema

Hay una creciente evidencia que plantea que la deficiencia de AQP4 está asociada con la reducción del edema cerebral citotóxico en ratones. Este tipo de edema se caracteriza por hinchazón celular, espacio extracelular reducido y BHE intacta; y está provocado por un flujo de agua desde los vasos hacia el citosol de las células ocasionado por un fallo en la bomba  $Na^+/K^+$  o un déficit de  $Na^+$  extracelular. Este tipo de edema se produce en la

fase temprana de la isquemia cerebral, por hipoxia, hiponatremia, hiperhidratación, etc. Se ha comprobado que ratones AQP4-KO desarrollan un 35% menos de inflamación cerebral hemisférica que los ratones silvestres 24 h después de la oclusión de la arteria cerebral media. También se ha observado una reducción de la inflamación cerebral causada por hiperhidratación e isquemia cerebral en ratones sintrofina- $\alpha$ -KO, que se caracterizan por la reducción de la expresión de AQP4 en los podocitos. En comparación con los ratones silvestres, en los ratones AQP4-KO y sintrofina- $\alpha$ -KO la tasa de absorción de agua en el parénquima cerebral tras una hiperhidratación se reduce nueve veces (Tait y col., 2008).

En contraste con el papel beneficioso que la ausencia de AQP4 pueda tener en el edema citotóxico, la deficiencia de AQP4 produce más inflamación cerebral en ratones con edema vasogénico. Este tipo de edema tiene su origen en fuerzas hidroestáticas que provocan la extravasación de un exudado rico en proteínas desde el plasma, a través de la BHE que se encuentra alterada, hasta el espacio extracelular que se expande. Está provocado por tumores y abscesos cerebrales. La implantación de células de melanoma en cerebro de ratones silvestres y AQP4-KO produce tumores comparables después de una semana, sin embargo la presión intracraneal es mucho mayor en los ratones AQP4-KO. Este hallazgo sugiere que en el edema cerebral vasogénico, el exceso de agua entra en el espacio extracelular del cerebro por una vía independiente de AQP4, pero sale principalmente del cerebro a través de los canales de agua AQP4 hacia el LCR y sangre. Esta diferencia entre el edema citotóxico y el vasogénico parece ser debida a la diferencia osmótica del medio, siendo este gradiente

el que determina la dirección del flujo de agua mediante transporte pasivo a través de AQP4. (Hsu y col., 2015; Tait et al., 2008).

## 2.2 Tumores cerebrales

El glioblastoma es el tumor cerebral más común. Se trata de un tumor muy difícil de erradicar por su elevada capacidad de infiltración en los tejidos cerebrales colindantes. En estos tumores se ha establecido una correlación entre la cantidad de edema cerebral y la sobreexpresión de AQPs (AQP4, AQP1 y AQP9) que hay en sus células. También se ha propuesto que dichas proteínas facilitan la migración de las células tumorales lo que promueve la infiltración del tumor en los tejidos que lo rodean (Papadopoulos y Verkman, 2013).

## 2.3 Epilepsia

AQP4 participa en la homeostasis del agua y del  $K^+$  durante la actividad neuronal. Estos dos parámetros tienen poderosos efectos sobre la susceptibilidad a las crisis epilépticas, por lo que AQP4 y las proteínas con las que esta interacciona podrían representar nuevas dianas terapéuticas para el control de las convulsiones. En pacientes con epilepsia, se ha observado una desregulación en la homeostasis del  $K^+$  y una sobre expresión y distribución alteradas de AQP4. La relevancia que estos hallazgos tienen en la epileptogénesis del hipocampo y en la epilepsia humana requiere un estudio más profundo del tema.

Dada su localización, se piensa que AQP4 puede estar implicada en la regulación de los flujos de agua e iones de la interacción glioneuronal y también de las interacciones gliovasculares a través de la BHE y por lo tanto jugaría un papel crítico durante el metabolismo tanto del tejido activo como en estados fisiopatológicos. Nuevos datos indican además que AQP4 podría estar implicada en la osmodetección, actuando junto a TRPV4 (del inglés “*transient receptor potential vanilloid channel*”) y en la señalización mediada por  $\text{Ca}^{2+}$  en los astrocitos. La relevancia de estos resultados en el contexto de la epilepsia se está investigando actualmente (Binder y col., 2012).

## 2.4 Neuromielitis óptica

### 2.4.1 Introducción

La neuromielitis óptica (NMO), también conocida como enfermedad de Devic's, es una enfermedad autoinmune inflamatoria de carácter desmielinizante del sistema nervioso central que principalmente afecta al nervio óptico y a la médula espinal (Jacob y col., 2007; Kim y col., 2011). Durante mucho tiempo ha existido mucha controversia de si la neuromielitis óptica es una variante de la esclerosis múltiple (EM) o es una enfermedad diferente (Mata y Lalli, 2011). Sin embargo gracias a estudios clínicos, inmunológicos, radiológicos y patológicos, se ha establecido que la NMO es una enfermedad distinta de la EM, viéndose aún más reforzada esta postura tras el descubrimiento, en 2004, de un anticuerpo específico anti-AQP4 en pacientes con NMO (Kim et al., 2011). La epidemiología de la NMO no está claramente definida porque la enfermedad solía ser mal diagnosticada como

EM y aunque existen datos de pacientes con NMO de todos los continentes, los estudios epidemiológicos son muy escasos y su incidencia y prevalencia están todavía pobremente establecidos (Mandler, 2006; Mealy y col., 2012). La incidencia de NMO es mayor en poblaciones asiáticas, india y negra con respecto a la población caucásica, coincidiendo a su vez estos grupos étnicos con una tasa de pacientes con EM más baja (Cossburn y col., 2012; Lana-Peixoto, 2008; Rivera y col., 2008).

La mayoría de los pacientes que desarrollan la NMO suelen ser mujeres, llegando a ser la tasa de incidencia de entre 3:1 o incluso 6:1 según la población (Cossburn et al., 2012; Mealy et al., 2012; Wingerchuk, 2009). La prevalencia de la enfermedad en mujeres puede sugerir alguna asociación directa al cromosoma X o que las hormonas sexuales juegan un papel en el desarrollo de la NMO (Wingerchuk, 2009).

La edad de inicio varía desde la infancia hasta la edad adulta, pero la enfermedad afecta a los adultos, en su mayoría jóvenes, con una edad media de inicio superior a la de EM (Kim et al., 2011; Lana-Peixoto, 2008) y que en función del país de estudio, se contempla dentro del rango de los 40 a 55 años (Mealy et al., 2012; Papais-Alvarenga y col., 2002).

#### *2.4.2 Clasificación*

La enfermedad puede seguir un curso monofásico o recidivante. La NMO de curso monofásico fue la primera descrita por Eugène Devic (Devic, 1894), donde la mielitis transversa y la neuritis óptica ocurren simultáneamente o en un corto período de tiempo. Sin embargo, en más del 80-90% de los casos, la NMO suele seguir un curso recidivante, siendo la de

curso monofásico la menos frecuente (Mata y Lolli, 2011; Papadopoulos y col., 2014).

La alta especificidad de los anticuerpos IgG anti AQP4 (NMO-IgG) ha sido utilizada para expandir el espectro clínico y de neuroimagen de la NMO. Se ha establecido un consenso para la definición de este nuevo espectro clínico de la NMO (NMOSD), que unifica el concepto tradicional de la NMO junto a las definiciones modernas surgidas en torno a NMOSD. Este consenso permite un diagnóstico de la NMOSD donde tienen cabida la seropositividad y seronegatividad de las muestras para NMO-IgG, siempre que estén asociadas a otras características clínicas como se muestran en la Tabla 2 (Wingerchuk y col., 2015).

<p><b>Criterios de diagnóstico para NMOSD con AQP4-IgG</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Al menos una característica clínica básica.</li> <li>2. Test positivo para anticuerpos AQP4-IgG mediante método de detección (CBA recomendada)</li> <li>3. Exclusión de diagnósticos alternativos</li> </ol>
<p><b>Criterios de diagnóstico para NMOSD sin AQP4-IgG o sin determinar</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Al menos 2 características clínicas básicas ocurren como resultado de uno o más ataques y cumple con los siguientes requerimientos:           <ol style="list-style-type: none"> <li>a. Al menos una característica clínica básica debe ser neuritis óptica, mielitis aguda con LETM o síndrome del área postrema.</li> <li>b. Diseminación en el espacio</li> <li>c. Cumplimiento de IRM requeridas</li> </ol> </li> <li>2. Test negativo para anticuerpos AQP4-IgG o test no disponible</li> </ol>
<p><b>Características clínicas básicas</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Neuritis óptica</li> <li>2. Mielitis aguda</li> <li>3. Síndrome de área postrema</li> <li>4. Síndrome del tronco del encéfalo agudo</li> <li>5. Narcolepsia o síndrome diencefálico agudo con lesiones en IRM típicas de NMOSD</li> </ol>

**Tabla 2. Guía diagnóstica para la NMOSD. Tomado y modificado de (Wingerchuk et al., 2015)**

### *2.4.3 Criterios de diagnóstico y características clínicas*

Para un diagnóstico correcto de la enfermedad, los criterios establecidos desde 2006 determinan que se debe cumplir que el paciente presente una mielitis aguda, neuritis óptica y al menos uno de los siguientes criterios: lesión de al menos 3 segmentos de la médula espinal, no cumplir criterios de diagnóstico para EM o presentar anticuerpos anti-AQP4 en suero (Wingerchuk y col., 2006).

Diversas enfermedades autoinmunes han sido descritas en al menos un 30% de pacientes con NMO, lo que sugiere que personas con esta condición pueden tener una predisposición genética a una autoinmunidad anómala (Iyer y col., 2014). La presencia de mutaciones en AQP4, parece no tener en cuenta la susceptibilidad a NMO (Matiello y col., 2011), y aunque algunos estudios parecen encontrar relación entre alelos HLA (antígenos leucocitarios humanos) y NMO (Brum y col., 2010; Matsushita y col., 2009), otros no han encontrado relación (Zephir y col., 2009), lo que sugiere una susceptibilidad genética compleja, multifactorial, que hace que esta enfermedad sea heredable en tan sólo un 3% de los casos (Matiello y col., 2010).

### *2.4.4 Patogénesis*

La respuesta de las inmunoglobulinas (IgG) a autoantígenos refleja la colaboración y regulación de las células T con células B antígeno específicas. El papel de las células T efectoras, específicas para AQP4, no ha sido descrito aún, pero éstas células podrían contribuir al inicio en la disrupción de la barrera hematoencefálica (Pittock y col., 2006). En lesiones establecidas de

NMO, las células plasmáticas, un tipo de linfocito B productor de anticuerpos, producen IgG y existe evidencia de un incremento de producción intratecal de NMO-IgG, observándose que a elevados niveles hay correlación significativa con ataques severos de la enfermedad (Iorio y col., 2011; Kremer y col., 2013; Magana y col., 2009; Vernant y col., 1997). La interleucina 6, citoquina con actividad proinflamatoria, mejora la supervivencia de las células plasmáticas, siendo mayores sus niveles en plasma de pacientes con NMO que en controles sanos. Estas células plasmáticas se detectan en sangre periférica de pacientes con NMO y son más numerosas en la fase de ataque de la enfermedad. En experimentos *in vitro*, se ha observado que la interleucina 6 promueve la producción de IgG específicas de AQP4 por células plasmáticas derivadas de sangre y LCR de pacientes con NMO (Long y col., 2014a; McKeon y col., 2008; Pittock y col., 2008; Vernant et al., 1997).

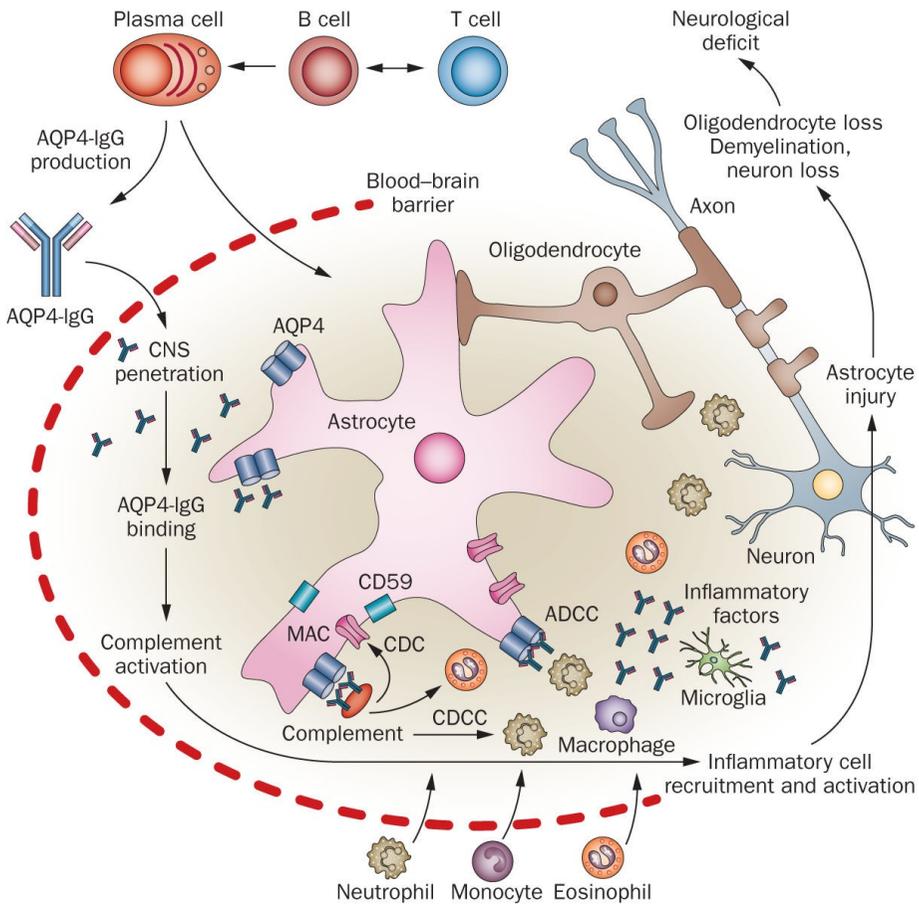
Para que tenga lugar la patogenicidad de las células, se requiere de la unión de IgG al dominio extracelular de AQP4 (McKeon y col., 2009). AQP4-IgG es predominantemente del tipo IgG1, un potente activador del sistema del complemento. La formación de OAPs por AQP4 cubre un papel importante en la patogénesis de la enfermedad, ya que los anticuerpos NMO-IgG se unen con mayor afinidad a los OAPs que a los tetrámeros aislados que también forma AQP4 (Crane y col., 2011). El incremento de esta afinidad descrita, implica un mayor efecto en la citotoxicidad, en el que la proteína del complemento C1q, se une con mayor eficiencia cuando AQP4 forma estas estructuras macromoleculares (Phuan y col., 2012). Los anticuerpos NMO-IgG que están unidos a tetrámeros de la isoforma M1, rápidamente se internalizan en vesículas por mecanismos de protección

propios de la célula, sin embargo, los que se unen a los OAPs, formados principalmente por M23, poseen un tamaño mayor que excede la capacidad del astrocito para poder ser endocitado (Bergamaschi y col., 2009). Los OAPs permitirán crear un entorno de elevada densidad de IgG agrupados que ante la presencia del complemento producirá una llamativa activación de éste, promoviendo la quimiotaxis de leucocitos, permeabilidad vascular con afluencia masiva de plasma rico en IgG, complemento y factor reumatoide, el cual mejora aún más la activación del complemento (McKeon et al., 2009).

El bloqueo del flujo de agua por los autoanticuerpos, podría explicar el prominente edema intramielínico observado en lesiones tempranas de NMO, el cual es un precursor potencial de la desmielinización (Armagan y col., 2012; Bergamaschi et al., 2009).

La alteración de la homeostasis del glutamato es otra posible propiedad potencialmente patógena de AQP4-IgG. El transportador de glutamato también llamado "*excitatory aminoacid transporter-2, (EAAT2)*" está unido de forma no covalente a AQP4 en la membrana presináptica de astrocitos, por lo que se co-internaliza ante la presencia de AQP4-IgG. EAAT2 realiza el 90% de la captación de glutamato en el SNC. Experimentos *in vitro* muestran como en cultivos de astrocitos, ante la presencia de AQP4-IgG se reduce la captación de glutamato. Además, las lesiones de medula espinal en pacientes de NMO muestran una materia gris con elevada deficiencia de EAAT2 (Reindl y col., 2013). Este efecto de los anticuerpos AQP4-IgG sobre el transportador EAAT2, reduciendo su actividad, tiene como consecuencia el aumento de niveles extracelulares de glutamato, los cuales resultan tóxicos para los oligodendrocitos ocasionando su muerte, y por ello se postula como

otra posible causa de la desmielinización en NMO (Hoftberger y col., 2015; Kitley y col., 2014b). El fármaco Ceftriaxone, potente estimulador del transportador de glutamato (EEAT2) (Rothstein y col., 2005), fue propuesto para su uso en NMO (Ratelade y Verkman, 2012), sin embargo, otros autores, descartan la relación de altos niveles de NMO-IgG con la disminución en la captación de glutamato (Ratelade y col., 2011).



**Figura 5. Mecanismos de patogénesis de NMO.** AQP4-IgG y las células plasmáticas productoras de estos anticuerpos, atraviesan la barrera hematoencefálica hacia el SNC, donde AQP4-IgG se une a las AQP4 de los astrocitos. Esta unión implica la activación del sistema del complemento, que conduce a la inflamación, daño en oligodendrocitos, desmielinización y muerte neuronal (Papadopoulos et al., 2014).

#### 2.4.5 Detección de anticuerpos anti-AQP4 (NMO-IgG)

En la actualidad, son varias las técnicas que permiten detectar los anticuerpos anti-AQP4 en el suero de pacientes, técnicas que pueden ser clasificadas en función de si el ensayo se realiza sobre tejido, células o proteínas (Trebst y col., 2014). La detección de anticuerpos anti-AQP4 ha avanzado considerablemente en los últimos años mejorando la sensibilidad del diagnóstico sin comprometer la especificidad (Wingerchuk et al., 2015).

De las técnicas desarrolladas hasta la fecha, los resultados obtenidos indican que el método basado en células transfectadas con AQP4 (*Cell Based Assay*, CBA) es el que permite un mejor diagnóstico, con una sensibilidad de 76% y especificidad del 99%. Otros métodos, como el que se realiza sobre tejidos con expresión endógena de AQP4 (*Tissues Based Assay*, TBA), o ensayos de ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), muestran menor sensibilidad y especificidad, siendo en el TBA la sensibilidad del 59% y la especificidad del 98%, o en los ensayos de ELISA la sensibilidad del 65% y la especificidad del 97% (Ruiz-Gaviria y col., 2015).

Existen pacientes que cumplen los criterios del NMOSD, en los que no se han detectado anticuerpos anti-AQP4, lo que supone un verdadero reto en el diagnóstico (Marignier y col., 2013). La mayoría de los pacientes que padecen NMO en su variante monofásica tienen más probabilidad de ser seronegativos para anticuerpos anti-AQP4 que los que presentan la variable con recaídas (Jarius y col., 2012). Para una pequeña parte de los pacientes que presentan características clínicas de NMO, casi todos seronegativos en la detección de NMO-IgG, se ha descrito la presencia de anticuerpos contra la glicoproteína de la mielina de oligodendrocitos (MOG) (Kitley et al.,

2014b; Kitley y col., 2012; Mader y col., 2011; Sato y col., 2014). Estos hallazgos podrían sugerir que algunos pacientes seronegativos para NMO-IgG con características clínicas y de neuroimagen de NMOSD tienen una patogénesis subyacente diferente (Marignier et al., 2013), aunque el papel de los anti-MOG y otros anticuerpos aún está por determinar (Reindl et al., 2013). Ocasionalmente puede ocurrir que un paciente en un primer análisis no presente anticuerpos NMO-IgG, pero que posteriormente sí los presente. Aunque este hecho pueda tener explicaciones técnicas, en algunos casos los niveles de anticuerpos se ven incrementados en episodios de recaída y a su vez disminuyen con los tratamientos de inmunosupresión al que se someten los pacientes (Jarius y col., 2008). Existen casos clínicos de NMO en los que se han detectado anticuerpos NMO-IgG en líquido cefalorraquídeo, pero no en suero, aunque no resulta frecuente (Jarius y col., 2010; Kalluri y col., 2010; Klawiter y col., 2009; McKeon y col., 2011). La detección de anticuerpos NMO-IgG facilita el diagnóstico de la enfermedad en estadios tempranos, o al menos para descartar como diagnóstico la esclerosis múltiple, resultando ser un avance de gran importancia, ya que observaciones recientes sugieren que el tratamiento para EM como interferón- $\beta$ , natalizumab y fingolimod pueden ser perjudiciales para pacientes con NMO (Kimbrough y col., 2012; Kleiter y col., 2012; Min y col., 2012; Papeix y col., 2007).

### 2.4.6 Tratamiento

Las terapias para tratar la NMO consisten en reducir al mínimo la discapacidad neurológica aliviando los ataques agudos y previniendo de las exacerbaciones futuras. Las terapias agudas están diseñadas para minimizar las lesiones y acelerar la recuperación, mientras que las terapias preventivas se centran en la reducción de la frecuencia y severidad de los ataques.

Para tratar ataques agudos suele aplicarse un tratamiento basado en metilprednisolona intravenosa y plasmaféresis. Los corticosteroides tienen multitud de efectos antiinflamatorios e inmunosupresores, incluyendo la reducción de linfocitos y monocitos circulantes; disminución de la expresión de moléculas de adhesión celular y metaloproteinasas; y la alteración de la transcripción de citoquinas proinflamatorias.

Para la prevención de los ataques, se aplica una terapia inmunosupresora desde el primero, debido a la alta probabilidad de repeticiones. Las terapias preventivas se utilizan para agotar poblaciones de células inmunes, disminuir anticuerpos AQP4-IgG circulante, o interferir en la proliferación celular inmune o de activación. Curiosamente, los agentes más comúnmente usados, azatioprina, micofenolato y rituximab, se dirigen principalmente a los linfocitos y parecen disminuir la actividad de la enfermedad sin efectos consistentes sobre los títulos de AQP4-IgG. La respuesta clínica sugiere que los linfocitos podrían promover la actividad de la enfermedad a través de diversas y complejas funciones, incluyendo la presentación de antígenos, la producción de citoquinas proinflamatorias y alteración de redes inmunes reguladoras (Papadopoulos et al., 2014).

Existen otros tratamientos que resultan efectivos para tratar la esclerosis múltiple pero que sin embargo pueden empeorar el curso de la NMO. Un ejemplo es el caso del natalizumab, un anticuerpo monoclonal dirigido contra la integrina  $\alpha 4\beta 1$  VLA-4 (*very late antigen 4*). Se ha descrito que el natalizumab no tiene efecto o incluso produce un empeoramiento de la enfermedad en pacientes con NMO seropositivos para NMO-IgG (Barnett y col., 2012; Kleiter et al., 2012) y también en pacientes NMO seronegativos (Kitley y col., 2014a). En un estudio de 5 pacientes con NMO a los cuales se les trató con natalizumab, se registraron 9 recaídas y un incremento en la Escala Expandida del Estado de Discapacidad (EDSS) de 4 a 7 de media (Kleiter et al., 2012). Las lesiones observadas durante el tratamiento con natalizumab mostraron una desmielinización activa, una severa infiltración de neutrófilos y eosinófilos y muerte de astrocitos (Barnett et al., 2012). El natalizumab puede incrementar la actividad de la enfermedad a causa del incremento del número de células T proinflamatorias periféricas o eosinófilos (Polman y col., 2006) , pudiendo estos últimos migrar al SNC y agravar la formación de la lesión (Lucchinetti y col., 2002; Zhang y Verkman, 2013) o facilitar la estabilización de células plasmáticas de la médula ósea específicas de AQP4 (Chu y col., 2011).

#### 2.4.7 AQP1 en NMOSD

Varias publicaciones han descrito que además de AQP4, los astrocitos del SNC también expresan abundante AQP1 en la superficie (Gao y col., 2012; Misu y col., 2013; Satoh y col., 2007). Especialmente se ha observado una elevada expresión en áreas propensas a desarrollar lesiones

características de NMO (médula espinal, nervio óptico y sustancia blanca del cerebro) (Misu et al., 2013), lo que sugiere la posible implicación de AQP1 en la enfermedad, y su posible uso como diana terapéutica.

A causa del complejo criterio de diagnóstico para NMOSD, y la ausencia de los anticuerpos anti-AQP4 como biomarcador en ciertos pacientes de este espectro, se ha explorado la posible presencia de anticuerpos anti-AQP1 como nuevo biomarcador de la NMOSD. En ensayos realizados por el grupo de Tzartos (Tzartos y col., 2013) mediante las técnicas RIPA (*Rapid Immunofilter Paper Assay*), ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) y Western Blot se detectaron anticuerpos anti-AQP1 en el 16.7% de 348 pacientes sospechosos de padecer NMOSD. De este 16.7%, el 4% a su vez, presentaban anticuerpos anti-AQP4. Mediante la técnica de CBA también se ha descrito la detección de anticuerpos anti-AQP1 en pacientes con NMOSD (Long y col., 2014b). Sin embargo, cabe la duda de que la presencia de anticuerpos anti-AQP1 pueda establecerse como biomarcador de la enfermedad tal como ocurre con AQP4 para la NMO, ya que su presencia no sólo ha sido detectada en algunos pacientes con sospecha de NMOSD, sino que también han sido detectados en pacientes sanos (Schanda y col., 2015).

### 3. Hidrocefalia

#### 3.1 Definición

La hidrocefalia es una afección en la que un exceso de líquido cefalorraquídeo se acumula en los ventrículos del cerebro. En condiciones normales existe un equilibrio entre la producción, la circulación y los niveles de absorción de líquido cefalorraquídeo. La hidrocefalia es el resultado de un desequilibrio en estos procesos que lleva a un incremento del volumen ocupado por este fluido en el SNC (Rekate, 2009). Existen 2 tipos de hidrocefalias que atendiendo al criterio del flujo del LCR se clasifican en: Hidrocefalia comunicante e hidrocefalia obstructiva.

- Hidrocefalia Comunicante:

Suele ser causada por la interrupción del equilibrio en el flujo de LCR. La hidrocefalia comunicante ocurre cuando el flujo del líquido cerebroespinal se ve bloqueado después de salir de los ventrículos hacia el espacio subaracnoideo de la médula espinal. Esta forma se denomina comunicante porque el líquido cerebroespinal aún puede fluir entre los ventrículos, que permanecen abiertos (Rekate, 2009).

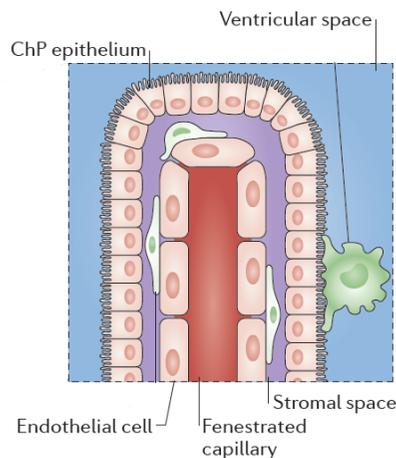
- Hidrocefalia Obstructiva:

Es ocasionada cuando el flujo del líquido cefalorraquídeo se ve bloqueado a lo largo de una o más de las vías estrechas que conectan los ventrículos con el espacio subaracnoideo. Puede ser causado por quistes, tumores, hemorragias, infecciones,

malformaciones congénitas, y más comúnmente por estenosis del acueducto de Silvio o bloqueo del acueducto cerebral (Cheng y col., 2015).

### 3.2 Producción de líquido cefalorraquídeo. Plexo coroideo

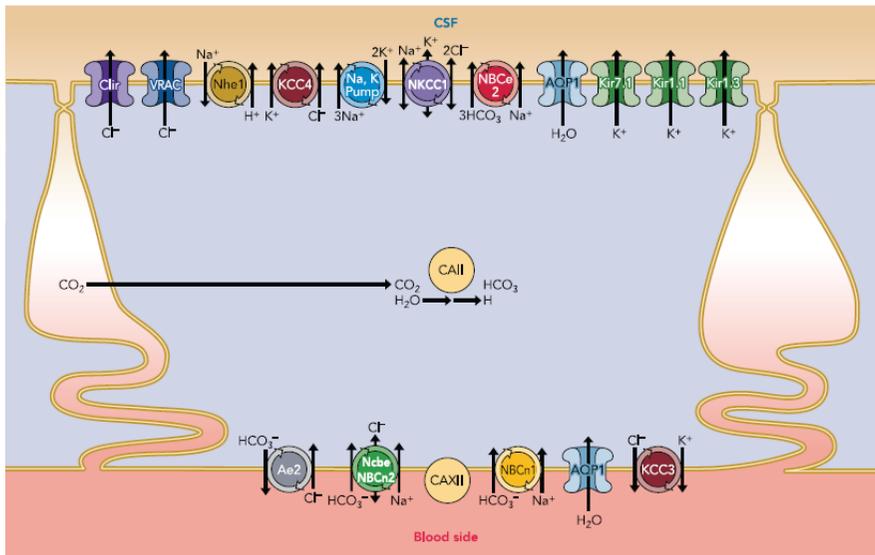
Dentro del sistema ventricular del cerebro residen 4 plexos coroideos: uno en cada ventrículo lateral, otro en el tercer ventrículo y el último en el cuarto ventrículo. Hay una red vascular rodeada por una sola capa de células epiteliales aproximadamente cúbicas que están unidas por uniones estrechas y conforman la barrera entre la sangre y LCR (Figura 6)(Lun y col., 2015).



**Figura 6. Estructura de los plexos coroideos.** En los plexos coroideos (PC) células epiteliales se disponen rodeando los capilares y tejido conectivo. Modificado de (Lun et al., 2015).

El plexo coroideo humano expresa una amplia gama de transportadores. Muchos de éstos están distribuidos de forma asimétrica entre la membrana apical y basolateral lo cual indica la participación en el

transporte vectorial. La secreción de iones en LCR supera en gran medida el flujo de reabsorción de iones en los ventrículos. Entre los transportadores y canales presentes en el borde en cepillo, se encuentran los de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ , participando en la producción y homeostasis de LCR (Figura 7) (Spector y col., 2015).



**Figura 7. Representación esquemática de transportadores de iones y canales de agua en el epitelio del plexo coroideo.** AQP1 se encuentra tanto en la cara apical como en la basolateral. Los intercambios iónicos que se producen a través de los transportadores, participan en la regulación en la producción de LCR y mantenimiento de la homeostasis. Tomado de (Damkier y col., 2010).

### 3.3 Papel de las AQPs en hidrocefalia de humano

Existen pocos estudios que relacionan AQP1 con la hidrocefalia, donde la mayoría se centra en modelos animales de hidrocefalia congénitos o inducidos. En humanos, aunque no queda claro el patrón de expresión de AQP1 en hidrocefalia, la mayoría de estudios apuesta por una disminución

poco significativa de la expresión, sugiriendo ser un mecanismo adaptativo que actúa para disminuir la producción de LCR y la presión intracraneal (Kalani y col., 2012).

Hasta la fecha sólo se ha verificado el aumento de la expresión de AQP4 en modelos animales con hidrocefalia, no siendo así en humanos, en los que únicamente se ha medido la cantidad de AQP4 en LCR. Además, recientes estudios han visto que AQP4 participa en el desarrollo e integridad de la epéndima, ya que AQP4 se localiza próxima a la conexina 43 (Cx43), componente principal de las uniones gap presente entre células endimarias. Como consecuencia, AQP4 podría participar en la regulación y producción del LCR por su papel en la adecuada formación de las uniones gap, y que en condiciones de hidrocefalia, su mayor presencia en el LCR sea debida a la denudación del epéndima producida por la dilatación ventricular (Castaneyra-Ruiz y col., 2013).



## **OBJETIVOS**



## OBJETIVOS

Dos grandes Objetivos orientaron el trabajo que aquí se presenta.

- El primero fue entender el papel de AQP4 en la patología de la Neuromielitis óptica (NMO), y desarrollar un sistema de diagnóstico, específico, sensible, rápido y cuantitativo, para la NMO mediante la detección de anticuerpos anti-AQP4 (y anti AQP1) en suero de pacientes.
- El segundo fue estudiar la participación de las principales acuaporinas de cerebro en la homeostasis del líquido cefalorraquídeo (LCR) en situación control y bajo el estímulo hipóxico; y discernir el posible papel de estas proteínas en el desarrollo de la hidrocefalia, usando modelos animales y analizando muestras de LCR de humanos.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**





## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Técnicas de cultivo celular

#### 1.2 Condiciones de cultivo de la línea celular HEK293 (células embrionarias de riñón humano)

La línea celular HEK293 fue utilizada en los experimentos de detección de anticuerpos anti-AQP4 y anti-AQP1 de sueros de pacientes.

La composición del medio utilizado para su cultivo fue la siguiente:

##### Medio de cultivo - HEK293

- DMEN (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (GIBCO)
- 1% Penicilina/Estreptomina (10000 U/ml) (BioWhittaker)
- 10% Suero fetal de ternero (GIBCO) inactivado 30 min a 65°C.

Para el mantenimiento de las células, tanto las silvestres (*wild type*) como las líneas de sobreexpresión de AQP1 y AQP4, se sembraban en placas de poliestireno tratadas para cultivo celular (Nunc, Dinamarca) de 10 cm de diámetro, con 10 ml del medio descrito anteriormente y se mantuvieron en el incubador a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y saturación de humedad.

Los pases se realizaban cada 4 días, cuando alcanzaban una confluencia del 90-95%, a una dilución 1:5 utilizando tripsina 0,25% (Sigma, EEUU) para despegar las células. Las transfecciones se realizaban entre los pases 3 y 15.

### 1.3 Cultivo primario de plexo coroideo de rata

#### 1.3.1 Disección y dispersión de tejido

Para la elaboración del cultivo primario de plexo coroideo de rata, se partió de los tejidos extraídos como se detalla en el apartado 4.3, conservados en un eppendorf de 1,5ml con 0,5 ml de HBSS (Gibco) frío y estéril. Los tejidos fueron fragmentados mecánicamente en campana de extracción de flujo (Telstar Bio II A) con unas tijeras estériles tipo castroviejo con la parte activa curva (WPI, 501234) durante al menos 5 minutos. Con este procedimiento troceamos el tejido, pero para obtener una dispersión a nivel de célula, se incubó el tejido en un tubo de 15ml con 1 ml de solución de digestión que contenía proteasas (pronase, Calbiochem) a una concentración de 4mg/ml. Esta solución fue previamente filtrada con un filtro de 0,22 $\mu$ m para mantener las condiciones de esterilidad. Se dejó incubar en el baño a 37°C durante 10 minutos. A continuación se detuvo la digestión añadiéndole 4ml de HBSS. Para limpiar el homogenado celular se centrifugó a 800x g durante 5 minutos a 4°C. Para una mayor limpieza, tras desechar el sobrenadante, se resuspendió en 6ml de HBSS y se repitieron las mismas condiciones de centrifugado. Tras esto, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 2ml de medio de cultivo, siendo la composición de éste:

#### Medio de cultivo - plexo coroideo-

- DMEN (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (GIBCO)
- 1% Penicilina/Estreptomicina (10000 U/ml) (BioWhittaker)
- 10% Suero fetal de ternero (GIBCO) inactivado 30 min a 65°C.
- Factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Sigma Aldrich)

Seguidamente, para evitar acúmulos, se dispersaron mecánicamente las células con ayuda de una jeringa y aguja de 20 gauges, pasándolas a través de ésta al menos 10 veces. Para el recuento de células fueron retirados 10  $\mu$ l que fueron mezclados a su vez con 10  $\mu$ l de azul de tripano (Trypan Blue, Sigma), producto que tiñe las células muertas. Se contaron teñidas con “*tripan blue*” con contador de células (marca), obteniéndose normalmente suspensiones en torno a un total de  $4 \times 10^5$  células/ml.

#### 1.3.2 Cultivo

Las células se sembraron en placas de 35mm (marca) previamente tratados con colágeno tipo I (marca). El tratamiento de las placas se realizaba del siguiente modo: Se preparaba una dilución 1:10 del colágeno en agua estéril con la que se cubrían completamente la superficie de las placas, dejándose durante 24 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se le retiraba el colágeno y se dejaba secar en condiciones de esterilidad.

En las placas se sembraban un total de  $2 \times 10^5$  células en el mismo medio que se ha descrito anteriormente y se incubaban en condiciones saturadas de humedad, 5%  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ .

Tras 10 horas de incubación, las células epiteliales de plexo coroideo no se han adherido a la placa, pero si lo han hecho los fibroblastos, ya que a diferencia de las epiteliales que se adhieren a las 16-24 horas, los fibroblastos lo hacen entre las 6-10 horas. De este modo, para evitar la contaminación de nuestro cultivo con fibroblastos, se retiraba el medio a las 10 horas y se sembraba en una placa nueva. De nuevo, se pasaba al incubador y esta vez se trataba de evitar cualquier tipo de manipulación durante al menos 48h. El medio se le cambiaba cada 2-3 días, evitando que se consumiese el factor de crecimiento epidérmico (EGF), conservándose las condiciones óptimas de proliferación.

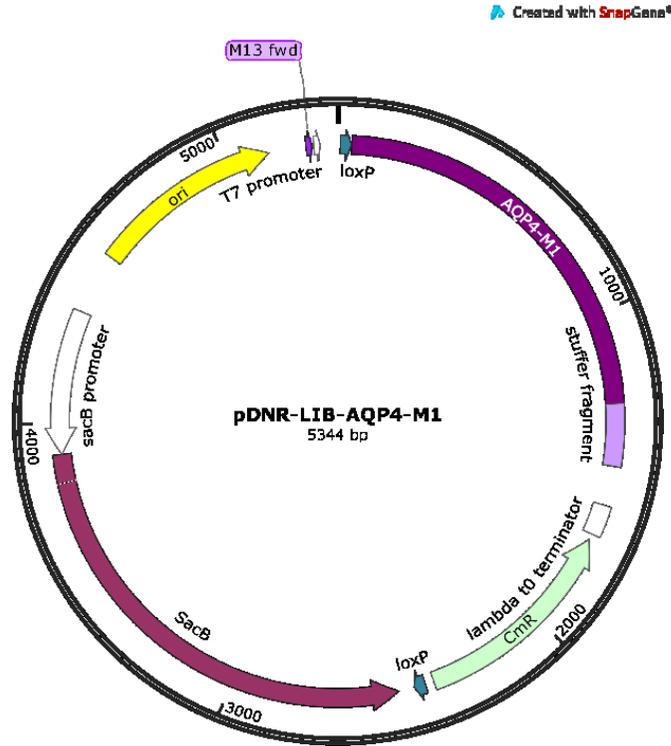
Para aumentar la pureza de nuestro cultivo y reducir al máximo los fibroblastos, en el primer cambio de medio se le agregaban a éste  $20\mu\text{l}$  de cis-4-Hydroxy-D-proline (Sigma) ( $25\mu\text{g}/\text{ml}$ ), el cual actúa inhibiendo el crecimiento de los fibroblastos. Los experimentos se realizaban cuando al menos habían transcurrido 6-7 días tras la extracción celular.

## 2. Técnicas de biología molecular

### 2.1 Generación de las construcciones del cDNA de AQP4 humana

Con la idea de sobreexpresar el gen de AQP4 en las células HEK293, se elaboraron construcciones génicas donde un vector de expresión incluía la secuencia codificante para este gen.

Originalmente el gen estaba inserto en el plásmido comercial pDNR-LIB (BD Biosciences Clontech) (Figura 8), el cual contenía la secuencia que codificaba la isoforma M1 (972pb) de AQP4, más larga que la isoforma M23 (906pb), lo cual permitía que a partir de esa construcción se pudiese obtener las dos isoformas. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificarlas por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y seguidamente clonarlos en un vector de expresión como pCDNA3 (Invitrogen) y pEGFP-N (Clontech).



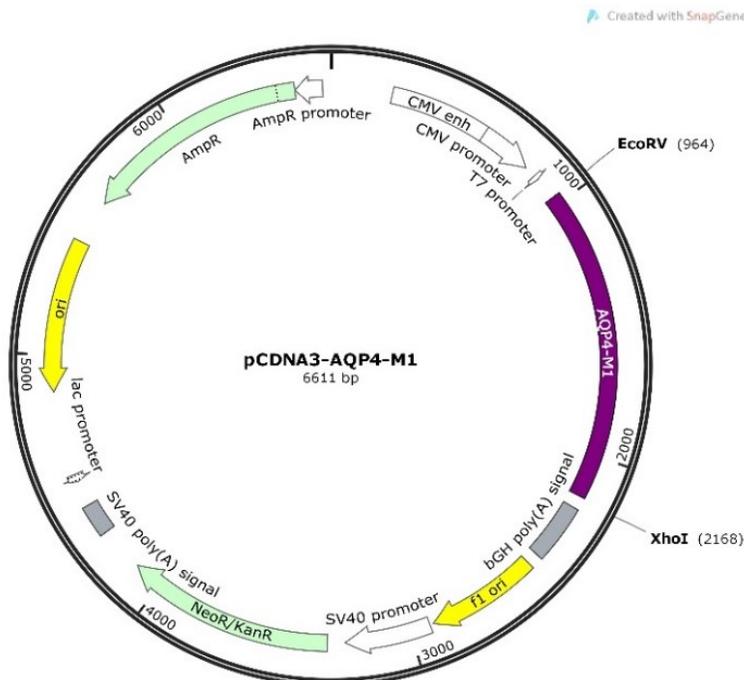
**Figura 8. Estructura de la construcción pDNR-LIB-AQP4<sub>M1</sub>.** Plásmido que contenía la secuencia del gen de AQP4, a partir de la cual se obtuvo las 2 isoformas M1 y M23. El vector pDNR-LIB contiene dos sitios loxP que permiten que cualquier inserto sea colocado en el MCS (multiple cloning site) para ser transferido a otro vector aceptor usando la recombinasa Cre. El vector posee un gen de resistencia a cloranfenicol, importante para la selección de bacterias que portan el plásmido.

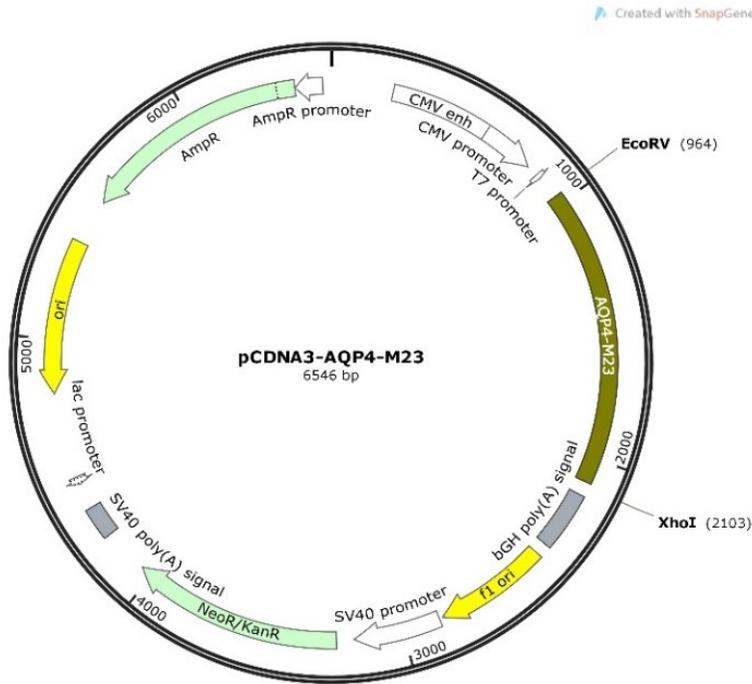
En el proceso de clonación en pCDNA3 (Figura 2), se diseñaron oligonucleótidos (Tabla 3) conteniendo en el extremo 5' los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción *EcoRV* para el *forward* y *XhoI* para el *reverse*, que permitieron la inserción unidireccional del cDNA en el plásmido.

Nombre	Secuencia
Forward M23 – EcoRV	ACTCGATATCGGGCGGTGGGGTAAGTCTGGAC
Forward M1 – EcoRV	ACTCGATATCGGAAGGCATGAGTGACAGACC
Reverse – XhoI	ACTCCTCGAGAATGGGTGGAAGGAAATCTGA

**Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos usados para la clonación de las dos isoformas de AQP4, M1 y M23, en pCDNA3.** En rojo se indica la secuencia diana añadida correspondiente con los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción.

Una vez amplificada la secuencia que codificaba cada isoforma, tanto éstas como el plásmido pCDNA3 eran cortados con las enzimas de restricción *EcoRV* y *XhoI* y ligados seguidamente, obteniéndose los clones listos para ser transfectados.



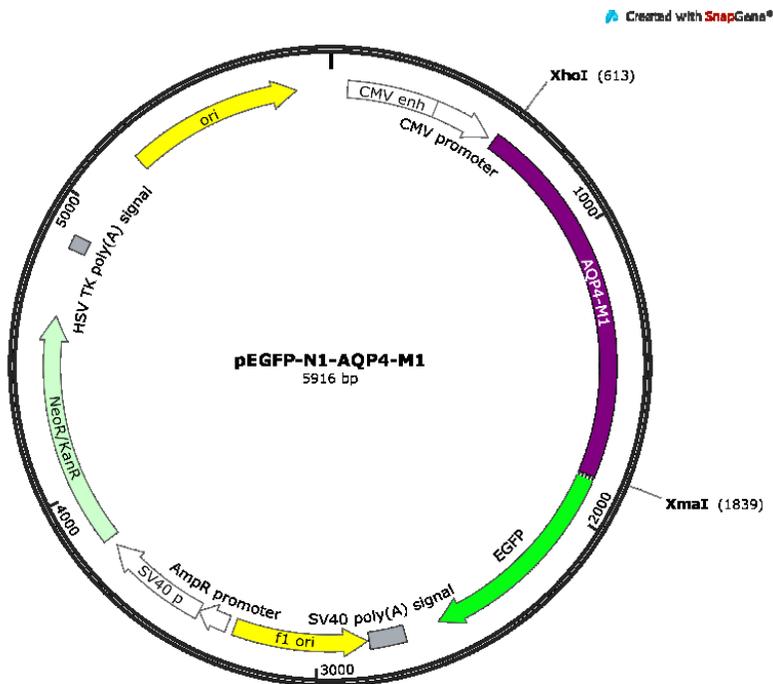


**Figura 9. Clonación de las isoformas de AQP4, M1 y M23, en el vector de expresión pCDNA3.** En el esquema se muestra la estructura de las construcciones pCDNA3-AQP4<sub>M1</sub> y pCDNA3-AQP4<sub>M23</sub> sucesivamente. El plásmido pCDNA3 es un vector diseñado para una elevada expresión en células de mamíferos de forma estable o transitoria. Contiene el promotor CMV que permite obtener altos niveles de expresión en células de mamífero. El vector posee un gen de resistencia a ampicilina, importante para la selección de colonias bacterianas que portan el plásmido, y también un gen de resistencia a neomicina.

Para la clonación de las isoformas en el plásmido pEGFP-N1 (Figura 3), que permite la expresión de una proteína de fusión fluorescente (AQP4-EGFP), se utilizó la misma estrategia descrita arriba, diseñándose para ello nuevos oligonucleótidos (Tabla 4) a los que también se les añadieron secuencias específicas para el reconocimiento de las enzimas de restricción, *XhoI* y *XmaI*.

Nombre	Secuencia
Forward M23 – XhoI	ACTGCTCGAGAGGCCGGTGGGGTAAGTGTGGAC
Forward M1 – XhoI	ACTGCTCGAGGAAGGCATGAGTGACAGACC
Reverse – XmaI	ACTGCCCGGATACTGAAGACAATACCTCTCC

**Tabla 4.** Secuencia de oligonucleótidos que codifican las dos isoformas de AQP4, M1 y M23, para la clonación en pEGFP-N1. En rojo se indica la secuencia diana añadida correspondiente con el sitio de reconocimiento XhoI en el caso del forward y XmaI en el del reverse.





## 2.2 Transfecciones de cultivos celulares de HEK 293

Las transfecciones en líneas celulares se realizaron mediante lipofección (Lipofectamine 2000, Invitrogen) (Figura 11). El día anterior a la transfección, al cultivo se le sustituía el medio por el mismo sin suero ni antibióticos, ya que el suero afecta a la actividad de la lipofectamina y los antibióticos pueden dañar la célula por los poros que produce en la membrana plasmática. Para la formación de los complejos plásmido-lipofectamina se realizaron en medio OPTI-MEM (Gibco), usando los volúmenes indicados por el fabricante. La mezcla se homogeneizó y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente (t.a.). Esta mezcla se añadió gota a gota en la placa que contenía el cultivo. Las placas se incubaron a 37°C durante 6 h. Transcurrido este tiempo, se le sustituía el medio por el DMEN completo.

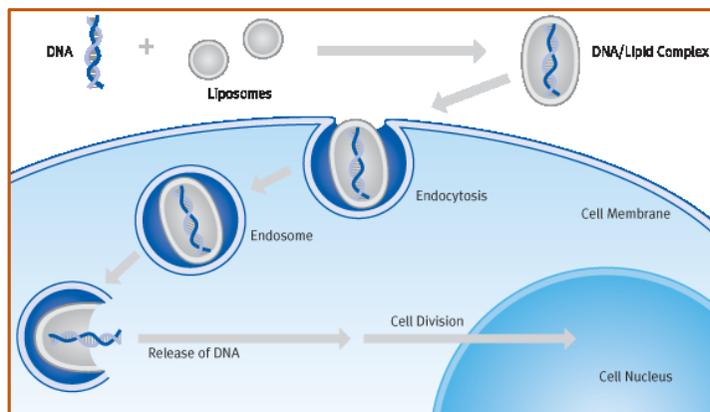


Figura 11. Proceso de lipotransfección.

### 2.3 Cultivos estables HEK293-pEGFP-N<sub>1</sub>-AQP4

Mediante el procedimiento de transfección, se obtiene un cultivo transitorio, pero el interés final era tener un cultivo estable. Para ello, en el primer pase de las células se sembraron a una dilución elevada (1:30), de este modo las células crecerían lo suficientemente dispersas como para poder seleccionarlas. Tras unos 4 días de crecimiento, se procedía a picar las colonias formadas de la siguiente manera: En las condiciones máximas de esterilidad, bajo una lupa (Olympus SZX10), con una pipeta P10, se iban retirando colonias aisladas y estas se sembraban directamente en placa de 24 pocillos (Nunc) con medio DMEN completo más geneticina (20 mg/ml) (G418, Gibco). La placa se incubaba a 37°C. Los cultivos estables se realizaron con las transfecciones del clon pEGFP-N<sub>1</sub>-AQP4, construcción que lleva asociada al gen de interés el gen para la proteína fluorescente, EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein). Esta simultaneidad de expresión nos permitirá ver bajo el microscopio invertido de fluorescencia (Olympus IX-71) con el filtro FITC (Fluorescein isothiocyanate) qué células de las que hemos seleccionado expresan la AQP4, ya que al microscopio se verán verdes. Transcurridos al menos 4 días, se verificaba la pureza de los cultivos seleccionados bajo el microscopio y se seleccionaban como candidatas definitivas para el cultivo estable, sembrándolas en una nueva placa de un tamaño mayor.

## 2.4 Western Blot

### 2.4.1 Extracción de proteínas

Tras los diferentes tratamientos a los que fueron expuestas las células, las proteínas se extrajeron del siguiente modo: Las células eran lavadas con PBS frío a pH 7.4 y se recogían en 1ml de PBS 1x con ayuda de un recolector (cell scraper, Sarstedt). Las células resuspendidas se recogían en un *ependorf* y se centrifugaban durante 5 min a 300 x g a 4°C. Para la extracción de proteínas del plexo coroideo, también se realizaba un paso de centrifugación para eliminar los restos de PBS presente en la muestra.

Los *pellets* obtenidos eran resuspendidos en un tampón de extracción de proteínas. En el caso del tejido, para una mejor disgregación, se pipeteaba repetidas veces hasta dejar de apreciar a simple vista la morfología membranosa. Tras 5 min en hielo las muestras se homogenizaban con un vórtex durante 10 segundos y se centrifugaba a velocidad máxima (Eppendorf, 5415R) a 4°C durante 15 min. Finalmente se recogía el sobrenadante y conservaba a -20°C hasta su uso.

La concentración de proteínas se determinaba por el método Bradford utilizando el kit comercial Biorad Protein Assay (Biorad, EEUU).

### 2.4.2 Electroforesis SDS-PAGE, transferencia e inmunodetección

Para el análisis de proteínas por western blot se usaron 20 µg de proteínas totales. En primer lugar se desnaturalizaban sometiéndolas a choque térmico de 95°C durante 5 min en tampón de carga, para correrlas

en un gel de poliacrilamida al 10% bajo condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) utilizando el sistema Mini-protean (Biorad). La electroforesis se realizó a 150mV en la misma solución de carga (ver abajo su composición).

Los geles se transferían a membranas PVDF (polifluoruro de vinilideno; Hybond-P; Amersham Biosciences, EEUU), previamente activadas con metanol, en un sistema de transferencia semi-seca (Sigma) durante 2 horas a 52,8 mA y utilizando una solución de transferencia, cuya composición se indica a continuación.

Tras la transferencia las membranas se pasaban a 0.1% Tween 20 en PBS (PBTw 0.1%) y se bloqueaban durante 2 horas en solución bloqueante cuya composición se describe abajo, para luego ser incubadas durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario a dilución óptima (Tabla). Tras la incubación con el anticuerpo 1º las membranas se lavaban 4 veces en PBTw 0.1% durante al menos 5 min e incubaban 1 hora a t.a. en solución bloqueante con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa a la dilución óptima (Tabla). Finalmente, se hacían 4 lavados de 5 min en PBTw 0.1% y se procedía al revelado por quimioluminiscencia utilizando el kit ECL PLUS Western Blot Detection System (GE Healthcare, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante. La fluorescencia emitida se detectaba mediante el lector Typhoon 9400 Variable Mode Imagen y se cuantificaba utilizando el programa Image J (NIH).

### Soluciones utilizadas

- **Tampón de extracción de proteínas:** 50 mM HEPES pH 7.3 (ajustado con KOH), 5 mM EDTA pH 8, 250 mM NaCl, 5 mM DTT, y 0.2 % NP-40. Se le añadía justo antes de la extracción de proteínas, un cocktail de inhibidores de proteínas (Sigma) a una concentración final de 1/100, ortovanadato sódico ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) y fluoruro de fenilmetil sulfonilo (PMSF) a una concentración final de 1 mM.
- **Tampón de carga:** 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% glicerol, 2% SDS, 100 mM DTT y 0.004% Bromophenol blue.
- **Tampón de electroforesis:** 25mM Tris, 192mM glicina y 0.1% SDS.
- **Solución de transferencia:** 25 mM Tris, 192 mM glicina y metanol al 20 % (v/v).
- **Solución bloqueante:** 5% (p/v) leche desnatada en polvo (Central Lechera Asturiana, España) en PBTw-0.1%

## 2.5 Análisis de expresión de ARN mensajeros

### 2.5.1 Extracción de ARN total

Los estudios de expresión génica se llevaron a cabo mediante la extracción de ARN total de los tejidos o células en cultivos primarios de PC. La cantidad de material dependió del experimento y del tipo de muestra.

El tratamiento del material, tanto en la disgregación como en el procesado para la extracción de ARNm fue diferente según el caso:

#### *Cultivo primario de plexo coroideo*

Se añadía 1 ml de TRIzol (Invitrogen) al cultivo celular y las células se levantaban de la placa con la ayuda de un *scraper*. Una vez resuspendidas, el homogeneizado se recogía con una pipeta de la placa y se pasaba a un tubo *ependorf* libre de ARNasa. A continuación se incubaba durante 5 minutos a

t.a. Con el fin de separar las proteínas se añade 200  $\mu$ l de cloroformo por cada ml de TRIzol. Se agitaba vigorosamente y dejaba 2-3 minutos a t.a. A continuación la mezcla se centrifugaba a no más de 12000 x g 15 min a 4°C. Tras la centrifugación se podía observar tres fases bien diferenciadas, de las cuales se recogía cuidadosamente la fase superior acuosa y pasaba a un *ependorf* limpio. Se añadían 500  $\mu$ l de isopropanol para precipitar el ARN (500  $\mu$ l/ml de TRIzol), agitándolo suavemente e incubando 10 minutos a t.a. y terminar centrifugando a 12000 x g 10 minutos a 4°C. El pellet de ARN se lavaba con etanol 75% frío y se centrifuga a 7500 x g, y se deja secar en hielo para resuspenderlo finalmente en agua desionizada libre de ARNasa.

#### *Plexo coroideo*

El instrumental utilizado para la cirugía y disección se trató previamente con etanol 70% y con RNaseZap (Ambion). Las soluciones utilizadas se trataron con Dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma) para inhibir las ARNasas. Los PC se recolectaban en un *ependorf* libre de ARNasas, se congelaban inmediatamente en nitrógeno líquido y se guardaban a -80°C hasta realizar la extracción del ARN.

La extracción se realizó mediante el kit RNeasy Micro Kit (Qiagen). A la muestra se le añadía 350 $\mu$ l de solución de lisis RLT (Qiagen) con 3,5 $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma) y se homogenizaba en el politrón (Pro Scientific, Inc-02-07075). La extracción se continuaba según las indicaciones del fabricante.

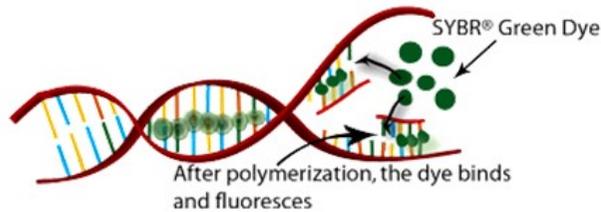
La cantidad de ARNm se cuantificó midiendo la densidad óptica a 260 nm en el NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, EE.UU.). Las muestras se guardaban a -80°C hasta su utilización.

### *2.5.2 Retrotranscripción*

La transcripción inversa siempre se inició con 5 µg de ARN en el caso de las células, previamente tratado con DNasa I (Roche, Alemania) a fin de eliminar el ADN genómico contaminante. En el caso del plexo partimos de 1 µg a causa de la poca cantidad obtenida. La retrotranscripción se llevó a cabo usando el kit SuperScript II RNase H- reverse transcriptase (Invitrogen). El ARN se incubaba con una mezcla de 50 ng de Random Hexamers y 1mM de dNTPs, durante 5 min a 65°C. Posteriormente se añadía a la mezcla 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 40U de inhibidor de RNasas y 50U de la enzima SuperScript II. Esta mezcla se incubaba a 25°C durante 15 min, después a 42°C durante 50 min y por último se inactivaban las enzimas incubando a 72°C durante 15 min. Se llevaba a cabo un paso opcional de eliminación de ARN añadiendo 1 µl de ARNasaH e incubando a 37°C durante 20 min. El ADN complementario (ADNc) obtenido se conservaba a -20°C hasta su uso.

### *2.5.3 PCR cuantitativa o en tiempo real (PCRq)*

La amplificación del ADN en una reacción de PCRq tiene tres fases bien diferenciadas: exponencial, lineal y de meseta. La monitorización de dichas fases en tiempo real es posible mediante el empleo de fluorocromos como el SYBR Green (Applied-Biosystems); esta molécula se intercala en el surco menor de la doble hélice de ADN y fluoresce cuando es irradiada con luz ultravioleta.



**Figura 12.** Dibujo que muestra el proceso de unión del SYBR Green a las nuevas cadenas de ADN sintetizadas.

La cuantificación por PCR a tiempo real se basa en el hecho de que, durante la fase exponencial de la reacción, la cantidad de ADN amplificado es directamente proporcional a la cantidad de ADN molde inicial. El parámetro principal que nos va a permitir la cuantificación es el denominado "Ct" (Threshold Cycle), el ciclo en el cual comienza a detectarse la amplificación del ADN.

Las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron utilizando el sistema "ABI Prism 7000 y 7500 Sequence Detection System" (Applied-Biosystems, Inglaterra). El protocolo optimizado de PCR, según las recomendaciones del fabricante, consistió en una primera fase de 10 min a 95°C y una segunda con 45 ciclos de 15 seg de desnaturalización a 95°C y 1 min de amplificación a 60°C.

Los oligonucleótidos se diseñaron con el programa "Primer Express" Versión 2.0 (Applied-Biosystems). Cada pareja de oligonucleótidos fueron diseñados para generar un amplicón de no más de 150-200 nucleótidos, tal y como recomienda el fabricante para una óptima eficiencia de la reacción. En la Tabla 5 se muestra un listado de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los diferentes genes analizados por PCRq.

Las reacciones de PCR se realizaron por triplicado en un volumen total de 30  $\mu\text{l}$  que contenía 15  $\mu\text{l}$  de Master mix SYBR Green (Applied-Biosystems), 150-300nM de oligonucleótidos específicos y 0,1-1  $\mu\text{l}$  de ADNc.

Tras el protocolo de amplificación, se incluyó un paso adicional que consistió en un aumento progresivo de la temperatura de 60 a 95°C para obtener la “curva de disociación”. Con este protocolo se obtiene la temperatura de disociación o  $T_m$  (*Temperature of melting*) del fragmento de ADN amplificado. La curva de disociación permite, por un lado, comprobar si la  $T_m$  obtenida se corresponde con el valor teórico para el amplicón y, por otro, diferenciar los productos específicos de la amplificación de los *primer-dimers*. En todos los experimentos realizados se comprobó que las curvas de disociación mostrasen un pico único de fluorescencia y que coincidiera con el valor teórico de la  $T_m$  para cada fragmento amplificado.

Gen	Sense 5' → 3'	Antisense 5' → 3'
<b>AQP4 (m)</b>	GCGGTGGGGTAAGTGTGGA	TTCTCCACGGTCAATGTCA
<b>AQP4 (r)</b>	TGGCAGGTGCACTTTACGAGT	CAGCTTTGCTGAAGGCTTCCT
<b>AQP1 (m)</b>	TTCACTTGGCCGCAATGA	CCAGCTGCAGAGTGCCAA
<b>AQP1 (r)</b>	CCATTGACCACTGGCAGTAGTACA	AGTGTCTGACCTGTGAAGTGAGTA
<b>AQP9 (m)</b>	GGAAAAGTCTCGTCGTAGG	CCCAGGTTTCTGGAGTCAAAA
<b>18s (m)</b>	AACGAGACTCTGGCATGCTAA	GCCACTTGTCCTCTAAGAAGT
<b>HPRT (r)</b>	AGTCCCAGCGTCGTGATTAG	CCATCTCCTTCATGACATCTCG
<b><math>\alpha 4</math> INTEG</b>	GGCAAGGAAGTCCAGGTTACAT	ATGCTTCTGTAATCACGTCAGAA
<b>CYCLO</b>	ATGGCAAATGCTGGACCAAAA	CATGTCGTCCCAGTTGGTAACA
<b><math>\beta</math>-ACTIN</b>	AGGCCAACCGTGAAAAGATG	GCCTGGATGGCTACGTACATG

**Tabla 5. Oligonucleótidos diseñados para la PCRq.** En la tabla se muestran las secuencias de los oligonucleótidos sense y antisense diseñados para la PCR cuantitativa.

Para el análisis de los resultados se empleó el método de cuantificación relativa. No obstante, siempre se determinó la eficiencia de

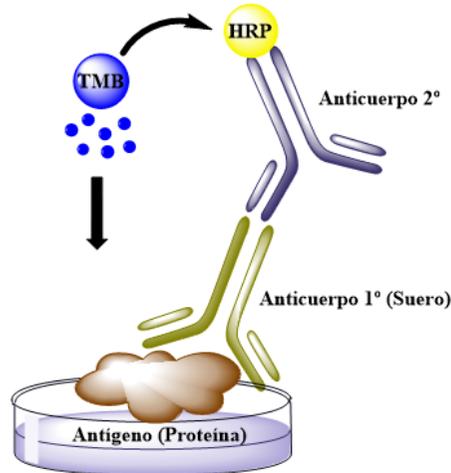
las reacciones mediante la construcción de rectas patrón del gen constitutivo y del gen a estudiar.

### 3. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

La técnica ELISA o “ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas” es una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo primario que a su vez es reconocido por un anticuerpo secundario que lleva enlazado una enzima que genera un producto detectable. La aparición de colorantes permite medir indirectamente mediante espectrofotometría el antígeno en la muestra. Existen múltiples variantes de la técnica, entre las que destacan el ELISA directo, indirecto y *sandwich*. En nuestro caso se emplearon las modalidades: indirecta y en *sandwich*.

#### 3.1 ELISA indirecto

El sistema de detección consiste en una placa a la que se le une el antígeno, proteína en nuestro caso, que es detectada con un anticuerpo primario, siendo éste detectado a su vez por un anticuerpo secundario que lleva unido una enzima catalizadora de un sustrato, cuyo producto resultante es el que se detecta como indicador de los niveles de anticuerpo de interés (Figura 13). En nuestro caso, se quiso detectar presencia de anticuerpos anti-AQP1 en suero de pacientes.



**Figura 13. ELISA indirecto.** En la imagen se muestra el proceso que se lleva a cabo en un ensayo de ELISA indirecto. En la placa se pega el antígeno, que es detectado con un anticuerpo primario específico, y este a su vez es reconocido por un secundario que lleva una molécula de HRP unida y que permite ser reconocido por el sustrato que se produce al entrar en contacto con el TMB.

### 3.1.1 Extracción de proteínas

Como antígeno se usó un *pool* de proteínas totales extraídas a un cultivo celular de HEK293, que previamente fue transfectado con la construcción pcDNA3-AQP1 humano disponible en el laboratorio. De este modo, las proteínas que se obtuvieron estaban enriquecidas con la proteína AQP1 humana. La extracción se realizó del siguiente modo:

A células HEK293-transfectadas con AQP1 y sembradas en una placa de 10 cm de diámetro, se les retiraba el medio, para ser despegadas con 2ml de tripsina al 0.25% (Gibco). A continuación se inactivaba con 5 ml de medio y se recogían en un tubo de centrifuga de 15 ml. Se centrifugaba a 300 xg, 4°C durante 5min y el *pellet* se resuspendía en 1 ml de PBS (Gibco) para limpiar la muestra de restos de medio y tripsina. De nuevo, se centrifugaba en las mismas condiciones, y el *pellet* se resuspendía en 500 µl de *buffer de*

*lisis*, preparado el mismo día. La muestra se agitaba en el vórtex y se dejaba 15 min en hielo. A continuación, se pasaba el volumen a un *ependorf* y se centrifugaba a máxima velocidad durante 15 min a 4°C, de este modo se separan los restos celulares de las proteínas. El sobrenadante, que es donde quedan las proteínas, era conservado en otro tubo a -20°C hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford, utilizando el kit BioRad Protein Assay (BioRad, EE.UU.) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 3.1.2 Detección de anticuerpos

La detección de anticuerpos anti-AQP1 en el suero de pacientes se hizo del siguiente modo:

Las proteínas previamente extraídas y cuantificadas eran pegadas en una placa de 96 pocillos para ELISA (96 well Microwell MaxiSorp, Nunc), que presentan alta afinidad por proteínas con dominios tanto hidrofóbicos como hidrofílicos. Para ello, se diluían las proteínas a 20µg/ml en buffer carbonato 0.01M y se añadían 50µl de la mezcla a la placa; se cubría con adhesivo y se incubaba toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, la placa se lavaba 3 veces en 0.05% Tween 20 en PBS (PBTw 0.05%), más un lavado con PBS 1x. A continuación, se incubaba la placa con SuperBlock Blocking Buffer (ThermoScientific) durante 1 hora a t.a. Transcurrido este tiempo, se volvía a lavar 3 veces en PBTw 0.05% más uno en PBS 1%. Como anticuerpo primario, se usaba el suero de paciente sin diluir, o el anticuerpo comercial anti-AQP1 (ab15080) a una dilución

1:10.000 en PBS con 2% de BSA (albúmina sérica bovina), y se dejaba incubar toda la noche a 4°C. Pasado el tiempo de incubación, se lavaba la placa igual que se ha descrito anteriormente, para incubarse con el anticuerpo secundario (Tabla 9) durante 1 hora a t.a. Estos anticuerpos llevan unida la enzima peroxidasa de rábano (HRP), la cual cataliza la transformación de un sustrato soluble a otro insoluble. A continuación se realizaban de nuevo los lavados como antes se ha descrito, y se incubaba con 100 µl de 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (TMBOne solution, Promega) 15 min a t.a., sustrato que será catalizado por la enzima HRP observándose un cambio de coloración al azul. Esta reacción se detuvo con ácido clorhídrico 1N, cambiando la coloración al amarillo. Inmediatamente, se pasaba a cuantificar los niveles de anticuerpo mediante la medición de densidad óptica en el espectrofotómetro (Multiskan Spectrum-Thermo). Para la cuantificación, la curva patrón se obtuvo realizando diluciones seriadas del anticuerpo comercial (1:4000, 1:8000, 1:16000, 1:32000, 1:64000, 1:128000, 1:256000, 1:512000).

### Soluciones utilizadas

- **Buffer de lisis:** 137 mM NaCl, 20 mM Tris (pH=8), 1% Igepal (detergente no iónico, no desnaturizante), 10% glicerol, inhibidor de proteasas (10 µl/ml).
- **Buffer carbonato:** 0,1M a pH=9,6. 60% de Solución A: NaHCO<sub>3</sub> (4,2g/500ml); 40% de Solución B: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (14,3g/500ml). Se ajusta el pH una vez mezclados.

### 3.2 ELISA *sándwich*

Para la detección de proteínas de AQP4 y AQP1 en muestras de líquido cefalorraquídeo se realizó la técnica de ELISA en *sándwich*. Se utilizó un kit comercial tanto para AQP1 como AQP4 (USCN Business Co., Ltd.) y se siguieron las indicaciones del fabricante. Como antígeno para el ensayo se utilizaban muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes con hidrocefalia y sin hidrocefalia o controles sanos (Tabla 7).

En este caso, los pocillos de la placa comercial vienen cubiertos con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de anticuerpo, se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido, se aplica una solución con un segundo anticuerpo marcado. Así, pues, cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca.

## 4. Animales de experimentación

Se han utilizado ratas Wistar, ratones C57, ratones hidrocefálicos *hop gait* (hyh, B6C3Fe  $\alpha/\alpha$ -Napa<sup>hyh</sup>/J) y el ratón KO de AQP1. Los ratones hidrocefálicos *hop gait* (hyh), fueron generosamente cedidos por el laboratorio del Dr. Antonio Jesús Jiménez Lara (Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología Facultad de Ciencias; Universidad de Málaga). Estos ratones presentan una mutación en el gen  $\alpha$ -SNAP, también conocido

como Napa, que consiste en la sustitución de una G por una A en el exón 4 del gen Napa resultando la sustitución de una metionina conservada por una isoleucina (M105I). Los ratones homocigotos silvestres y heterocigotos de esta línea, se mantuvieron en cruce para obtener los diferentes genotipos posibles. Los ratones homocigotos para la mutación que se lograban tenían una supervivencia de entre 20-30 días.



**Figura 14. Fotografía que muestra el fenotipo de la línea HOP GAIT.** El ratón de la izquierda, silvestre, tiene un cráneo normal, y el ratón de la derecha, hyh, tiene un cráneo agrandado y redondeado, típico de la hidrocefalia.

También se dispuso del ratón KO de AQP1 (Ma et al, 1998) cedido amablemente al laboratorio por el Dr. Walter Boron (Case Western Reserve University, Cleveland, OH). Mediante cruces de ratones heterocigotos para el gen de AQP1 se obtuvieron los tres genotipos diferentes; heterocigotos que sirven para renovar los parentales y mantener la colonia, homocigotos positivos para AQP1 (silvestres) y homocigotos negativos o KO. Los experimentos se realizaron tanto en ratones KO de AQP1 como en silvestres.

Los roedores fueron suministrados y estabulados por el Animalario de la Universidad de Sevilla y por el Servicio de Producción y Experimentación Animal del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS). La estabulación se realizó en jaulas ventiladas, con temperatura constante ( $22\pm 1^\circ\text{C}$ ), con ciclos alternantes de luz-oscuridad de 12 h, y con libre acceso al alimento y al agua. Para el manejo experimental y su posterior sacrificio los animales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de tiobarbital (B/Braun), a una dosis eutanásica de 200 mg/kg en el caso de las ratas, o mediante dislocación cervical en el caso de los ratones. Ambas drogas fueron suministradas por la Farmacia del Hospital Virgen del Rocío. Todos los animales fueron manipulados y tratados de acuerdo a la guía de cuidados de animales de laboratorio del Consejo Comunitario Europeo (86/609/EEC). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación con Animales de la Universidad de Sevilla.

#### 4.1 PCR convencional para genotipado de ratones

##### 4.1.1 Ratones hidrocefálicos *hop gait (hyh)*

El genotipado de los ratones hidrocefálicos se realizó mediante una PCR estándar, seguida de una digestión enzimática (L.F. Bátiz et al.). En primer lugar se realizaba la PCR para amplificar la secuencia del gen *Napa*, obteniéndose tanto en homocigotos para la mutación como en silvestres, un fragmento de ADN del mismo tamaño (108 pb). Para poder discernir entre un genotipo u otro, era necesario realizar una restricción de la secuencia amplificada por PCR con la enzima de restricción *BspHI*, ya que la secuencia

que reconoce esta enzima se ve modificada en la mutación, realizándose únicamente el corte en el gen silvestre (Figura 7).

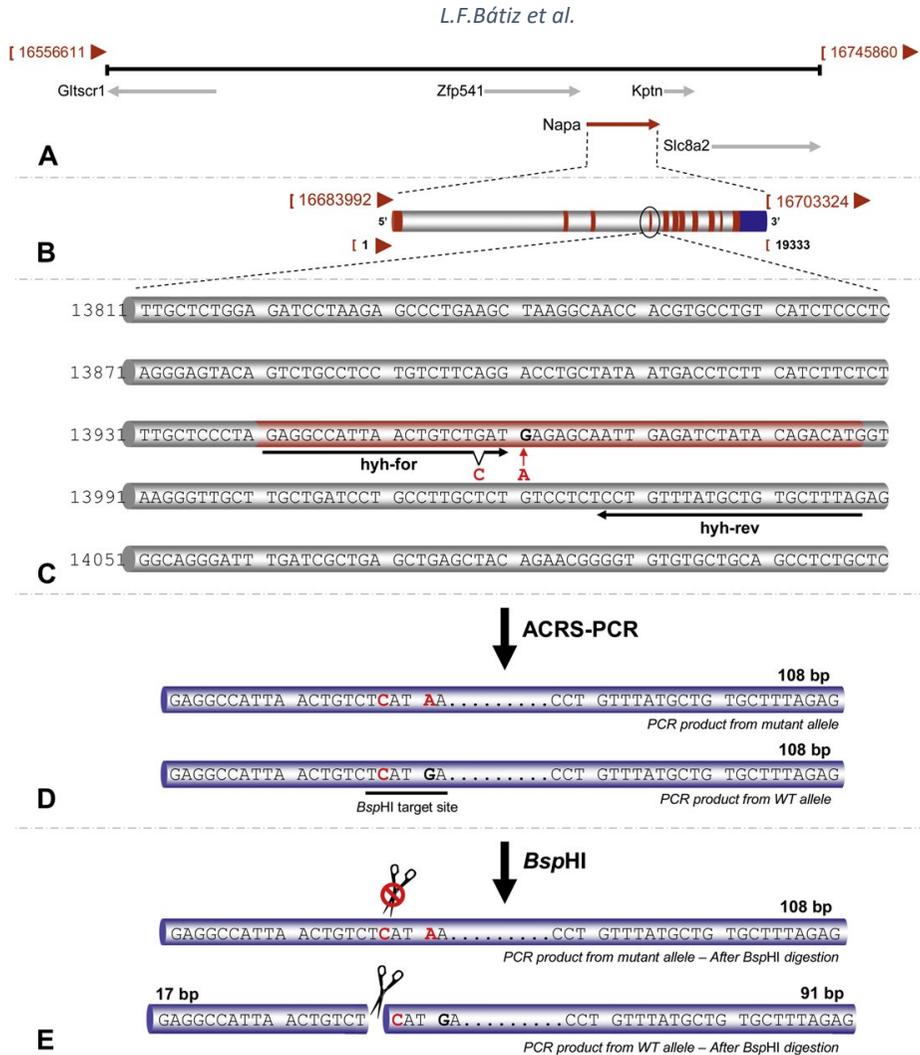


Figura 15. Procedimiento de genotipado en ratones hidrocefálicos hop gait (*hyh*).

#### 4.1.2 Ratones AQP1-KO

El genotipado de los ratones se realizó mediante PCR estándar, usando cebadores o “primers” específicos (Ma et al, 1998) que permiten identificar a los ratones homocigotos KO (-/-) por la amplificación de una banda de 460 pares de bases, a los homocigotos (+/+) por una banda de 530 pb y a los heterocigotos (+/-) mediante la amplificación de las dos bandas respectivas.

#### 4.2 Exposición de ratones a hipoxia e hipercapnia

Los animales se sometieron a hipoxia crónica del 10% de O<sub>2</sub> usando cámaras herméticas (COY Laboratory Products INC) (Figura 16). La cámara se compone de una caja estanca de metacrilato, que dispone de una esclusa con doble puerta, que permite la entrada y salida de jaulas de animales sin que se alteren las condiciones en el interior del equipo. También dispone de un sensor de O<sub>2</sub> que permite la monitorización continua de los niveles de este gas. Este sensor regula la inyección tanto de N<sub>2</sub>, para disminuir la presión parcial de O<sub>2</sub>, como de aire para aumentarla; consiguiéndose así mantener estables los niveles requeridos de hipoxia. Para controlar la temperatura y evitar que aumente en el interior de la cámara se dispone de aire acondicionado en la habitación, permaneciendo la temperatura a 22±1°C. La humedad relativa del aire se mantiene entre el 70-80% por dos sistemas; uno que produce condensación de agua mediante enfriamiento y otro que permite la recirculación del aire por unas columnas de gel de sílice (Panreac, España). Los niveles de CO<sub>2</sub> en la cámara permanecen por debajo

del 0,1% mediante un sistema que filtra el aire por columnas de Sodasorb (Grace lab., Francia).

Los animales controles mantenidos en normoxia (21% de oxígeno) se sometieron a las mismas condiciones en la cámara de hipoxia, siendo la única variación la de los niveles de oxígeno.



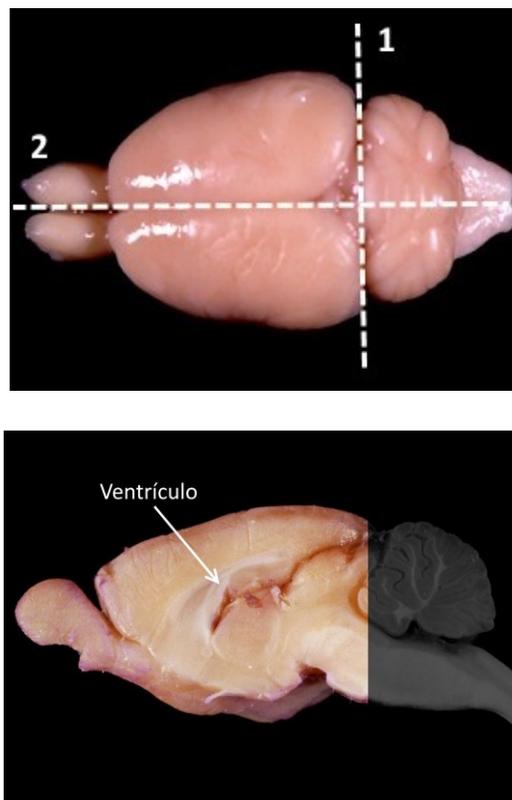
**Figura 16. Cámara de hipoxia.** Fotografía de la cámara de hipoxia utilizada para someter a los animales a un tratamiento crónico de hipoxia, pudiendo controlar estables variables como la humedad.

### 4.3 Obtención de tejidos

Los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical, mientras que a las ratas se les administró una dosis eutanásica de tiobarbital seguido del uso de la guillotina.

Para la obtención del plexo coroideo, se extraía el cerebro completo y se pasaba a una placa con PBS 1x frío. Con la ayuda de un bisturí y unas pinzas, se realizaba un corte para separar el cerebelo, desechándose. Otro corte era realizado sagitalmente, dividiendo el cerebro en dos y que

permitía acceder directamente al ventrículo lateral como se indica en la Figura 17. Con la ayuda de unas pinzas se accedía al ventrículo donde se encuentra el plexo coroideo, siendo extraído con sumo cuidado pinzando en el lugar de anclaje de éste. El plexo era conservado en nitrógeno líquido y luego a  $-80^{\circ}\text{C}$  en el caso de que se fuera a utilizar en experimentos de ARN o proteínas, o se conservaban en PBS frío para ser utilizado inmediatamente en técnicas inmunohistoquímicas o cultivo primario.



**Figura 17. Fotografía de cerebro de rata.** En las imágenes se muestra indicado los lugares de corte para dejar el ventrículo lateral a la vista y así poder acceder fácilmente al plexo coroideo.

## 5. Técnicas inmunológicas

### 5.1 Inmunohistoquímica

Esta técnica fue utilizada para verificar la presencia de AQP1 en el plexo coroideo. Para ello, se extrajeron PC de ratones silvestres y KO para AQP1 de la línea de ratones AQP1-KO. Para este ensayo inmunohistoquímico fue necesario bloquear previamente la enzima peroxidasa endógena del tejido, lo cual se realiza por incubación del tejido durante 30 minutos con peróxido de hidrógeno (Fluka) al 0,4% en PBS 1x. A continuación se bloquea durante una hora con una solución PBS 1x con 10% de suero bovino (Gibco), 0,1% de BSA (albúmina sérica bovina) y 0.3% de Tritón X- 100 (Sigma). Se incuba el tejido con anticuerpo primario policlonal de conejo anti-AQP1 (Tabla 8) toda la noche a 4°C, seguido del anticuerpo secundario anti-conejo biotinilado (1:1, Kit Dako System-HRP DAB) durante 2 horas a t.a. En el paso siguiente se produce la unión de los complejos de avidina-biotina-peroxidasa al secundario biotinilado para amplificar la señal. Seguidamente se procede al revelado de 3 minutos mediante la reacción de la peroxidasa con un sustrato cromogénico, la diaminobencidina (DAB), apareciendo un precipitado marrón allá donde exista expresión de AQP1.

### 5.2 Inmunofluorescencia indirecta

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia sobre plexos coroideos, para el estudio de localización de AQP1 y 4. Este ensayo se realizaba el mismo día que se extraían los plexos. Se incubaban durante 10 min en

paraformaldehído (PFA) (Sigma) al 4% para fijar el tejido. Seguidamente se lavaron 3 veces en PBS 1x durante 5 min, continuando con el bloqueo con una solución de PBS 1x con 5% de BSA durante 1 hora a t.a. Se incubaron con los anticuerpos primarios de AQP1 y 4 (Tabla 8); y el suero de paciente NMO-IgG+ y NMO-IgG -, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaban los tejidos con 0.1% de Tritón X-100 (Sigma), 3 veces durante 5 min cada una. De este modo, a la vez que se lavaba el tejido también se permeabilizaba, paso que hasta ahora era prescindible debido a que las acuaporinas son proteínas de membrana y se puede ver afectada su detección. Sin embargo, para la detección de proteínas como TTR (transtiretina), e-cadherina es necesario permeabilizar el tejido. Tras la permeabilización, se realizaba un nuevo bloqueo con solución PBS1x con 5% de BSA y 0,1% Tritón X-100 durante 1 hora a t.a. Seguidamente se incubaba con el anticuerpo primario de e-cadherina y TTR (tabla 8) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaba con PBS1x, 3 veces, 5 min. A continuación, se incubaba con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 9) en solución de bloqueo durante 1 hora a t.a.. Transcurrido este tiempo, se lavaban los tejidos 3 veces con PBS 1x. Por último se incubaba con dapi (4 ',6-diamino-2-fenilindol, 1:1000) durante 10 min a t.a. y se procedía a montar los tejidos sobre portas con solución Dako (S302380-Dako).

### 5.3 Inmunofluorescencia indirecta – Método de diagnóstico

Una vez puesto a punto el cultivo estable con la proteína de interés sobreexpresándose, estas preparaciones se empleaban en los ensayo de

inmunofluorescencia para la detección de anticuerpos. En el caso de la detección de anticuerpos anti-AQP4 (NMO-IgG) en suero de pacientes, este ensayo servía como diagnóstico para la neuromielitis óptica (NMO), debido a la exclusiva presencia de anticuerpos anti-AQP4 en estos pacientes. En el caso de AQP1, su detección, se usó con interés más descriptivo que clínico.

Las células se sembraban en placas con pocillos de 15,6 mm de diámetro con cubres tratados con Poly-L-lysine solution (Sigma) al 10%. Se dejaban durante 24 horas creciendo en medio DMEN completo, y se pasaba a realizar la inmunofluorescencia. Transcurridas las 24 horas, las células se lavaban con PBS 1x una sola vez, a continuación se fijaban con paraformaldehído (Sigma) al 3% durante 5 min a t.a. Se hace una fijación rápida para afectar lo menos posible a las proteínas de membrana. Se realizaban 3 lavados con PBS 1x seguidos del bloqueo con 5% BSA (albúmina sérica bovina), 10% FBS (suero bovino fetal) en PBS 1x, durante 45 min a t.a. A continuación, se incubaba con el anticuerpo primario, que en este caso era el suero de paciente (1:50), durante 1 hora a t.a. Como control positivo se utilizaba un suero de paciente con anticuerpos anti-AQP4 (NMO-IgG) previamente ya confirmado por el Hospital Clinic de Barcelona, y como control negativo se utilizó un suero de paciente con esclerosis múltiple y por tanto sin anticuerpos NMO-IgG. Las muestras se lavaban con PBS 1x 3 veces, 5 min, y se pasaba a incubar con el anticuerpo secundario Alexa fluor anti-human (Tabla 9) durante 30 min a t.a. De nuevo, se lavaban las muestras con PBS 1x 3 veces. Por último se incubaban las muestras con DAPI (Tabla 9), marcaje fluorescente nuclear durante 10 min a t.a. Los cubres eran montados en cubres con solución Dako (S302380, Dako) y tras dejar secar pasaban a analizarse al microscopio de fluorescencia (Olympus DX-61).

En el caso de la detección de anticuerpos anti-AQP1, se realizó el mismo protocolo, a excepción del control positivo, que se utilizó un anticuerpo primario comercial (tabla 8) y se dejó incubar durante 24 horas a 4°C.

### 5.3.1 Optimización del método de diagnóstico

Este ensayo, al tener interés clínico, fue mejorado para que los resultados se obtuviesen con la mayor rapidez posible (Figura 10). Para ello, una vez fueron fijadas las células, éstas se congelaron a -80°C inmersa en una solución de 10% DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma) en PBS 1x. De este modo, siempre que se recibía una muestra de paciente, en el mismo día era posible tener un resultado cualitativo, y dos para uno cuantitativo.

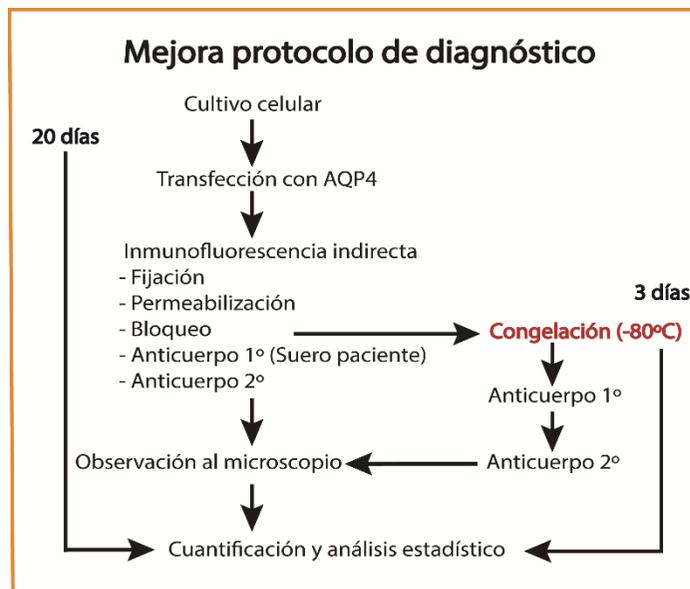


Figura 18. Diagrama resumen de la mejora del método de diagnóstico.

## 6. Procesamiento de muestras de pacientes

Tanto para los ensayos de detección de anticuerpos en suero de pacientes anti-AQP4 (NMO-IgG) como para la detección de la proteína de AQP1 y AQP4 en muestras de líquido cefalorraquídeo, contábamos con la colaboración de neurólogos y neurocirujanos del Hospital Universitario Virgen del Rocío (HUVR) para la recogida de muestras de pacientes. Las muestras se recogían cumpliendo todos los requisitos necesarios para ser registradas en el Biobanco perteneciente al HUVR, mediante la cumplimentación del consentimiento informado definido por este organismo (Figura 11).

En el caso de las muestras para la detección de NMO-IgG, se recibían extracciones de sangre en tubos vacutainer, con activador de la coagulación y gel separador de suero. Mediante una centrifugación a 500g durante 15 min a 4°C, se obtenía el suero, y era rápidamente conservado a -80°C. Las muestras recogidas pertenecían a pacientes que presentaban algún tipo de enfermedad neurológica, siendo las más frecuentes la de pacientes con esclerosis múltiple (Tabla 6)

Las muestras de líquido cefalorraquídeo se recibían en tubos sin ningún tipo de tratamiento. Estas muestras se centrifugaban en las mismas condiciones que antes se ha descrito y se descartaba los restos de tejido presentes en la muestra. Igualmente, se conservaban a -80°C. Las muestras eran clasificadas según el tipo de hidrocefalia que padeciese el paciente (Tabla 7), discriminándose entre hidrocefalia obstructiva, comunicante o sin hidrocefalia.

## 7. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado mediante el paquete estadístico IBM SPSS Statistics 22. Los datos están expresados con las medias  $\pm$  su error estándar para algunos experimentos. La significancia estadística para los datos con una distribución normal era estimada usando el test de Student para comparaciones entre dos grupos, o una ANOVA para comparaciones múltiples mediante el test de Bonferroni. Los datos con una distribución no-normal eran analizados mediante el test U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis para dos grupos o más de dos grupos respectivamente. El p-valor considerado para las diferencias significativas debía de ser: \*  $\leq 0.05$  y \*\*  $\leq 0.01$ .

## 8. Anexos

### 8.1 Consentimiento informado



#### FORMULARIO DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO ESCRITO

Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía

**NODO: Biobanco del Hospital Universitario Virgen del Rocío**

DOCUMENTO DE INFORMACIÓN PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL BIOBANCO PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Este documento sirve para que usted otorgue su consentimiento para donar sus muestras biológicas, o las del sujeto al que representa, al Biobanco indicado, establecimiento público, sin ánimo de lucro, dependiente de la Consejería de Salud/del Servicio Andaluz de Salud, que acoge colecciones de muestras biológicas concebidas con fines diagnósticos o de investigación biomédica y organizadas como una unidad técnica con criterios de calidad, orden y destino, donde serán conservadas hasta que se agoten por su uso, salvo que usted solicitara su eliminación. Las muestras biológicas son un excelente elemento para la investigación de enfermedades. A través de dichas investigaciones se podrán obtener datos que permitirán mejorar el conocimiento sobre la aparición, desarrollo y tratamiento de multitud de enfermedades.

Esta hoja de información puede contener palabras que usted no entienda. Por favor, pídale al profesional sanitario que le explique la información que no comprenda. Tómese el tiempo necesario para decidir si quiere o no donar su muestra biológica y consulte a personas de su confianza si lo desea. Para consultas que desee plantear posteriormente, podrá dirigirse al Biobanco del HUVR o a la dirección de correo electrónico: [biobanco.sspa@juntadeandalucia.es](mailto:biobanco.sspa@juntadeandalucia.es).

Las muestras biológicas donadas y sus datos clínicos asociados se utilizarán de conformidad con lo establecido en la Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica (en adelante Ley de Investigación biomédica).

Es posible que la información obtenida de las investigaciones en las que se utilicen sus muestras no le genere un beneficio directo, pero habrá contribuido al avance de la medicina y del conocimiento de diversas enfermedades, lo que supondrá, sin duda, un beneficio para la sociedad.

La donación es voluntaria y altruista, por lo que usted no tendrá derecho alguno sobre los resultados que pudieran derivarse de las investigaciones que se lleven a cabo con dichas muestras, de conformidad con la normativa vigente. Su decisión de donar o no, no afectará negativamente a su asistencia sanitaria.

En el apartado dedicado al consentimiento (2.3), podrá decidir si quiere que sus muestras se conserven de forma codificada (en cuyo caso se identifican con un código que protege su identidad) o anonimizada (eliminandose de forma irreversible toda vinculación con su identidad).

Sus muestras y los datos asociados a las mismas sólo se cederán a terceros que las utilicen en investigación biomédica de manera anónima o disociada. Si, por la naturaleza del proyecto de investigación en el que se utilizara su muestra se necesitaran datos clínicos adicionales, el Biobanco coordinaría la obtención de los mismos, siempre que la muestra no hubiera sido anonimizada.

#### 1. LO QUE USTED DEBE SABER:

##### 1.1. Obtención de las muestras

Las muestras serán obtenidas durante el procedimiento médico-quirúrgico al que va a someterse o se ha sometido durante su proceso asistencial, o a través de un procedimiento expreso para obtenerla, según lo indicado en el apartado sobre consentimiento (2.3).

En el caso de que usted done las muestras obtenidas durante un procedimiento médico-quirúrgico asistencial, no existe ningún inconveniente adicional derivado de la donación de las mismas.

Si, por el contrario, las muestras fueran extraídas expresamente para la donación para investigación biomédica podrían existir inconvenientes vinculados con la obtención de las mismas, de las que será convenientemente informado en la hoja de información del procedimiento correspondiente.

##### 1.2. Utilización de las muestras

Usted autoriza a que las muestras donadas sean utilizadas en investigación biomédica, pudiendo establecer restricciones a su utilización.



Las muestras sólo podrán ser utilizadas en proyectos de investigación científicamente avalados, que cumplan las exigencias legales y los principios éticos que rigen la investigación en salud y que sean autorizados por los órganos competentes, de conformidad con lo establecido en la normativa vigente.

Cuando, por razones de salud, usted o su familia lo necesiten, podrán hacer uso de las muestras, siempre que no se hayan agotado o eliminado y no se encuentren anonimizadas.

### **1.3. Información relacionada con las muestras**

Si lo solicita, el Biobanco le facilitará la información sobre los proyectos de investigación en los que se utilicen las muestras donadas, si éstas no hubieran sido anonimizadas.

Al donar sus muestras al Biobanco, en este momento puede no saberse el lugar de realización de los análisis. El Biobanco mantiene un registro detallado del lugar de realización de los análisis realizados.

La información que se obtenga puede tener implicaciones para sus familiares, por lo que debe transmitirles dicha información.

### **1.4. Posibilidad de ponerse nuevamente en contacto**

Puede que sea necesario ponerse en contacto nuevamente con usted, con el fin de recabar datos o muestras adicionales, o proporcionarle la información relevante para su salud, salvo que haya solicitado que las muestras sean anonimizadas.

### **1.5. Protección de datos y confidencialidad de la información**

La información proporcionada en este apartado será aplicable siempre que sus muestras no se encuentren anonimizadas.

Los datos personales recabados serán confidenciales y tratados de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, y su normativa de desarrollo, y la Ley de Investigación biomédica.

Sus datos de carácter personal serán incorporados a un fichero automatizado, debidamente inscrito en la Agencia Española de Protección de Datos, cuya titularidad corresponde al Servicio Andaluz de Salud. Sólo los responsables del Biobanco podrán identificar a quién corresponde cada muestra o dato, si no está anonimizada.

Podrá ejercer los derechos de acceso, rectificación, oposición y cancelación de sus datos personales, reconocidos en la citada Ley Orgánica 15/1999, con las limitaciones establecidas en dicha Ley. Para ello, deberá dirigirse a la Dirección General de Asistencia Sanitaria del Servicio Andaluz de Salud, Avenida de la Constitución, núm. 18, de Sevilla.

### **1.6. Derecho de revocación del consentimiento**

Salvo que sus muestras se encuentren anonimizadas, podrá revocar o retirar, en cualquier momento, el consentimiento prestado. Para ello, deberá dirigirse al Biobanco, pudiendo solicitar la eliminación o la anonimización de las muestras.

Los efectos de la revocación no se extenderán a los resultados de las investigaciones llevadas a cabo con anterioridad.

### **1.7. Información relativa a análisis genéticos**

Salvo que usted manifieste lo contrario en el apartado dedicado al consentimiento, se podrán realizar análisis genéticos.

Excepto si sus muestras son anonimizadas, tiene derecho a conocer los datos genéticos que se obtengan a partir del análisis de las muestras donadas, así como de la información relativa a su salud derivada de dichos análisis, según los términos en que exprese su voluntad en el apartado 2.3.

Si no desea recibir dicha información y ésta fuera necesaria para evitar un grave perjuicio para su salud o la de sus familiares biológicos, se informará a un familiar o a un representante. La comunicación se limitará exclusivamente a los datos necesarios para evitar tal perjuicio.

### **1.8. Otras consideraciones**

Una vez informado/a de los aspectos relacionados anteriormente en este documento, si decide donar dichas muestras deberá firmar el consentimiento informado para la donación.



## 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONACIÓN DE MUESTRAS BIOLÓGICAS AL BIOBANCO

**Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía**

**NODO: Biobanco del Hospital Universitario Virgen del Rocío**

2.1 DATOS DEL/DE LA DONANTE Y DE SU REPRESENTANTE (éste último sólo en caso de incapacidad del/de la donante):

**Apellidos y nombre del/de la Donante:** \_\_\_\_\_

**DNI / NIE:** \_\_\_\_\_ **NUHSA:** \_\_\_\_\_

**Apellidos y nombre del/de la representante legal:** \_\_\_\_\_

**DNI / NIE:** \_\_\_\_\_

2.2 PROFESIONALES QUE INTERVIENEN EN EL PROCESO DE INFORMACIÓN Y/O CONSENTIMIENTO:

Los siguientes profesionales declaran que se ha explicado la información relativa a la donación de muestras biológicas al Biobanco:

Apellidos y nombre	Fecha	Firma
_____	_____	_____

2.3 CONSENTIMIENTO:

Yo, D./Dña. \_\_\_\_\_ declaro bajo mi responsabilidad que **he leído y comprendido el Formulario de Información**, del que se me ha entregado un ejemplar.

He **recibido suficiente información** sobre la donación de muestras biológicas de \_\_\_\_\_ al Biobanco y sobre la posible realización de análisis genéticos sobre las mismas. He podido hacer preguntas sobre la información recibida y hablar con el profesional indicado, quien me ha resuelto todas las dudas que le he planteado.

Dichas muestras son:

Excedentes del procedimiento médico-quirúrgico asistencial al que va a someterse o se ha sometido

Tomadas mediante el procedimiento expreso

Asimismo, consiento el **tratamiento de los datos clínicos asociados** a las muestras.

Deseo que dichas muestras y los datos clínicos asociados sean tratados de forma:

**Codificada** (serán identificadas con un código que protege mi identidad, siendo posible volver a ligarlas conmigo) o

**Anonimizada** (no se podrán asociar las muestras conmigo, por haberse eliminado de forma irreversible la vinculación entre las mismas y mi identidad).

Deseo **establecer restricciones** respecto al uso de la muestra, para que no sea utilizada en \_\_\_\_\_

Autorizo que se pueda **contactar conmigo posteriormente**: SI NO

En caso afirmativo, por favor, indique el medio de hacerlo: \_\_\_\_\_

Autorizo **recibir información** sobre datos genéticos y datos relevantes para mi salud (Si solicita que las muestras sean anonimizadas, no podrá recibir esta información)

Marque lo que proceda: SI NO

Sé que puedo **revocar**, en cualquier momento, el consentimiento otorgado en este documento.

En \_\_\_\_\_, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

EL/LA DONANTE

EL/LA REPRESENTANTE LEGAL

(sólo en caso de incapacidad del/de la donante)

Fdo.:

Fdo.:



**3. REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO PARA USO DE MUESTRAS DONADAS:**

Yo, D./Dña. \_\_\_\_\_  
revoco el consentimiento informado otorgado en el documento \_\_\_\_\_  
(especificar fecha aproximada y/o procedimiento).

**Solicito:**

- La eliminación de las muestras donadas
- La anonimización de las mismas

**Otras consideraciones:**

.....  
.....  
.....

En \_\_\_\_\_, a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_  
EL/LA DONANTE EL/LA REPRESENTANTE LEGAL  
(sólo en caso de incapacidad del/de la donante)

Fdo.: Fdo.:

4

**Figura 19. Consentimiento informado.** Detalles del consentimiento informado oficial establecido por el Biobanco perteneciente al Hospital Universitario Virgen del Rocío.

## 8.2 Clasificación de muestras de pacientes

Diagnóstico		Nº pacientes	Género (F/M)	Media de edad +/- sd
Controles sanos		8	5/3	36,50 +/- 9
Neuritis óptica		31	23/8	38,55 +/- 11
Mielitis		12	9/3	44,17 +/- 15
ADEM		1	1/0	45
Esclerosis Múltiple:				
	EMRR	79	57/25	37,62 +/- 10
	EMPP	7	2/5	61,67 +/- 12
	EMSP	2	2/0	40,50 +/- 9
Espectro clínico NMO:				
	NMO	6	5/1	54,80 +/- 10
	NO de repetición	7	4/3	37,33 +/- 13
	Mielitis long. ext.	9	5/4	50 +/- 13
	Mielitis de repetición	4	2/2	47,50 +/- 4
	NO de repetición asociado sd.Sjögren	1	1/0	46
Otros diagnósticos:				
	Neuropatía óptica isquémica	5	1/4	54,60 +/- 19
	Isquemia medular	2	1/1	55,50 +/- 5
	Neuropatía motora multifocal	3	0/3	45,50 +/- 5
	Paraparesia espástica familiar	1	1/0	53
	CIDP	1	1/0	42
	Neurolupus (no NO ni MLE)	2	2/0	41,5 +/- 1
<b>Total</b>		<b>181</b>		

**Tabla 6. Variables demográficas y clínicas de pacientes en el estudio de NMO.** Tabla con la información demográfica y clínica de las muestras de suero utilizadas en los ensayos relacionados con la Neuromielitis óptica. Se establecieron diferentes grupos en función de la etiología de la enfermedad desmielinizante. ADEM (Encefalomielitis diseminada aguda), EMRR (esclerosis múltiple recurrente), EMPP o EMSP (esclerosis múltiple primaria o secundariamente progresiva), NO (neuritis óptica), NMO (Neuromielitis óptica), CIDP (polineuropatía desmielinizante idiopática crónica).

Diagnóstico	Tipo de hidrocefalia	Nº pacientes	Género F/M	Media edad +/- sd
Hidrocefalia	Obstructiva	14	9/5	51,4 +/- 18,6
	Comunicante	56	30/26	57,42 +/- 18,64
No hidrocefalia	No hidrocefalia	15	6/9	53,07 +/- 17,81

**Tabla 7. Variables demográficas y clínicas de pacientes en el estudio de la hidrocefalia.** Tabla con la información demográfica y clínica de las muestras de suero utilizadas en los ensayos relacionados con la hidrocefalia. En la tabla se muestran las diferentes muestras de líquido cefalorraquídeo clasificadas en función de la presencia de hidrocefalia o no, y el subtipo en caso de presentarse.

### 8.3 Anticuerpos primarios

Antígeno	Origen	Tipo	Dilución	Compañía	Ref.
AQP4	Conejo	Poli	1:1000	Abcam	ab46182
AQP4	Conejo	Poli	1:1000	Alpha Diagnostics	AQP41-A
AQP1	Conejo	Poli	1:10000	Abcam	ab15080
$\beta$ -actina	Ratón	Mono	1:10000	Abcam	ab6276
G6PDH	Conejo	Poli	1:1000	Abcam	ab993
TTR	Oveja	Poli	1:500	Abcam	ab9015
e-cadherina	Ratón	Mono	1:300	BD Bioscience	610181
AQP1	Ratón	Mono	1:500	Abcam	ab117970
Natalizumab		Mono	1:10	Tysabri	ID: 3753128

**Tabla 8. Listado de anticuerpos primarios utilizados.**

### 8.4 Anticuerpos secundarios

Antígeno	Reactividad	Origen	Dilución	Compañía	Ref.
<b>IgG H&amp;L (HRP)</b>	Humano	Pollo	1:30000	Abcam	Ab6864
<b>IgG H&amp;L (HRP)</b>	Conejo	Cabra	1:5000	Pierce	31460
<b>Alexa 635 IgG</b>	Ratón	Cabra	1:400	Invitrogen	A31340
<b>Alexa 488 IgG</b>	Ratón	Mono	1:200	Invitrogen	A21202
<b>Alexa 568 IgG</b>	Cabra	Mono	1:400	Invitrogen	A11057
<b>Alexa 568 IgG</b>	Humano	Cabra	1:1000	Invitrogen	A21090
<b>Dapi</b>	Todos	Químico	1:1000	Invitrogen	D1306

Tabla 9. Listado de anticuerpos secundarios y marcadores



## **RESULTADOS**



## RESULTADOS

Los resultados que se presentan en el presente trabajo abordan la implicación de diversos miembros de la familia de las AQP4 en el desarrollo de dos enfermedades neurológicas, la neuromielitis óptica y la hidrocefalia.

En la neuromielitis óptica, basados en trabajos previos que aportan observaciones clínicas y patológicas que indican la participación directa de los anticuerpos anti-AQP4 en el desarrollo y diagnóstico de la NMO (Lennon y col., 2004; Lucchinetti et al., 2002; Nakamura y col., 2005; Pittock et al., 2006) quisimos estudiar en mayor profundidad el papel desempeñado por las AQP4 en la etiología de la enfermedad y su uso clínico como marcador biológico en el diagnóstico de esta enfermedad.

En la hidrocefalia por otra parte, donde la participación de AQP1 había sido también propuesta para explicar el origen de ésta patología (Filippidis y col., 2011; Kalani et al., 2012; Wang y col., 2011), quisimos ahondar en entender si existe relación fisiopatológica entre la expresión de AQP1 cerebrales y la hidrocefalia, analizando muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes hidrocefálicos y haciendo uso de dos modelos animales de los que disponíamos, el KO (-/-) de AQP1 y el ratón “hop gait” genéticamente hidrocefálico (Batiz y col., 2006; Bronson y Lane, 1990).

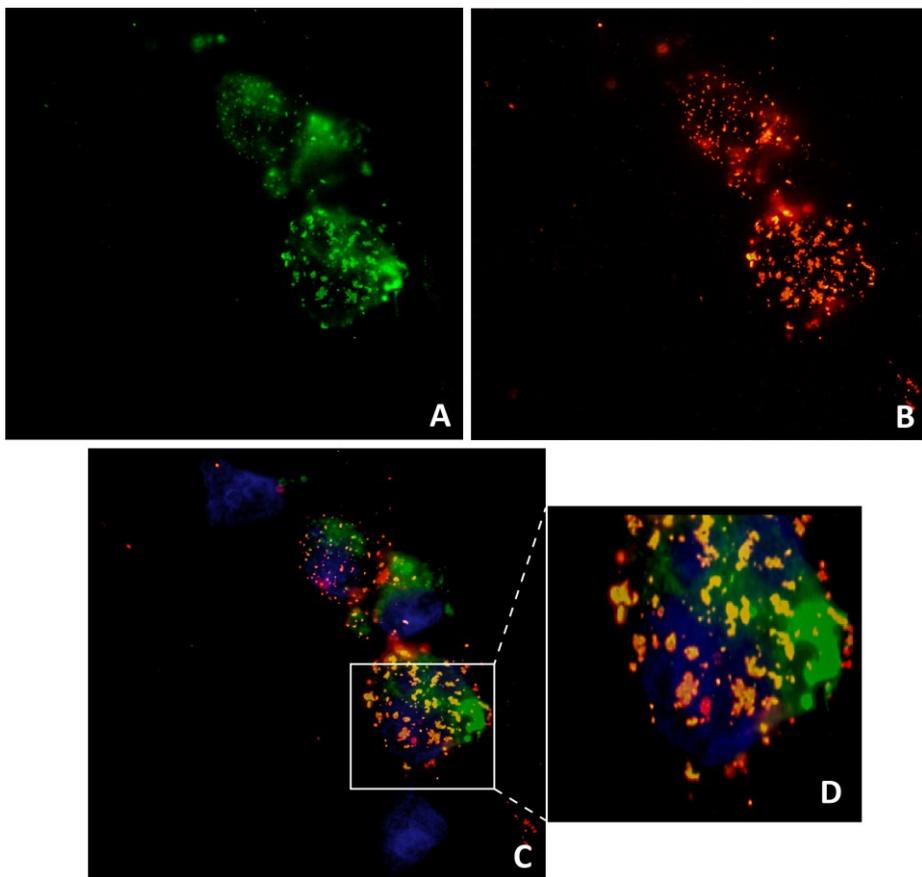
## 1. Desarrollo de un sistema de diagnóstico para la Neuromielitis óptica

Con el fin de poder establecer en nuestro laboratorio un sistema de diagnóstico para la neuromielitis óptica, se desarrollaron técnicas para la detección de anticuerpos anti-AQP4 humanos (NMO-IgG), mediante la sobreexpresión de AQP4 humana en células, que servirían como antígeno para detectar mediante técnicas de inmunofluorescencia los anticuerpos presentes en suero de pacientes potencialmente afectados por la enfermedad y como controles sueros de pacientes que pertenecían a un amplio espectro de enfermedades neurológicas y voluntarios sanos.

### 1.1 Detección de anticuerpos anti-AQP4

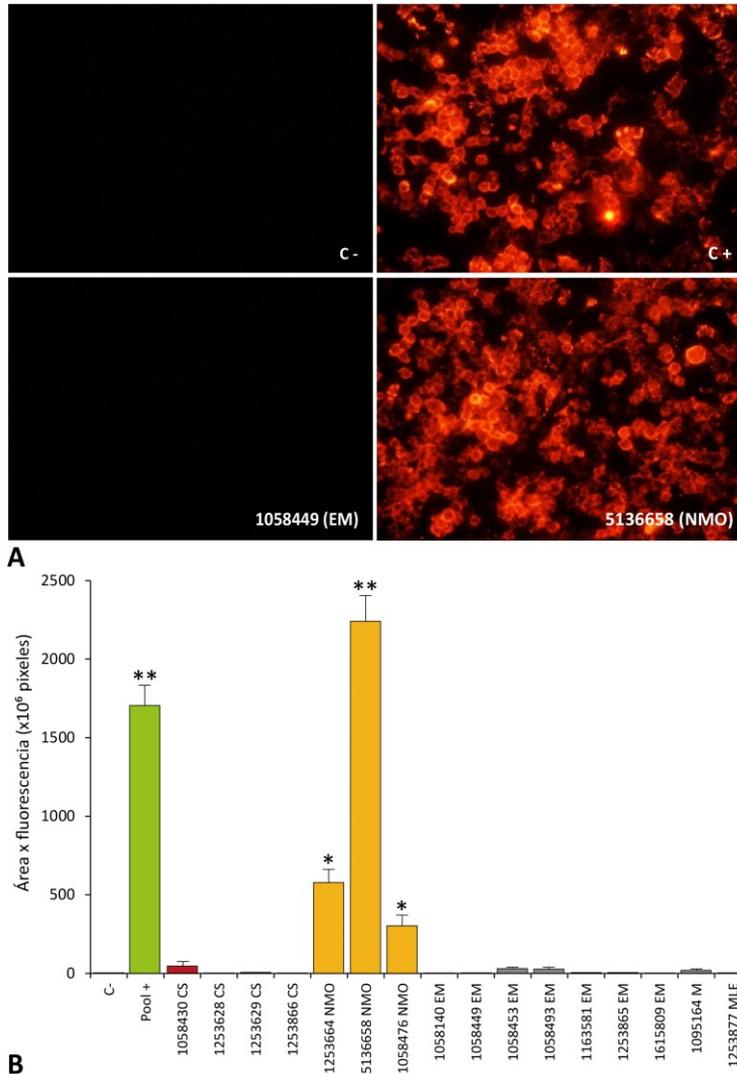
El cDNA que codifica para la proteína de AQP4 humana en sus isoformas M1 y M23, fue clonado en el vector de expresión pCMV6 el cual codifica también por la expresión de una proteína fluorescente verde llamada EGFP, por “enhanced Green fluorescent protein”, bajo el mismo promotor del inserto (AQP4). De este modo, al expresarse la proteína de AQP4, a su vez se expresará también la proteína EGFP, evidenciándose su expresión por la presencia de un color verde que se detectará al microscopio de fluorescencia. En la puesta a punto inicial de detección de anticuerpos anti-AQP4 se hizo uso de una muestra de suero de un paciente positivo para NMO y que tenía anticuerpos anti AQP4, confirmados por el Hospital Clinic de Barcelona, centro de referencia en España para este diagnóstico. Como se aprecia en la figura 20, la señal verde (EGFP) “in situ” indica la expresión de AQP4, que coincide con el marcaje rojo producido por

el anticuerpo secundario-fluorescente, que reconoce a la IgG del suero del paciente unida a la proteína de AQP4 expresada. En esta figura se puede observar claramente, además, los OAPs (“ortogonal array proteins”) arreglo ortogonal típico formado por la sobreexpresión de la isoforma M23 de AQP4.



**Figura 20. Colocalización de AQP4 y EGFP mediante detección con anticuerpos anti AQP4 presentes en el suero de paciente NMO positivo.** La sobreexpresión de pCMV6-N-EGFP-AQP4 se muestra mediante fluorescencia de color verde (A). Inmunofluorescencia indirecta que muestra la presencia de anticuerpos anti AQP4 en la muestra de suero de paciente (B). Colocalización de las señales de sobreexpresión de AQP4 y de la detección de anticuerpos (C y D).

La puesta a punto del ensayo de diagnóstico se amplió haciendo una exploración de muestras pertenecientes a controles sanos y otras enfermedades de carácter neurodegenerativo para así comprobar la eficiencia del método desarrollado. A su vez, mediante el programa informático Image J, se cuantificó la señal de fluorescencia obtenida, expresada en píxeles. La observación al microscopio de fluorescencia (Figura 21a), mostró que únicamente las muestras de pacientes con NMO, presentaban niveles de fluorescencia apreciables comparables al control positivo, a diferencia del resto de muestras que no presentaron ningún tipo de marcaje. En la Figura 21b se corroboró este resultado mediante la cuantificación de la fluorescencia, encontrándose diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon los niveles de fluorescencia de las muestras de controles positivos para la NMO con respecto a la detectada en el control negativo.

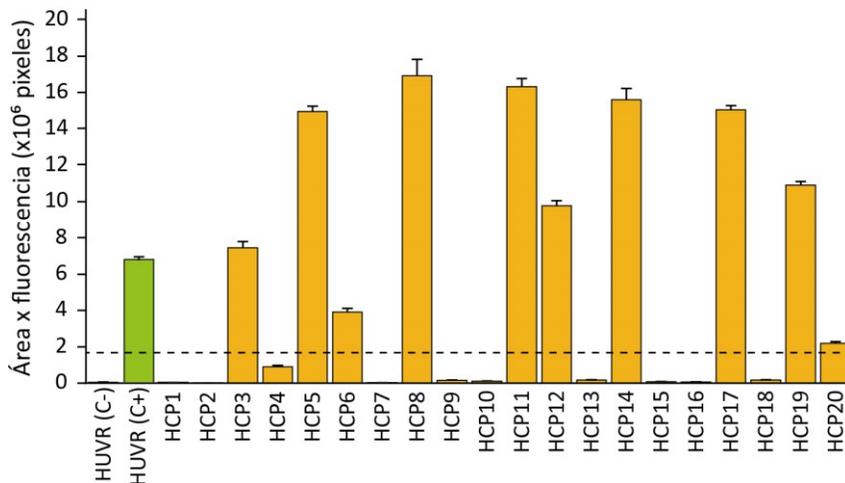


**Figura 21. Fotos de microscopía fluorescente y cuantificación de la fluorescencia en muestras de pacientes.** Inmunofluorescencia indirecta para la detección de anticuerpos anti-AQP4 (A) y cuantificación con image-J de la fluorescencia en muestras de pacientes con Neuromielitis óptica (NMO), esclerosis múltiple (EM), mielitis longitudinal extensa (MLE) y controles sanos (CS). (\* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$ ) (B).

## 1.2 Verificación del método de diagnóstico

Con la ayuda del Dr. Albert Sáiz, neurólogo de referencia del Hospital Clinic de Barcelona, experto en el diagnóstico de Neuromielitis óptica en el país, obtuvimos muestras de sueros de pacientes ya analizadas en ese

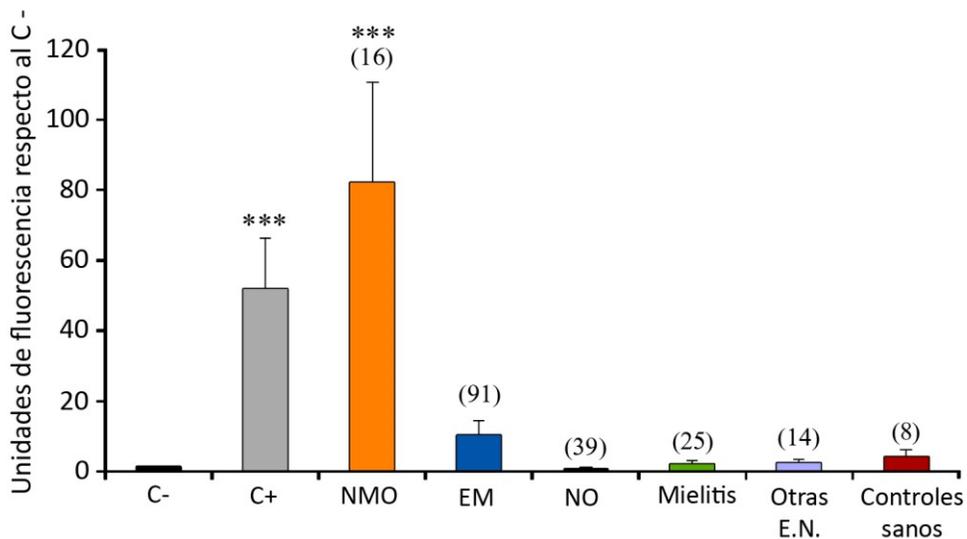
centro para el diagnóstico de la NMO mediante la detección de anticuerpos anti-AQP4. Realizamos con estos sueros el diagnóstico de NMO, usando el método puesto a punto en el laboratorio y descrito previamente. Para mayor objetividad en el análisis, la prueba se realizó sin conocer el diagnóstico que estos sueros habían recibido previamente y éste se conoció solo después del análisis realizado por nosotros. Como se observa en la Figura 22, el ensayo de inmunofluorescencia indirecta y la posterior cuantificación de la fluorescencia mediante el *software* ImageJ, indicó que el 50% de las muestras analizadas contenían los anticuerpos anti-AQP4 y por tanto resultaron positivas para el diagnóstico de la NMO y el otro 50% negativo, coincidiendo nuestros resultados, en cada muestra individual con los resultados obtenidos previamente por el Hospital Clinic.



**Figura 22. Verificación del método de diagnóstico.** La gráfica muestra la cuantificación de la fluorescencia resultante en el ensayo de inmunodetección de NMO-IgG en muestras cedidas por el Hospital Clinic. La línea punteada representa la media de fluorescencia obtenida del análisis de 3 muestras de controles negativos utilizada como umbral de significancia estadística para realizar el diagnóstico.

### 1.3 Resultados globales por patología

Una vez confirmada la eficiencia del sistema de diagnóstico desarrollado en el laboratorio, se procedió al análisis de todas las muestras recibidas en el transcurso de 4 años, la gran mayoría aportadas por el Hospital Universitario Virgen del Rocío. Los resultados (Figura 23) indican que únicamente las muestras de pacientes con Neuromielitis óptica presentan diferencias significativas en sus valores de fluorescencia con respecto al control negativo. Es decir, solo los sueros de pacientes que habían sido diagnosticados de NMO, usando otros criterios de diagnóstico clínico basados en el análisis de imágenes de resonancia magnética de cerebro, médula espinal y nervios ópticos, mostraron presencia de los anticuerpos anti-AQP4.

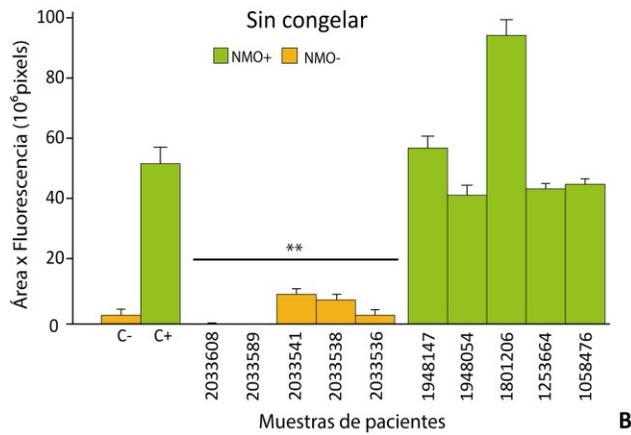
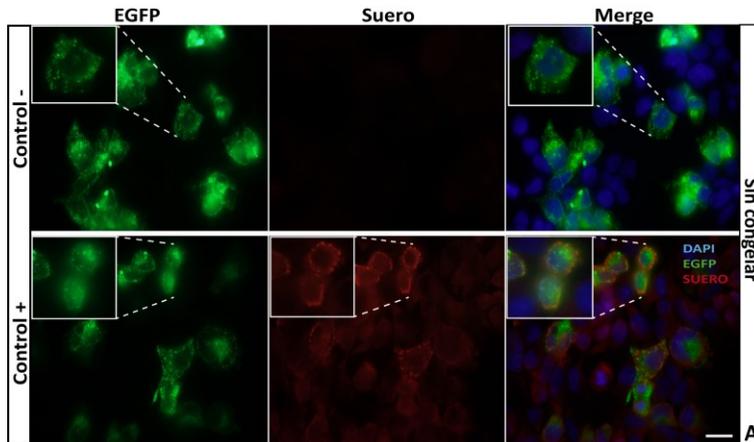


**Figura 23. Cuantificación de fluorescencia por patología.** Las diferentes muestras se agruparon en función de su naturaleza neurológica y se representaron las medias obtenidas en la cuantificación de la fluorescencia de estas normalizadas respecto al control negativo. \*\*\* $p < 0.001$ .

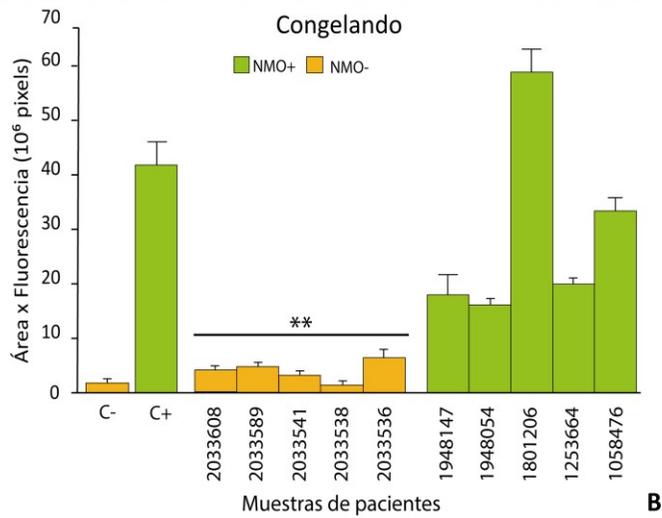
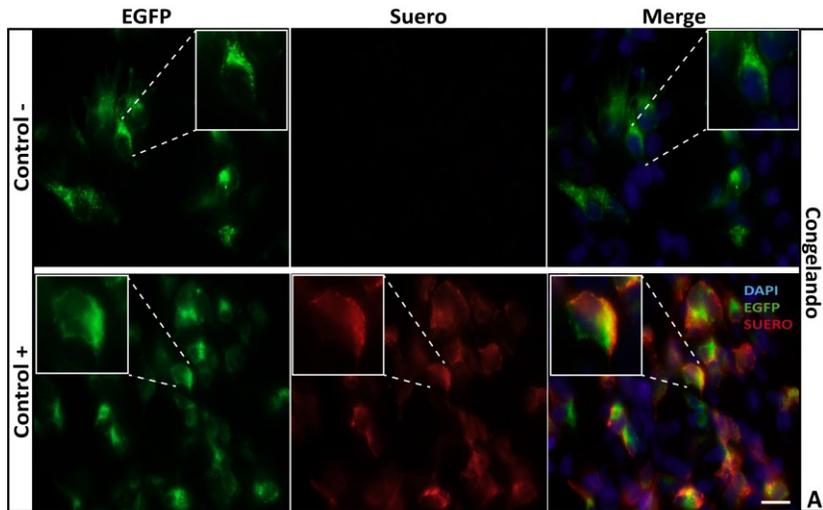
### 1.4 Optimización del método de diagnóstico

Una vez la técnica fue puesta a punto y demostrada su elevada sensibilidad y especificidad, se quiso optimizar la técnica desarrollada en cuanto a tiempo se refiere, ya que el proceso normal, desde la descongelación y cultivo de las células, transfección, inmunofluorescencia, hasta la cuantificación, se prolongaba hasta 2-3 semanas. Para ello, se exploró el efecto que tenía durante la realización de la inmunofluorescencia, una vez finalizado el paso de bloqueo, congelar los portas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y tras días de congelación, proseguir el protocolo descrito con incubación del porta en presencia del suero a diagnosticar. De esta forma se podría tener congelados un gran número de portas listos para usarse tras la llegada del suero al laboratorio, pudiendo tener el resultado del diagnóstico inmunológico en dos días.

Para comprobar que la eficiencia del ensayo no se veía afectada, se realizó paralelamente el ensayo usando portas con células frescas o con células congeladas. Los resultados (Figura 24 y 25) mostraron que en ambos casos la fluorescencia producida por un suero positivo conteniendo anticuerpos anti-AQP4 era notablemente superior al valor de fluorescencia detectado en el control negativo. La señal de fluorescencia obtenida en los controles positivos de las dos condiciones, fueron similares, aunque siempre el marcaje fue más limpio y mayor en el ensayo sin congelar (Figura 24).



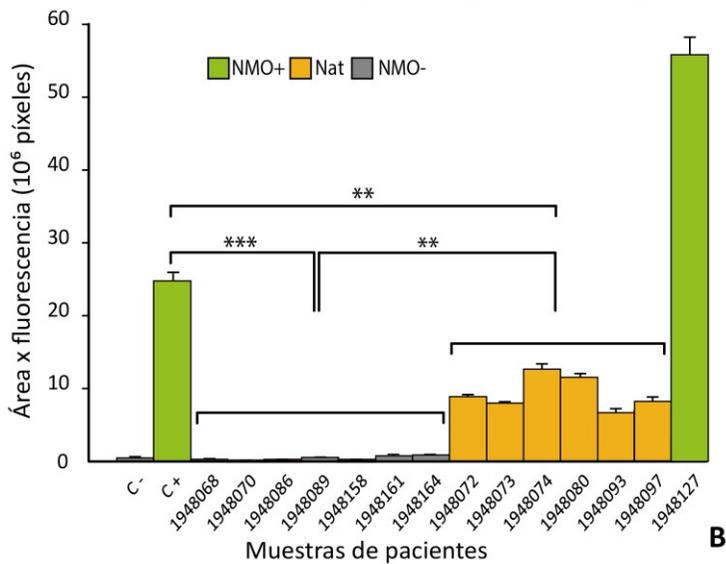
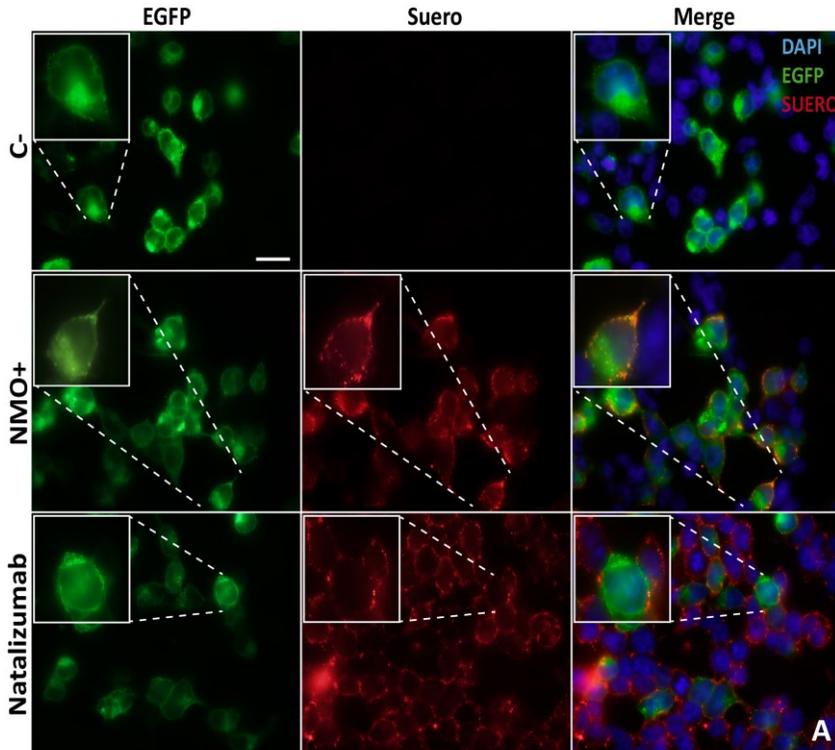
**Figura x. Método de diagnóstico en portas sin congelar.** Se muestran en verde la expresión de AQP4 asociada a EGFP y en rojo el marcaje de anticuerpos anti-AQP4 presente en el suero del paciente (A). Cuantificación con imageJ de la fluorescencia emitida por las muestras NMO+ (barras verde) y NMO- (barras amarillo). Se compararon las medias entre los dos grupos. (\*\*p<0.01).(B).



**Figura 25. Método de diagnóstico en portas congelados.** Se muestran en verde la expresión de AQP4 asociada a EGFP y en rojo el marcaje de anticuerpos anti-AQP4 presente en el suero del paciente (A). Cuantificación con *imageJ* de la fluorescencia emitida por las muestras NMO+ (barras verdes) y NMO- (barras amarillo). Se compararon las medias entre los dos grupos. (\*\* $p < 0.01$ ). (B).

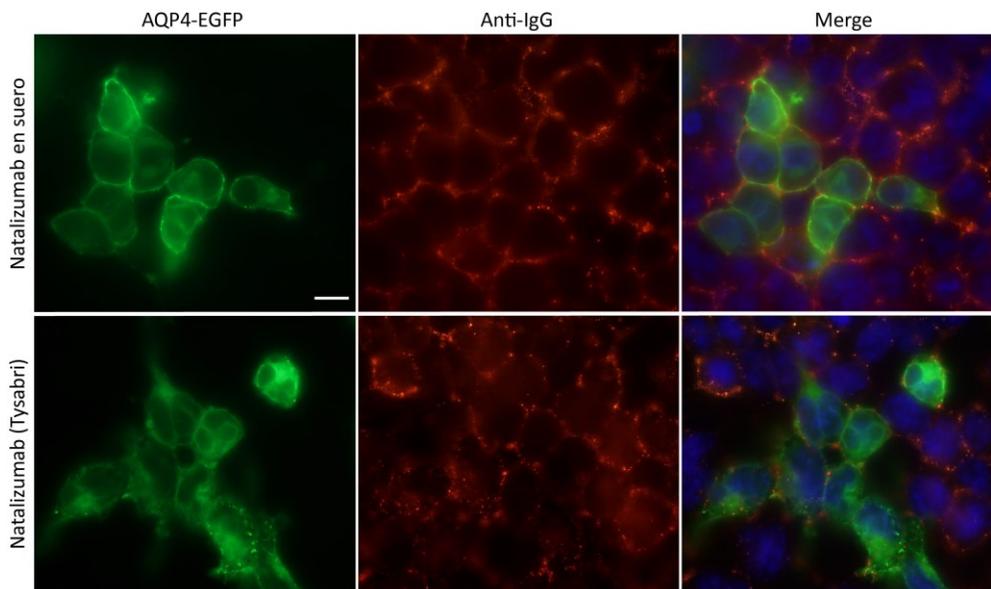
### 1.5 Falsos positivos producidos por tratamiento con natalizumab

Como se aprecia en la Figura 26, tanto en muestras de pacientes con anticuerpos anti-AQP4 positivos como en muestras de pacientes con esclerosis múltiple que han recibido tratamiento con natalizumab se detectó marcaje fluorescente. Sin embargo se pudo observar, gracias a la expresión de EGFP asociada a la expresión de AQP4, que el marcaje producido por el suero del paciente con NMO+ marca únicamente las células que sobreexpresan EGFP-AQP4, a diferencia del suero de un paciente tratado con natalizumab, el cual marca todas las células presentes, sin importar la expresión o no de AQP4. En el *merge* de señales fluorescentes verde y roja se pudo comprobar como las señales de fluorescencia sólo colocalizan en las del suero NMO+, mientras que en la muestra de natalizumab se observa un marcaje de membrana en prácticamente todas las células con independencia de la expresión o no de AQP4-EGFP. Al cuantificar los niveles de fluorescencia (Figura 26b), tanto los sueros de pacientes tratados con natalizumab como los sueros de pacientes NMO+ mostraron niveles lo suficientemente altos como para mostrar diferencias significativas respecto a sueros negativos para NMO-. Pero a su vez, también se obtuvieron diferencias significativas al comparar los niveles de fluorescencia en pacientes tratados con natalizumab y los sueros de pacientes NMO+, estos últimos mostrando valores mucho más altos de fluorescencia.



**Figura 26. Marcaje producido por el suero de paciente con tratamiento de natalizumab.** Inmunofluorescencia indirecta anti-AQP4 de muestra NMO+ y suero de pacientes tratados con natalizumab (A). Cuantificación de la fluorescencia de muestras NMO+ (verde), NMO- (gris) y suero de pacientes tratados con natalizumab (naranja). \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 (B).

Para confirmar que estos resultados se debían a efectos producidos por la presencia de Natalizumab en el suero de los pacientes se procedió a repetir el ensayo inmunológico pero utilizando Tysabri directamente como anticuerpo primario, en vez de usar el suero de los pacientes. Tysabri es un producto comercial que contiene el mismo principio activo presente en el tratamiento genérico conocido como natalizumab. Los resultados (figura x), mostraron gran similitud entre el patrón de marcaje mostrado por el suero de un paciente que estaba bajo tratamiento con natalizumab y el producido por Tysabri. En ambos casos se observó un marcaje específico de membrana, pero sin relación con la sobreexpresión de EGFP-AQP4. Se observó marcaje de todas las células mientras que la sobreexpresión de EGFP-AQP4, en esta ocasión abarcaba menos del 50% del total de células en el campo.

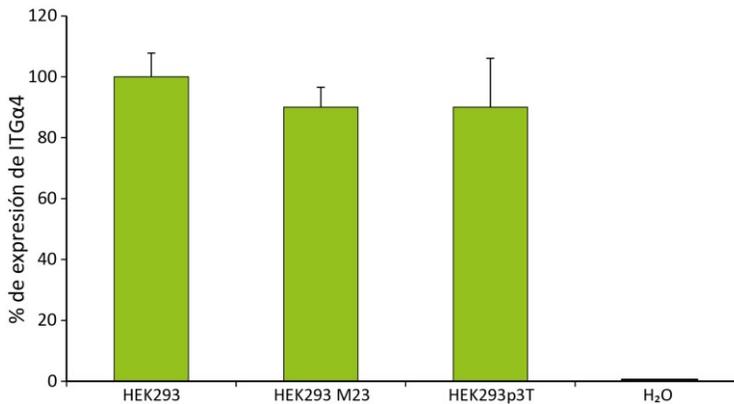


**Figura 27. Detección de natalizumab en suero frente al comercial.** Inmunofluorescencia indirecta que muestra el marcaje producido por el suero de paciente con tratamiento de natalizumab y el natalizumab comercial (Tysabri).

Una vez verificada la interferencia del natalizumab en el diagnóstico y comprobar que el marcaje no correspondía a AQP4, se pasó a buscar cual era el antígeno responsable por esta señal (falsa positiva) que observábamos.

El natalizumab, es un anticuerpo monoclonal que interacciona con integrinas, glicoproteínas de membrana que participan en la unión de la célula con la matriz extracelular o con otras células. En nuestros cultivos se usaron células HEK293 (células embrionarias de riñón humano), las cuales expresan de forma constitutiva un tipo de integrina, la integrina alfa 4. La presencia de esta integrina se confirmó, mediante el estudio de la expresión por PCR cuantitativa en cultivos de HEK293 sin transfectar y transfectados con AQP4-M23 y con un vector vacío (p3T). Como se observa en la Figura 28,

se detectó expresión de la integrina en los diferentes casos de células HEK analizadas, comprobándose que la expresión constitutiva de ésta integrina no se veía afectada al ser las células transfectadas con otros genes.



**Figura 28. PCR cuantitativa de ITGα4.** Se muestran los niveles de expresión de ITGα4 en cultivo celular HEK293 sin transfectar y transfectada con los genes de AQP4-M23 y p3T.

Así, el marcaje de membrana que presentan algunas muestras de sueros de pacientes con EM, es debido al tratamiento de natalizumab, y al reconocimiento por este anticuerpo monoclonal de las integrinas que se encuentran en la membrana de las células HEK293 usadas para el ensayo.

## 2. Presencia de anticuerpos anti-AQP1 en suero de pacientes con desordenes que se incluyen dentro del síndrome de la NMO (NMOSD)

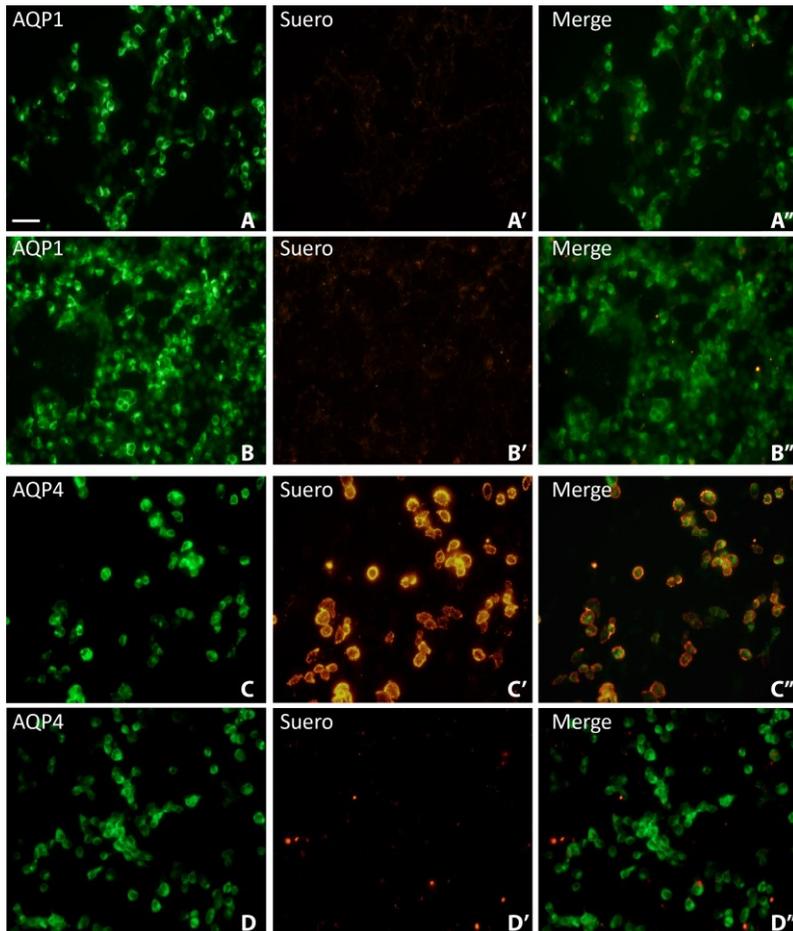
Varios estudios han descrito la presencia de anticuerpos anti-AQP1 en suero de pacientes clasificados como dentro del espectro clínico de la NMO. Utilizando ensayos de inmunofluorescencia (Long et al., 2014b) o mediante

técnicas de ELISA y radioinmunoprecipitación (Tzartos et al., 2013), estos autores detectan la presencia de AQP1. Sin embargo, las inconsistencias encontradas en ambos trabajos y la falta de reproducibilidad de dichos resultados por otros autores (Schanda et al., 2015), han añadido muchos interrogantes a la posibilidad de una verdadera relación entre la presencia de anticuerpos anti-AQP1 y el espectro clínico de la NMO

En este apartado se muestran los resultados de diversos análisis, de inmunofluorescencia indirecta en células transfectadas con AQP1 y ensayos de ELISA, realizados con las muestras de suero recolectadas y previamente analizadas para la detección de anti NMO-IgG, y ahora usadas para la detección de anticuerpos anti-AQP1.

### 2.1 Detección de anticuerpos anti-AQP1 por inmunofluorescencia

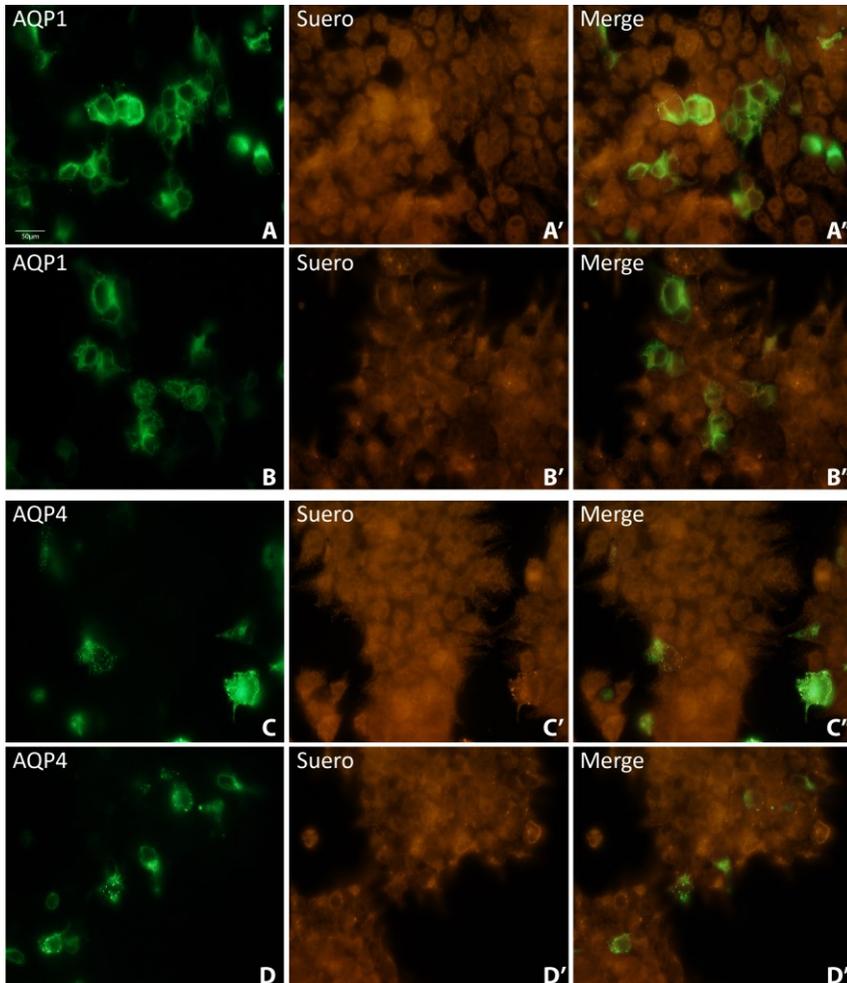
El ensayo se realizó siguiendo el protocolo ya puesto a punto para la detección de anticuerpos anti-AQP4, pero ahora utilizando células HEK293 a las que se les transfectó el clon pCMV6-AQP1-EGFP para así obtener un cultivo celular que sobreexpresaba AQP1 y EGFP simultáneamente. Se analizaron todos los sueros recolectados hasta la fecha y se compararon con los resultados obtenidos en la detección de anticuerpos anti-AQP4. Los resultados (Figura 29) mostraron que los sueros pertenecientes a pacientes del espectro NMO (NMOSD) (A') presentaban un marcaje similar al control negativo (B'). Por el contrario, la detección de anticuerpos anti-AQP4 en los mismos sueros realizada paralelamente mostró una intensa señal en las muestras de suero de pacientes NMO+.



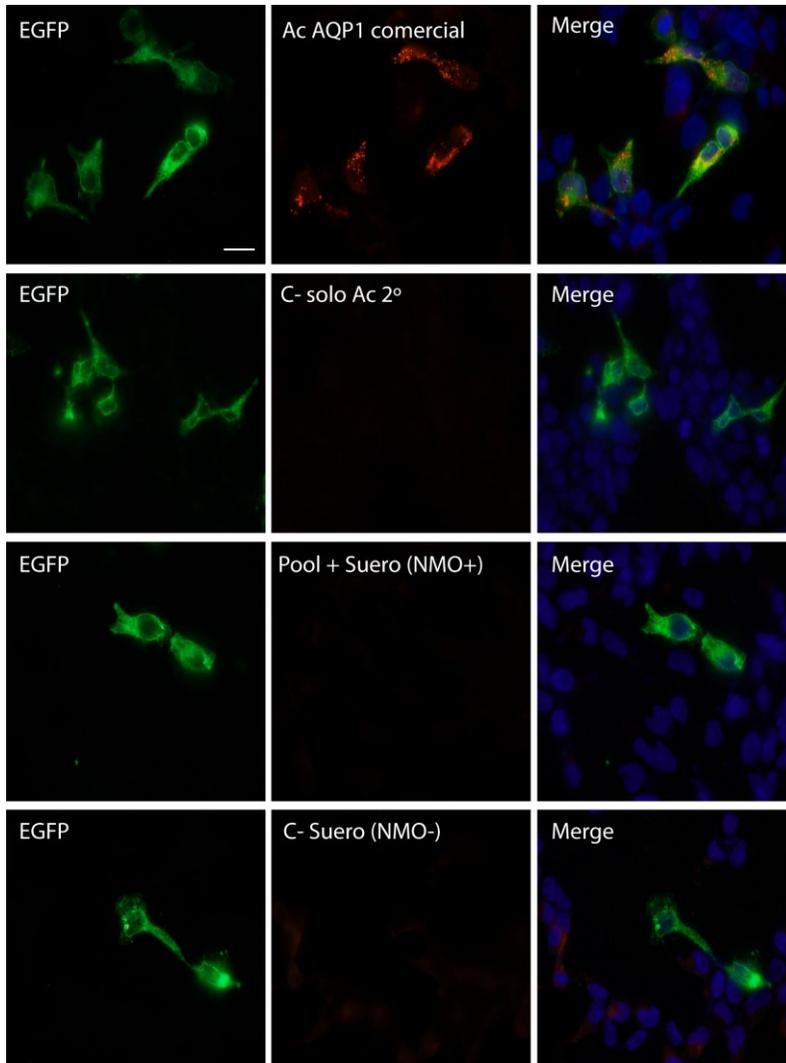
**Figura 29. Inmunofluorescencia de AQP1 y AQP4 con suero de pacientes sobre células no permeabilizadas.** Comparación de la señal de AQP1 y AQP4 con el ensayo de inmunodetección hecho usando células sin permeabilizar tal como se describió para el diagnóstico de AQP4. Expresión de AQP1-EGFP (A,B). Expresión de AQP4-EGFP (C,D). Suero de paciente NMOSD positivo (A',C'). Suero de paciente NMOSD negativo (B',D').

Tras los resultados negativos obtenidos, el ensayo de inmunofluorescencia fue repetido, pero esta vez siguiendo las condiciones de permeabilización del tejido descritas previamente (Long, Youming et al., 2014) por autores que confirman la presencia de anticuerpos anti-AQP1 en

el suero de pacientes con NMOSD. Este protocolo, a diferencia del anterior, permeabiliza las células, disminuyendo considerablemente la especificidad y sensibilidad de la técnica. Como se puede apreciar en la Figura 29, se observa mucho marcaje, tanto en las células que sobreexpresan AQP1, como en las que expresan AQP4, así como también en las que no expresan ninguna de estas proteínas. El resultado fue similar en las muestras pertenecientes a pacientes con NMOSD (A', C'), como en las muestras de pacientes que no pertenecían al NMOSD (B', D'). Esta señal de fluorescencia que se detecta es por tanto inespecífica, debida a la unión de componentes del suero a la célula que se desconocen.



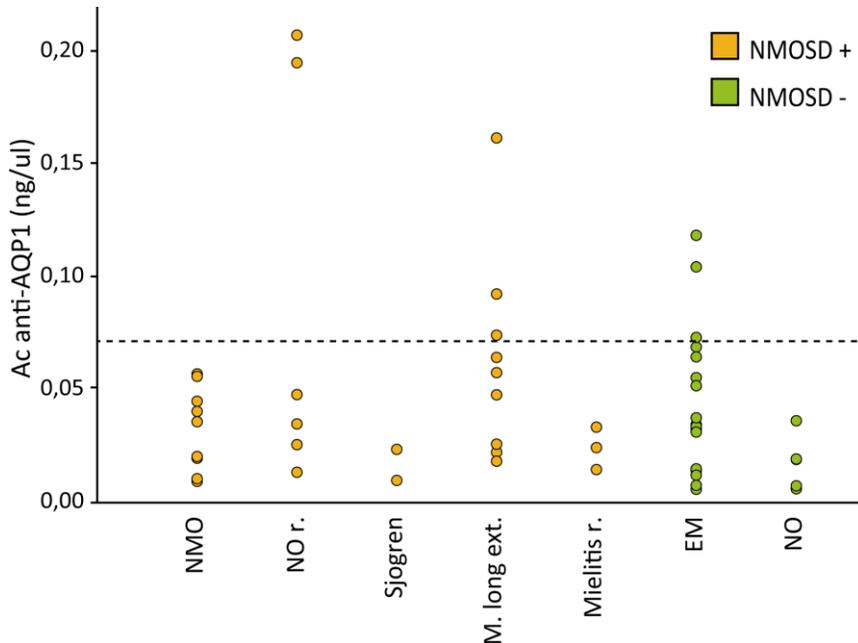
**Figura 29. Inmunofluorescencia de AQP1 y AQP4 con suero de pacientes sobre células permeabilizadas.** Comparación de la señal de AQP1 y AQP4 con el ensayo de inmunodetección hecho usando células permeabilizadas. Expresión de AQP1-EGFP (A,B). Expresión de AQP4-EGFP (C,D). Suero de paciente NMOSD positivo (A',C'). Suero de paciente NMOSD negativo (B',D').



**Figura x. Inmunofluorescencia de AQP1 con Ac comercial y suero.** Inmunofluorescencia de AQP1 sin permeabilizar donde se muestra el marcaje del Ac comercial de AQP1 frente a los sueros de paciente.

## 2.2 Detección de anticuerpos anti-AQP1 por ELISA

Aceptando la posibilidad de que los anticuerpos anti-AQP1 estuvieran presentes en el suero pero fueran difíciles de detectar debido a su baja concentración y a la poca sensibilidad de la técnica inmunofluorescente, las muestras se analizaron entonces usando un método de mayor sensibilidad como es el ELISA. Los resultados (Figura 30) evidenciaron en algunas muestras la presencia significativa de anticuerpos anti-AQP1. Sin embargo, las muestras con niveles de anticuerpos más altos no solo se encontraban en el grupo NMOSD, también muestras de EM presentaron niveles elevados. Del grupo NMOSD, únicamente 2 sueros que pertenecían a pacientes con neuritis óptica de repetición (NOr.) y 3 de pacientes con mielitis longitudinal extensa (MLE) dieron valores positivos para anti-AQP1. En el grupo de NMOSD negativo, destacaron como positivas 3 muestras de pacientes con esclerosis múltiple (EM). La significancia estadística de los datos se halló por comparación a la media más la desviación típica (línea punteada en la Figura 30), del valor del anticuerpo obtenido en controles sanos, determinado por triplicado.



**Figura 30. ELISA para la detección de anticuerpos anti-AQP1 en suero de pacientes.** Las diferentes patologías aparecen agrupadas en dos categorías, NMOSD – y NMOSD +. La línea de puntos corresponde a la media + sd de 3 controles sanos y se usó como valor de referencia en el análisis estadístico.

En resumen, vemos que algunas muestras de pacientes presentan niveles significativos de anticuerpos anti-AQP1, siendo sólo posible detectarlos mediante la técnica de ELISA, pero dichos anticuerpos no solo se detectaron en pacientes del espectro clínico de la NMO (NMOSD), sino que también se detectaron en pacientes con esclerosis múltiple.

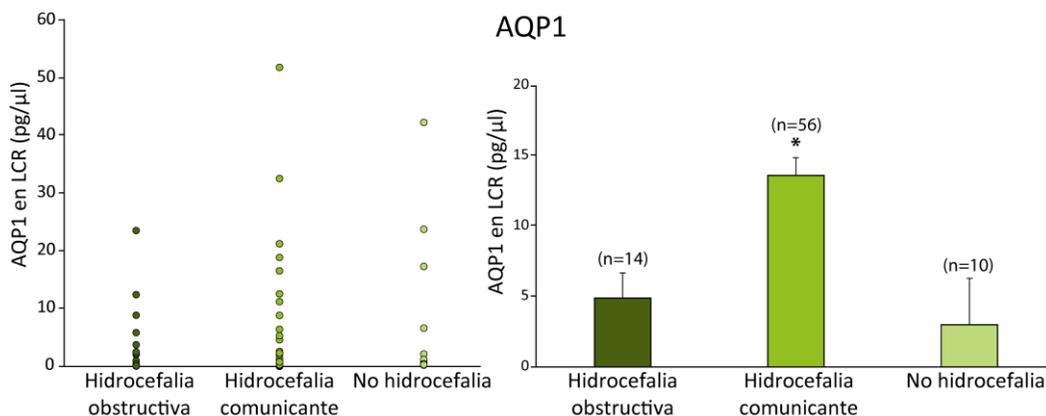
### 3. Estudio de AQPs en líquido cefalorraquídeo de pacientes con hidrocefalia

La hidrocefalia es una patología producida por la acumulación de líquido cefalorraquídeo (LCR) en el sistema ventricular cerebral. En la

producción de LCR participan tanto el plexo coroideo, donde hay elevada expresión de AQP1, como las células endoteliales, con alta expresión de AQP4.

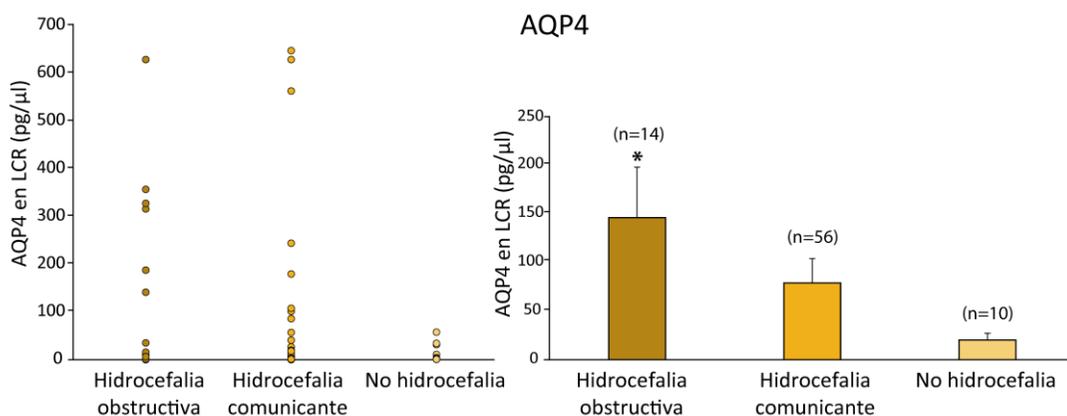
Para estudiar la posible relación de estas AQPs con dicha patología, se evaluó en muestras de líquido cefalorraquídeo humanas, perteneciente a pacientes con hidrocefalia obstructiva, hidrocefalia comunicante y sin hidrocefalia, la presencia de estas proteínas.

El análisis de las muestras para AQP1 (Figura 31), mostró de forma general niveles mayores de esta proteína en las muestras de los pacientes que padecían hidrocefalia (obstructiva o comunicante), y aunque se aprecia una elevada variabilidad en los resultados, las muestras que pertenecían a hidrocefalia comunicante presentaron diferencias significativas claras con respecto a las muestras sin hidrocefalia.



**Figura 31. Niveles de AQP1 en LCR de muestras control y con hidrocefalia.** En pacientes con hidrocefalia de diferente origen, se evaluaron por ELISA los niveles de la proteína AQP1 presentes en muestras de LCR. \*  $p \leq 0,05$

En las mismas muestras se analizó, también por ELISA, la presencia de AQP4. Como se muestra en la Figura 32, los niveles de AQP4 en los dos tipos de hidrocefalia estudiados fueron superiores a los registrados en las muestras sin hidrocefalia. Fue sin embargo en la hidrocefalia obstructiva, donde se encontraron valores de AQP4 significativamente superiores respecto a las muestras sin hidrocefalia. De nuevo se observó una gran variabilidad en los niveles de AQP4 medidos por ELISA en las muestras de LCR.



**Figura 32. Niveles de AQP4 en LCR de muestras control y con hidrocefalia.** En pacientes con hidrocefalia de diferente origen, se evaluaron por ELISA los niveles de proteína AQP4 presentes en muestras de LCR. \*  $p \leq 0,05$

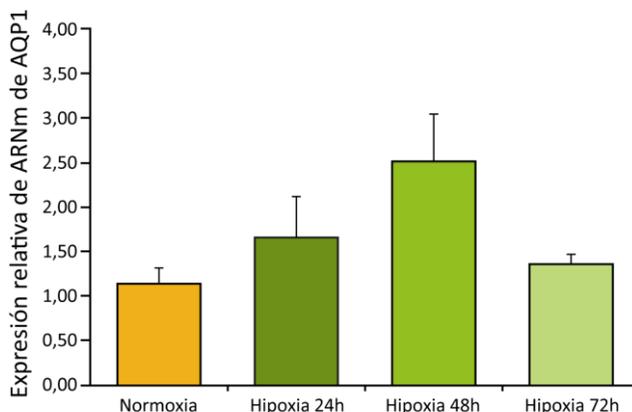
En ambas figuras los resultados presentados corresponden a la concentración de AQPs normalizadas por las proteínas totales presentes en cada muestra para corregir así posibles errores de dilución introducidos por las diversas técnicas de obtención de las muestras de LCR.

#### 4. Estudio de AQP1 en plexo coroideo de ratón

Siendo el plexo coroideo uno de los tejidos más implicado en la producción de líquido cefalorraquídeo, y dada la alta expresión de AQP1 en este tejido, se realizaron estudios de expresión de AQP1 en rata y ratón con el propósito de estudiar la posible relación de la hidrocefalia con la expresión de esta proteína en dicho tejido. Trabajos previos del laboratorio habían indicado además la expresión al alza de AQP1 en el plexo coroideo de ratones expuestos a hipoxia (Abreu y col. 2011), por tanto quisimos también estudiar si en hipoxia, como consecuencia de una sobreexpresión de AQP1, se producía una situación de hidrocefalia en el animal expuesto a condiciones de 8-10% de O<sub>2</sub> durante 48 horas.

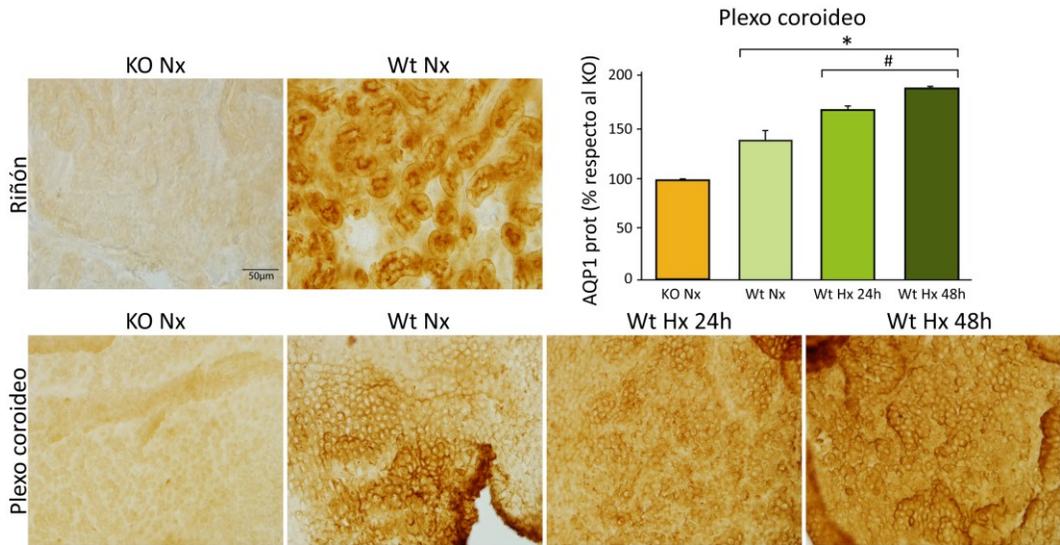
La expresión de AQP1 en plexo coroideo fue analizada mediante ensayos de RT-PCR cuantitativa (Figura 33) para detectar los niveles de RNA, y mediante inmunohistoquímica (Figura 34) y “*western blot*” para detectar los niveles de la proteína.

En la Figura 33 se muestra, en valores relativos, que cuando los ratones se exponen a condiciones de hipoxia (24, 48 y 72h) la expresión de AQP1 aumenta hasta alcanzar un pico de inducción a las 48 h de tratamiento de  $\cong 2,5$  veces de su valor en normoxia.



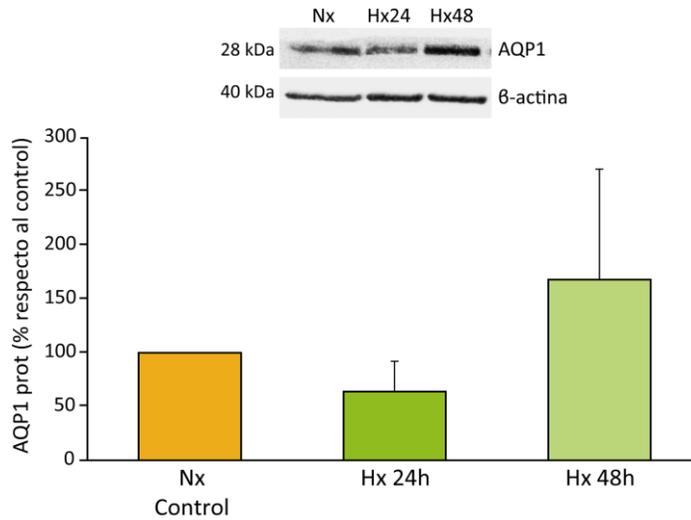
**Figura 33. Análisis de expresión por RT-PCRq del mRNA de AQP1 en plexo coroideo de ratón.** Ratones C57J fueron expuestos a condiciones de hipoxia durante 24, 48 y 72 horas. Se muestra la expresión relativa de los ARNm tras los periodos de hipoxia expresados respecto al control en normoxia.

En la Figura 34 se muestran resultados de los ensayos de inmunohistoquímica que permitieron evaluar la expresión de AQP1 en plexo coroideo de ratones sometidos a condiciones de hipoxia. La expresión de AQP1 en riñón se usó como control positivo del marcaje de esta proteína, y el tejido procedente de ratones AQP1-KO se usó como control negativo para valorar la especificidad del anticuerpo usado. Los resultados muestran que los niveles de la proteína AQP1 fueron mayores en el tratamiento de hipoxia que en la normoxia, siendo las diferencias a las 48h mayores que a las 24h y en ambos casos estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ).



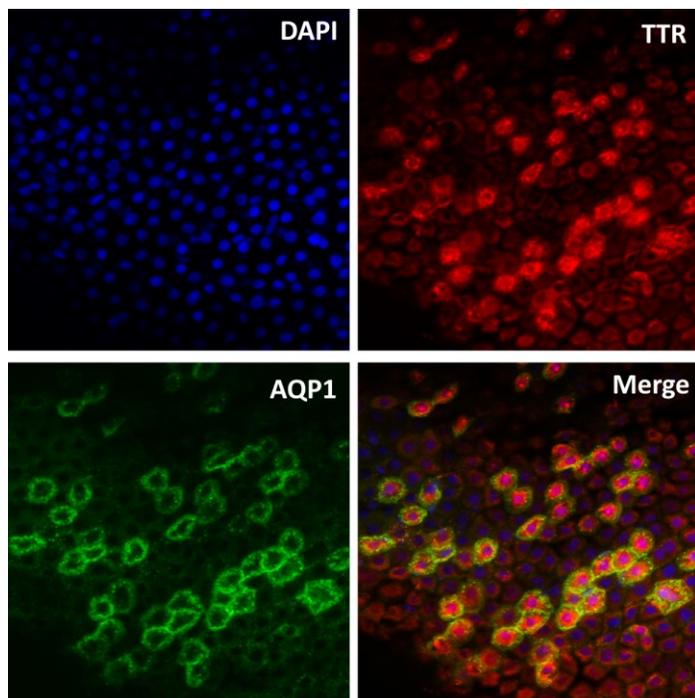
**Figura 34. Análisis de la expresión por inmunohistoquímica de AQP1 en plexo coroideo.** La detección de AQP1 se hizo en ratones AQP1 wt y KO en condiciones de normoxia e hipoxia. Tanto el riñón como los tejidos del KO, se usaron como controles. \* y #  $p \leq 0,05$

Los niveles de expresión de AQP1 tras el tratamiento hipóxico (24h y 48h) se evaluaron también mediante western blot. Como se muestra en la Figura 35, la hipoxia produjo un leve aumento en la expresión de AQP1 observable claramente a las 48h pero sin llegar a ser estadísticamente significativo.



**Figura 35. Análisis de expresión de AQP1 en plexo coroideo de ratón.** LA expresión de AQP1 en plexo coroideo de ratones C57J fue analizado por *Western Blot* tras exponer los animales a condiciones de hipoxia durante 24 y 48 horas.

Mediante inmunohistoquímica analizamos la expresión de AQP1 en las células del plexo coroideo, evidenciándose como era de esperar una localización de membrana de esta proteína (Figura 36).

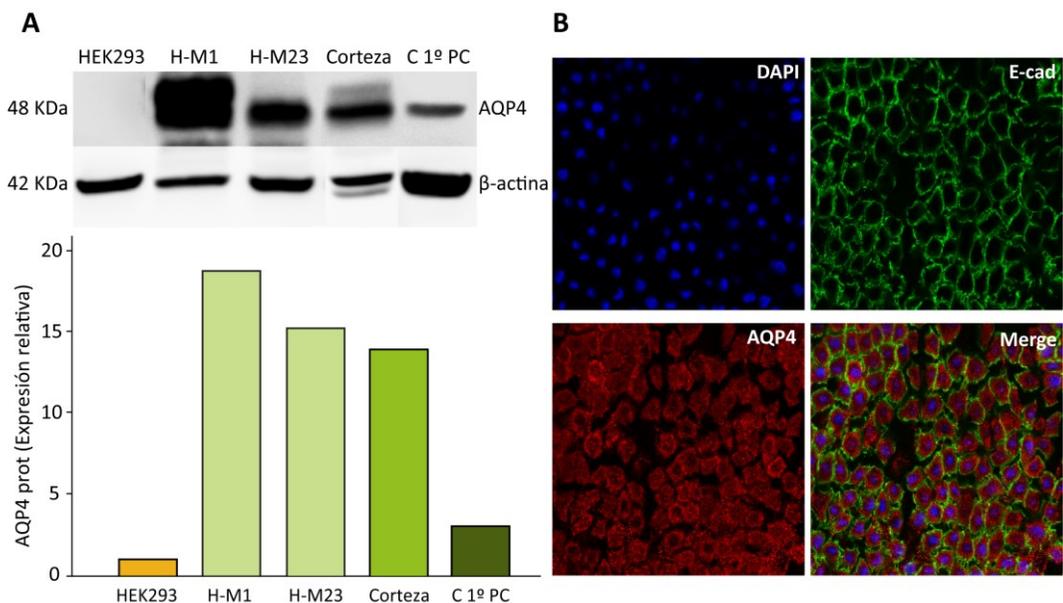


**Figura 36. Detección de AQP1 en plexo coroideo.** Las fotografías muestran imágenes de microscopía de fluorescencia del plexo coroideo de ratón wild type de la línea C57J, procesado para la detección inmunohistoquímica de AQP1 (verde) y el marcador específico de plexo TTR (rojo).

### 5. Detección de AQP4 en plexo coroideo de ratón

Los trabajos publicados hasta la fecha destacan el papel de AQP1 en la producción y regulación de LCR en los plexos coroideos (Day y col., 2014; Papadopoulos y Verkman, 2013), sin embargo poco se conoce del papel de AQP4 en este proceso. Aunque la idea prevalente en el campo es que AQP4 no juega ningún papel en la producción de LCR, estudios previos muestran expresión de AQP4 en el plexo coroideo (Mobasheri et al., 2007; Speake et al., 2003; Suzuki et al., 2013; Venero et al., 1999) y junto a los resultados obtenidos en el análisis de ARNm en el apartado anterior, quisimos analizar de forma específica si existe expresión de esta proteína en el tejido en cuestión.

Analizamos la expresión de la proteína mediante las técnicas de western blot e inmunofluorescencia. Como se muestra en la Figura 37a, el análisis de la expresión de AQP4 en diferentes muestras: controles, cultivos celulares de HEK293 sin transfectar y transfectadas con las dos isoformas de AQP4 (M1 y M23); corteza de cerebro de ratón y por último cultivos primarios de plexo coroideo, dejó claro que si hay expresión de la proteína. En la Figura 37b, se muestran los resultados de detección de AQP4 en plexo coroideo de ratón por inmunofluorescencia indirecta, donde se puede apreciar que AQP4 (rojo) presenta una distribución homogénea en el citoplasma, y no de membrana como muestra el control e-cadherina (verde).



**Figura 37. Expresión de AQP4 en plexo coroideo.** La figura muestra la presencia de AQP4 a nivel de proteína en el plexo coroideo. Los niveles de expresión de AQP4 fueron analizados mediante western blot entre muestras de diferentes cultivos pertenecientes a HEK293 sin transfectar, HEK293 transfectada con AQP4-M1 y M23, corteza de ratón y cultivo primario de plexo coroideo de rata (n=4) (A). Mediante inmunofluorescencia indirecta sobre plexo coroideo de ratón se detectaron las proteínas AQP4 (rojo) y e-cadherina (verde) como control (B).

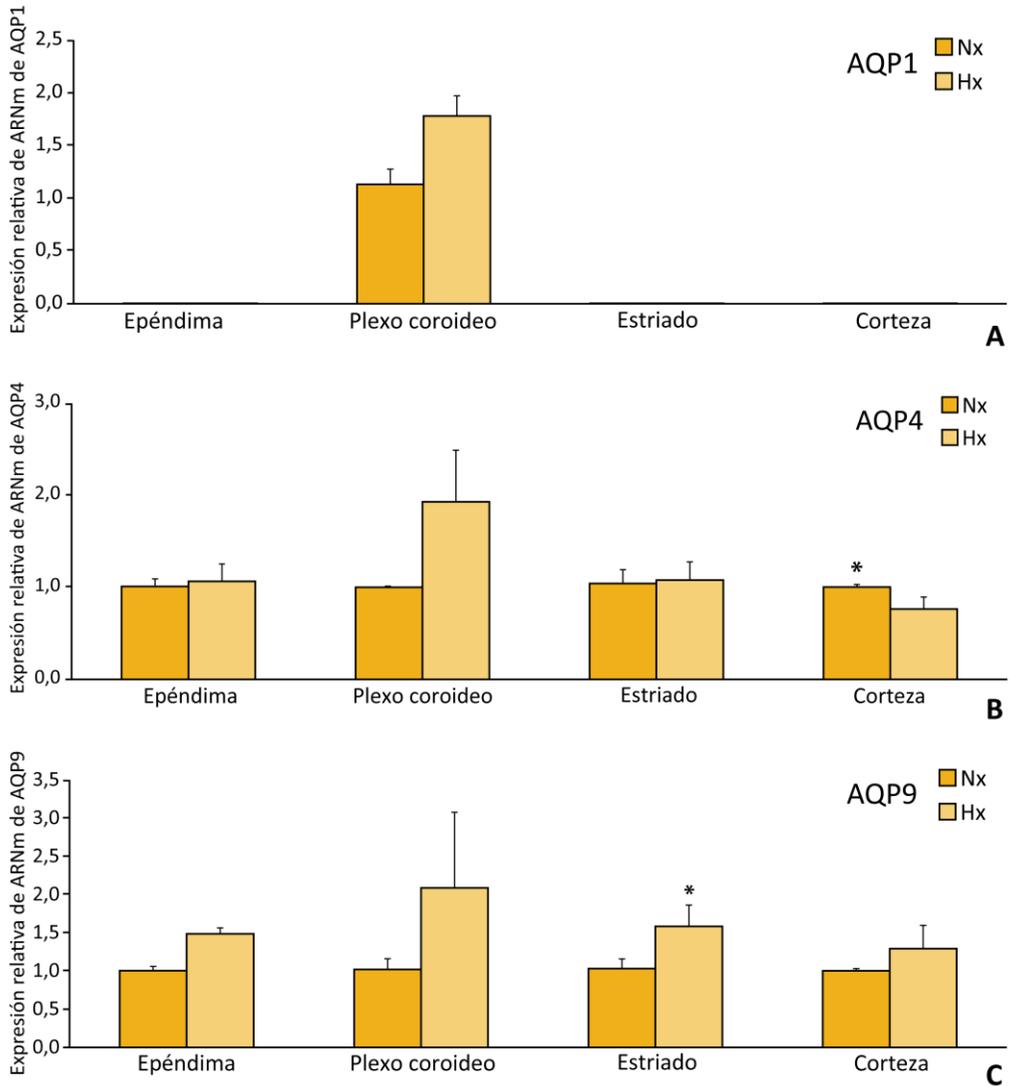
## 6. Exploración de acuaporinas en otras áreas del cerebro de ratón

Una producción excesiva o una reabsorción reducida del LCR llevarán a una situación de hidrocefalia, la cual pudiera estar asociada a una expresión alterada o una disfunción de las AQP's presentes en la interfase entre el SNC y los compartimentos donde se encuentra el LCR. Como ya se indicó en la introducción de esta tesis son varias las AQP's que a día de hoy han sido localizadas en el cerebro de mamíferos y pudieran ser relevantes en el contexto del presente trabajo.

Quisimos entonces explorar la expresión de las acuaporinas 4 y 9, que junto con AQP1 son las que se expresan principalmente en el SNC, y analizar la expresión de estas tres proteínas en diferentes secciones del cerebro. Para ello, se aislaron zonas específicas tales como epéndima, corteza, plexo coroideo y estriado, en las cuales la presencia de AQP's ha sido descrita previamente en la literatura.

Los ratones se expusieron a hipoxia durante 48 horas y la expresión de las AQP's fue analizada por PCR cuantitativa.

Como se observa en la Figura 38a, AQP1 se expresa únicamente en plexo coroideo y como se mostró anteriormente en el apartado 2 de resultados, aquí nuevamente se confirmó una mayor expresión en condiciones de hipoxia. La expresión de AQP4 sin embargo, se encontró en los 4 tejidos analizados (Figura 38b). Claras diferencias en la expresión de esta proteína por hipoxia se observaron en el plexo coroideo y la corteza, siendo estas diferencias estadísticamente significativas solo en la corteza. Curiosamente se observó además que la hipoxia aumenta la expresión de la proteína en el plexo coroideo, mientras que la reduce en la corteza. Por último, los resultados mostraron (Figura 38c) que AQP9 se expresa en todos los tejidos y que la hipoxia aumenta su expresión en todos ellos, aunque las diferencias solo fueron estadísticamente significativas en el estriado.



**Figura 38. Análisis en distintas zonas del cerebro de la expresión de AQP1, AQP4 y AQP9 por RT-PCRq bajo condiciones de hipoxia.** Los ratones (n=4) se mantuvieron en hipoxia al 10% de O<sub>2</sub> durante 48 h. Las gráficas muestran el análisis por RT-qPCR de AQP1 (A), AQP4 (B) y AQP9 (C) en los cuatro tejidos estudiados: epéndima, plexo coroideo, estriado y corteza, \* p≤0,05.

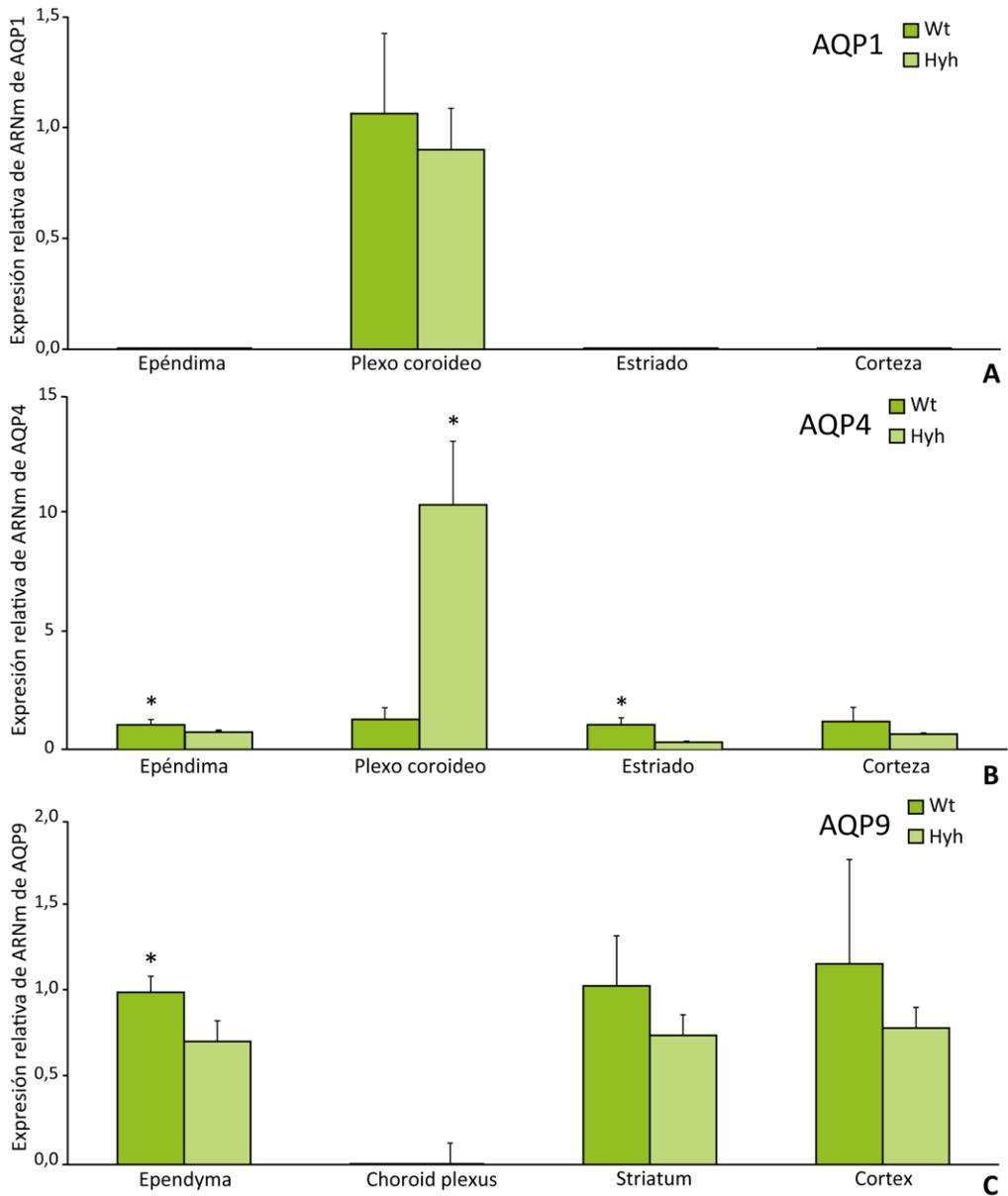
## 7. Estudio de AQP<sub>s</sub> en cerebro del ratón mutante *hyh* (hydrocephalus hop gait)

El ratón mutante *hyh*, como se ha descrito en la introducción, es un ratón que presenta una mutación puntual que afecta a la expresión de la proteína  $\alpha$ -SNAP, que le produce una acumulación de LCR en los ventrículos acompañada de una estenosis en el acueducto de Silvio, desarrollando una hidrocefalia severa. Este ratón presenta un fenotipo hidrocefálico que se asemeja en algunos aspectos a la hidrocefalia congénita en humanos tales como en el aumento de la presión intracraneal, aumento del volumen de LCR, estenosis, entre otros, y es por ello que haya sido seleccionado como modelo en el estudio de la relación entre la hidrocefalia y la expresión de acuaporinas.

Al igual que en el apartado anterior, se analizó la expresión de las acuaporinas más abundantes en el SNC: AQP1, AQP4 y AQP9 en tejidos como el plexo coroideo, corteza, epéndima y estriado. Se usaron ratones *hyh* entre 15 y 25 días de edad y como controles se usaron los de genotipo silvestre (*wild type*) de la misma línea. Los niveles de expresión de AQP<sub>s</sub> fueron analizados mediante PCR cuantitativa.

Como se observa en la Figura 39a, AQP1 únicamente se expresa en plexo coroideo, sin encontrarse diferencias significativas entre el ratón control y el *hyh*. La expresión de AQP4 (Figura 39b), mostró ser mayor en epéndima, estriado y corteza de ratones wt, siendo estadísticamente significativas estas diferencias solo en epéndima y estriado. En el plexo coroideo, los niveles de AQP4 fueron más elevadas en ratones *hyh*, con una diferencia estadísticamente significativa 10 veces mayor en *hyh* que en el

wt. La expresión de AQP9 (Figura 39c), al igual que AQP4 también se vio aumentada en epéndima, estriado y corteza en ratones wt respecto a *hyh*, siendo las diferencias estadísticamente significativas únicamente en el epéndima. En plexo coroideo a diferencia del apartado anterior, AQP9 sin embargo, no es detectada.



**Figura 39. Análisis de expresión de AQP1, AQP4 y AQP9 por RT-PCRq en ratones hop gait..** Para el análisis se utilizaron 4 ratones silvestres y 4 ratones con hidrocefalia (hyh). Las gráficas muestran el análisis por RT-qPCR de AQP1 (A), AQP4 (B) y AQP9 (C), en los tejidos: epéndima, plexo coroideo, estriado y corteza. . \* p<0,05.



**DISCUSIÓN**



## DISCUSIÓN

En la actualidad, son muchos los estudios que abordan el estudio funcional de las acuaporinas en el sistema nervioso central y su implicación en diferentes patologías neurológicas como edema cerebral, neuromielitis óptica, encefalomiелitis aguda diseminada, hidrocefalia, neuroinflamación por lesión cerebral y tumores entre otros (Badaut y col., 2014; Papadopoulos y Verkman, 2013). En este trabajo se aborda el estudio de las principales acuaporinas presentes en el sistema nervioso central, como son AQP1 y AQP4, tanto a nivel básico, en lo que se refiere a su implicación en la etiología y desarrollo de la enfermedad, o clínico, por su importancia en el desarrollo de sistemas de diagnóstico. Estos estudios se han centrado en dos patologías neurológicas como son la neuromielitis óptica y la hidrocefalia.

### 1. Desarrollo de sistema de diagnóstico para NMO

La neuromielitis óptica, es una enfermedad idiopática inflamatoria desmielinizante que afecta al nervio óptico y la médula espinal, que puede ser distinguida de la esclerosis múltiple por una combinación de exploraciones clínicas, de neuroimagen y análisis del líquido cefalorraquídeo (Wingerchuk y col., 1999). Hasta hace relativamente poco tiempo muchos pacientes con los primeros síntomas de NMO eran diagnosticados con esclerosis múltiple, error que conllevaba a la aplicación de un tratamiento erróneo, ya que mientras que la esclerosis es tratada con inmunomoduladores tipo interferón beta o acetato de glatiramer, natalizumab, etc, la neuromielitis es tratada con inmunosupresores del tipo

azatriopina, rituximab, etc (Gajofatto y Benedetti, 2015; Trebst et al., 2014). El descubrimiento del anticuerpo para AQP4 como marcador de la neuromielitis óptica (NMO-IgG) supuso un gran avance al permitir un diagnóstico temprano de la enfermedad cuando los síntomas todavía pueden llevar a confusión con la esclerosis múltiple (Lennon et al., 2004). Para la detección de este anticuerpo, como sistema de diagnóstico, se han desarrollado técnicas de inmunodetección tales como: inmunofluorescencia indirecta en tejido, inmunofluorescencia indirecta en células transfectadas con AQP4 (CBA), ELISA, radioinmunoprecipitación (RIPA), fluoroinmunoprecipitación (FIPA), siendo la técnica CBA la que más sensibilidad y especificidad ha presentado hasta el momento seguida del ELISA (De Vidi y col., 2011; Kim y col., 2012; Ruiz-Gaviria et al., 2015; Waters y Vincent, 2008). En nuestro caso, con idea de establecer un sistema de diagnóstico para la NMO en el Hospital Universitario Virgen del Rocío, se puso a punto el análisis de detección de NMO-IgG mediante la técnica de CBA, transfectando la isoforma M23 de AQP4 humana en células HEK293. Esta técnica de CBA usada fue la que presentaba una mejor relación entre sensibilidad y especificidad y los costes del ensayo resultaban adecuados. Para la verificación de la eficacia de la técnica, en términos de sensibilidad y especificidad, el Dr. Albert Saez del Hospital Clinic de Barcelona, centro de referencia en España para la detección de anticuerpos NMO-IgG nos cedió 20 muestras de pacientes negativos y positivos que permitieron confirmar la eficacia de la técnica desarrollada. En total en nuestro estudio se analizaron 181 muestras de pacientes, la inmensa mayoría obtenidas gracias a la colaboración con el servicio de neurología del HUVR, proveniente de pacientes con diferentes patologías neurológicas entre las que destacan la NMO y EM, y que tras los análisis de detección de NMO-IgG, se obtuvieron

únicamente resultados positivos para la detección de estos anticuerpos en las muestras para NMO, resultando negativos para el resto de patologías analizadas y controles. A pesar de que la presencia de anticuerpos NMO-IgG en muestras de pacientes con NMO suele detectarse entre el 70-80% de los casos (Lennon et al., 2004), ya sea porque no presenten anticuerpos o porque la titulación sea demasiado baja como para ser detectada por los ensayos ya descritos, en nuestros análisis, obtuvimos un 100% de coincidencias entre muestras de pacientes con NMO y presencia de anticuerpos NMO-IgG. Una vez realizada la técnica y verificados los resultados bajo microscopía de fluorescencia, la señal fluorescente se analizaba mediante el software informático *Image J*, que permitía cuantificar la señal y poder reportar un resultado cuantitativo al diagnóstico. El hecho de poder cuantificar los resultados, a su vez permitió poder realizar un seguimiento de los niveles de anticuerpos en los pacientes que resulten de interés en diferentes fases de la enfermedad.

## 2. Optimización del sistema de diagnóstico

Tal y como se ha mencionado, el ensayo de detección de anticuerpos NMO-IgG resultó ser 100% eficaz, siendo posible su uso como protocolo de diagnóstico de la NMO en los pacientes analizados durante el estudio. Al pretender ofrecerlo como método de diagnóstico, factores importantes a tener en cuenta eran la facilidad de realizarlo por su simpleza y el tiempo de duración. En condiciones normales pueden pasar 20 días aproximadamente para la realización del ensayo, desde que se descongelan las células, se transfectan con AQP4, se realiza la inmunohistoquímica y se cuantifica

finalmente, lo cual era un parámetro a mejorar. Una estrategia para acortar este tiempo consistió en congelar las muestras a  $-80^{\circ}\text{C}$  tras el paso de bloqueo y probar el ensayo usando muestras de células que habían sido así congeladas tras el bloqueo en el protocolo normal de una inmunohistoquímica. Se analizaron sueros de pacientes tras la recepción usando las muestras de células pretratadas y congeladas y se comprobó que los resultados finales eran obtenidos en tan sólo 3 días, a diferencia de los 20 que se tardaba si se iniciaba el procedimiento desde células frescas, y que los resultados eran muy similares a los obtenidos con el procedimiento normal, haciendo del método de diagnóstico desarrollado una herramienta altamente sensible y específica, y además rápida en la obtención del resultado.

### 3. Falsos positivos producidos por Natalizumab

Un hallazgo importante en este estudio fue encontrar un subgrupo de sueros que mostraban, tras la hibridación con las células HEK transfectadas con AQP4, una señal fluorescente en la membrana, pero que a diferencia de los sueros positivos con anticuerpos NMO-IgG que sólo marcaban las células transfectadas, estos sueros marcaban todas las células, independientemente de si expresaban o no AQP4. Este patrón de marcaje tan confuso, pensamos podría dar lugar a un diagnóstico erróneo de los pacientes y referirlos como NMO positivos cuando en realidad no lo son. Consistente con este patrón de marcaje todos los sueros tras la cuantificación corroboraron una reacción inmune positiva, mostrando diferencias notables respecto a la fluorescencia del control negativo, sin

embargo también se observaba que la señal fluorescente era mucho más débil que la producida con los sueros de pacientes NMO-IgG positivos. El análisis, por la neuróloga María Díaz Sánchez, en la historia clínica de estos pacientes mostró que común a todos ellos estaba la administración reciente del fármaco Natalizumab.

El natalizumab es un anticuerpo monoclonal dirigido contra la cadena  $\alpha 4$  de las integrinas  $\alpha 4\beta 1$  y  $\alpha 4\beta 7$  – *very late antigen 4* (VLA-4), que está en la superficie de todos los leucocitos excepto los neutrófilos. Bloquea la migración de leucocitos a través de la barrera hematoencefálica en el SNC y con ello reduce la reacción inflamatoria en pacientes con EM remitente-recidivante (Vennegoor y col., 2013). Para explicar el falso patrón observado cuando se usaron los sueros pertenecientes a pacientes tratados con natalizumab, planteamos la hipótesis de que los anticuerpos que componían el natalizumab se podían estar uniendo a la membrana de las células HEK de una manera inesperada, y este a su vez, estaba siendo reconocido por el anticuerpo secundario anti human IgG usado en el ensayo diagnóstico. Entonces, mediante PCR cuantitativa, exploramos si en las células HEK se expresa la cadena  $\alpha 4$  de la integrina que reconoce el monoclonal del Natalizumab, confirmando la expresión de altos niveles de dicha integrina tanto en células HEK sin transfectar como transfectadas con AQP4. Por otro lado, constatamos también que si aplicamos una alícuota concentrada de natalizumab (TYSABRI, 20mg/ml), exactamente el mismo producto que se les administraba a los pacientes, sobre células HEK transfectadas o no con AQP4, obteníamos un patrón de marcaje idéntico al observado tras usar suero de los pacientes tratados con natalizumab, corroborando que la unión del anticuerpo monoclonal a las integrinas presentes en la membrana de las

HEK era el origen de la señal. El análisis más cuidadoso de los sueros de pacientes tratados con natalizumab mostró que si los pacientes habían detenido el tratamiento de natalizumab mas allá de 6 meses previos a la obtención del suero, dejaban de presentar ese patrón confuso de marcaje y los niveles de fluorescencia que mostraban eran muy similares a los del suero control negativo, indicando que los niveles de natalizumab en sangre disminuían durante largos periodos de tiempo (6 meses al menos), haciéndose indetectables por el ensayo de diagnóstico.

Si bien las células HEK ofrecen propiedades muy favorables para los ensayos de CBA aquí usados, tales como alta eficiencia de transfección y niveles de expresión de AQP4 humana, una desventaja de usar estas células en ensayos de NMO también se pone de manifiesto en el presente trabajo: concretamente que la expresión constitutiva de integrinas en la membrana celular produce la unión de los anticuerpos que componen el natalizumab, siendo estos reconocidos por anticuerpos anti-IgG humano dando lugar a una falsa señal para el diagnóstico de NMO. Sería importante realizar una exploración de esta reactividad cruzada del natalizumab en diferentes líneas celulares para así poder mejorar el sistema de diagnóstico. Por otro lado, una respuesta similar a la reactividad cruzada observada con el natalizumab, también podría ser producido por otras inmunoterapias que actualmente se aplican a este tipo de enfermedades autoinmunes, lo que puede conducir a falsos positivos en el diagnóstico. A la vista de estos resultados cabe mencionar, que algunos de los efectos secundarios adversos de algunas inmunoterapias pudieran deberse a la unión de anticuerpos del fármaco a antígenos endógenos del cuerpo humano no descritos aún (Sanchez Gomar y col., 2014). Por último además, es importante destacar el valor que tiene

hacer diagnósticos claros que ayuden a dirigir con rapidez y acierto las terapias ya que concretamente en el caso de natalizumab, este tipo de tratamiento es efectivo en pacientes con EM, pero al contrario en pacientes con NMO, se ha observado como el natalizumab puede producir recaídas severas, lesiones en el cuerpo calloso, discapacidad cognitiva, en definitiva, un empeoramiento de la enfermedad (Barnett et al., 2012; Jacob y col., 2012; Kitley et al., 2014a).

#### 4. AQP1 como biomarcador de la NMOSD

Además de AQP4, en los astrocitos del SNC humano se ha detectado alta expresión de AQP1 (Misu et al., 2013; Satoh et al., 2007). Concretamente se ha visto que AQP1 se encuentra sobreexpresado en áreas propensas a desarrollar lesiones típicas de la NMO (Misu et al., 2013). Esta premisa ha llevado a pensar en AQP1 como un posible biomarcador de la NMOSD a causa de la seronegatividad para AQP4 encontrada en muchos sueros de pacientes que pertenecen a este grupo. Para el estudio de la implicación de AQP1 en la enfermedad, analizamos de nuevo las muestras en busca de anticuerpos anti-AQP1. Para ello, en primer lugar pusimos a punto la misma técnica (CBA) que tan buen resultado nos dio para la detección de anticuerpos anti-AQP4, pero ahora para detectar anti-AQP1. Tras el análisis de las 181 muestras ya analizadas para AQP4 no detectamos anticuerpos anti-AQP1 en ninguna de las muestras analizadas. En nuestro método, en el cual las células no se fijan ni permeabilizan hasta el final del ensayo para así mantener la proteína de AQP lo más conservada posible en la membrana y así el epítipo inmune, suponiendo que sea similar al de

AQP4 y esté localizado en los lazos extramembrana de las células (Iorio y col., 2013), no se detectó presencia de IgG anti-AQP1.

Un único trabajo en la literatura (Long et al., 2014b) detecta anticuerpos anti-AQP1 usando un método similar al nuestro (CBA) aquí descrito. Estos autores sin embargo, solo consiguen detectar los anticuerpos anti-AQP1 realizando un pretratamiento de las HEK-AQP4 con Triton X-100 (Long et al., 2014b), mientras que no los detectan en ausencia de permeabilización. Por ello, repetimos el mismo ensayo, pero esta vez siguiendo al detalle las condiciones establecidas por el grupo de Long y col (2014), realizando el pretratamiento de las células con Triton X-100. En nuestro caso, no obtuvimos ningún suero positivo en la detección de anti-AQP1, pero lo que si observamos fue un intenso marcaje inespecífico en todas las muestras analizadas probablemente debido a múltiples uniones inespecíficas que resultan de la unión de IgG séricas a proteínas u otros elementos del interior celular accesibles a consecuencia de la permeabilización con el tritón.

Un estudio previo (Tzartos et al., 2013), también ha mostrado presencia de anticuerpos anti-AQP1 mediante las técnicas ELISA y RIPA, y no con el método de CBA. En nuestro caso, la detección de anticuerpos anti-AQP1 con ELISA ha ciertamente mostrado resultados positivos en algunos sueros, pero estos no corresponden exclusivamente a muestras del espectro clínico de NMO. Como muestra la Figura 30, muestras de pacientes con EM también mostraron niveles significativos de anticuerpos anti-AQP1, descartándolos como marcadores que puedan ser usados para el diagnóstico o como diana terapéutica de la enfermedad; al menos de

momento y dada la sensibilidad de las técnicas de las que disponemos en la actualidad.

### 5. Papel de las acuaporinas en la hidrocefalia en humanos

AQP1, que se encuentra altamente expresada en la membrana apical del plexo coroideo, hace una contribución sustancial a la producción de LCR y es una posible diana terapéutica en el tratamiento de trastornos de la circulación del LCR. AQP4, sin embargo, se expresa en la membrana basolateral del epéndima ventricular y juega un papel importante en la homeostasis del agua cerebral. En nuestros análisis de proteína de AQP1 y AQP4 en líquido cefalorraquídeo humano vimos como en los casos de hidrocefalia, los niveles de ambas proteínas eran mayores tanto en los casos de hidrocefalia comunicante como en la obstructiva. En el caso de AQP1, aunque los valores resultan bastante heterogéneos, donde mayor número de proteína se detectó en el LCR fue en los pacientes con hidrocefalia comunicante, seguido de los pacientes con hidrocefalia obstructiva. Es posible que esto ocurra porque ante condiciones de hidrocefalia, el aumento de LCR en el ventrículo produce un incremento de la presión intracraneal, la cual puede desencadenar una respuesta reguladora para detener la producción de LCR, y por ello, la expresión de AQP1 se vea reducida (Paul y col., 2011). Sumado a esto puede ocurrir que para favorecer aún más la reducción de la tasa de producción de LCR, a la vez que la expresión de AQP1 es reducida, la proteína ya expresada en la membrana, sea desechada hacia el interior del ventrículo, siendo esta proteína la detectada por nosotros mediante ELISA. En el caso de AQP4, también

detectamos mayores niveles de proteína en pacientes con hidrocefalia respecto a los controles, lo que hace pensar que al igual que en AQP1, la expresión de la proteína se ve reducida. En algunos estudios se ha visto que en modelos animales que desarrollan hidrocefalia, la expresión de AQP4 aumenta en el epéndima, de esta forma permite aumentar la reabsorción de LCR como respuesta reguladora de la homeostasis (Feng y col., 2009; Filippidis y col., 2012). Sin embargo, a su vez se sucede otro evento, ya que al aumentar el volumen de LCR, como consecuencia, las paredes del ventrículo se expanden induciendo la denudación de células ependimarias (Dominguez-Pinos y col., 2005). Esta denudación ependimaria está íntimamente relacionada con AQP4, ya que ésta participa en la estabilidad de la pared mediante la regulación de la conexina-43, que dan lugar a las uniones GAP, por lo que, ante una situación de dilatación ventricular, las uniones gap se ven afectadas junto a AQP4, siendo vertidas al LCR (Castaneyra-Ruiz et al., 2013; Dominguez-Pinos et al., 2005). Este suceso agravaría la situación de hidrocefalia, y podría contribuir a que una hidrocefalia comunicante desemboque en una obstructiva. Por eso, en nuestros datos se observa como la hidrocefalia obstructiva presenta los mayores niveles de AQP4, indicando posiblemente el punto de máxima denudación del epéndima.

## 6. Influencia de la hipoxia en aquaporinas del plexo coroideo

Son numerosos los trabajos que describen en diferentes modelos animales de hidrocefalia como esta está asociada a una disminución de los niveles de oxígeno en el cerebro (Del Bigio y col., 2012; Dombrowski y col.,

2008). Esta hipoxia, puede tener efectos en la expresión de AQP1 en cerebro, como ya se ha descrito en trabajos previos del laboratorio donde se muestra como la hipoxia afecta a la expresión de AQP1 al alza (Abreu-Rodriguez y col., 2011). En nuestro caso, tras poner a ratones bajo condiciones de hipoxia, vimos como en los plexos coroideos, la expresión de AQP1 mostraba una tendencia en el aumento de su expresión alcanzando su pico a las 48 horas, a excepción del cultivo primario de plexo coroideo que no mostraba diferencia alguna. En lo referente a si AQP1 ve incrementada o disminuida su expresión en condiciones de hidrocefalia, a día de hoy está bastante discutida, ya que mientras unos autores ven como la hidrocefalia provoca la reducción de la expresión de AQP1 y con ello la presión intracraneal y la producción de LCR, otros o no encuentran variación alguna u observan una sobreexpresión de la proteína (Kalani et al., 2012). De todos modos, la mayoría apunta a que ante una situación de hidrocefalia, AQP1 ve reducida su expresión en plexo coroideo como mecanismo protector que permita disminuir la presión intracraneal y la producción de LCR. Por ello, aunque la hidrocefalia pueda producir una situación de hipoxia, y esto provocar el aumento de la expresión de AQP1, pueden activarse otros mecanismo en el organismo que como consecuencia tenga la regulación a la baja para que deje de participar en la producción del LCR, o como por ejemplo, tal y como ocurre al incrementar la presión intracraneal, agentes neuroendocrinos del tipo péptidos natriuréticos, son reclutados, siendo capaces de reducir el transporte de agua en plexo coroideo al activando a cGMP que permite bloquear a AQP1 (Paul et al., 2011).

## 7. Papel de las acuaporinas en cerebro

Para una aportar una visión más global del papel que pueden tener las acuaporinas en el SNC se analizaron diferentes áreas del cerebro y la expresión de las acuaporinas que se expresan en ellos. Se analizaron en ratones bajo condiciones de hipoxia y en la línea de ratón hidrocefálico hyh como veremos en el siguiente apartado. AQP1 tal y como venimos comentando en el apartado anterior sigue mostrando ese aumento de su expresión bajo condiciones de hipoxia siendo registrado su presencia únicamente en plexo coroideo. Sin embargo, AQP4 es detectada en todos los tejidos analizados mostrando una tendencia principalmente a aumentar su expresión en condiciones de hipoxia, al igual que ocurre en la formación de edemas, donde la situación de hipoxia creada favorece su expresión y participa aumentando el paso de agua en la lesión (Kaur y col., 2006). En condiciones de hidrocefalia, el entorno hipóxico creado puede inducir la expresión de AQP4, favoreciendo la reabsorción de agua, contribuyendo a la regulación homeostática. En el caso de AQP9, es detectada en todos los tejidos y mostró un aumento de expresión en todos, lo cual coincide con la literatura, donde se observa que ante algún daño cerebral que lleve asociado una hipoxia como un edema, AQP9 ve aumentada su expresión (Higashida y col., 2011).

## 8. Papel de AQP's en ratón hidrocefálico hyh

En el caso de los ratones de fenotipo hidrocefálico hyh, tras realizar un análisis similar al de la hipoxia, se observó un patrón de expresión en las acuaporinas diferente, alejando a la hipoxia como protagonista en la etiología de la enfermedad, aunque no por ello no desempeñe algún papel. En el caso de AQP1, en este caso, en los ratones hyh la expresión es menor, lo cual concuerda con muchos de los estudios antes mencionado en el que indicaban que ante una situación de hidrocefalia, como mecanismo regulador, se inhibe la expresión de AQP1 o se bloquea su función, para que así no participe en la producción de LCR (Kalani et al., 2012). En el caso de AQP4, vemos como por lo general la expresión disminuye en los ratones hyh, a excepción del plexo coroideo, donde la expresión aumenta notablemente. En una situación de hidrocefalia, lo descrito hasta ahora es que AQP4 en epéndima aumenta su expresión para poder absorber el exceso de líquido acumulado en el ventrículo, sin embargo, en este modelo animal de hidrocefalia, el epéndima sufre una denudación que comienza en los primeros días de vida y acaba al alcanzar la semana de haber nacido. Con esta denudación del tejido endimario, es arrastrado con ello AQP4, perdiendo a su vez la capacidad de regulación homeostática necesaria para solventar esa acumulación de LCR en el ventrículo (Roales-Bujan y col., 2012). Esto puede explicar la elevada diferencia registrada en plexo coroideo, ya que podría estar sobreexpresándose en este tejido para así poder realizar la función perdida en el epéndima. En el caso de AQP9, a diferencia de la hipoxia, en condiciones de hidrocefalia disminuye la expresión, lo cual puede ser debido a un mecanismo regulador para no favorecer la entrada de agua al cerebro.

## 9. AQP4 en plexo coroideo

Hasta ahora, en el plexo coroideo, siempre se ha destacado el papel exclusivo de AQP1 en su función colaboradora en la producción de LCR. Sin embargo, ya son varios los estudios que empiezan a darle cabida a AQP4 en este tejido, que, aunque no presenta los mismos niveles de expresión que AQP1, sin embargo, si se encuentra presente (Mobasher et al., 2007; Speake et al., 2003; Suzuki et al., 2013; Venero et al., 1999). En nuestros resultados, tanto, por inmunohistoquímica, western blot y PCR cuantitativa, hemos demostrado su presencia tanto a nivel de ARN como de proteína, aunque bien es cierto, que cuando intentamos localizar su ubicación, el marcaje que nos presentó fue a nivel citoplasmático y no de membrana como uno podría esperar. Estos resultados resultan coherentes con los obtenidos respecto a los análisis de expresión en condiciones e hipoxia y en ratones *hyh*, ya que como hemos mencionado anteriormente ante situaciones de hipoxia AQP4 tiende a sobreexpresarse, y en ratones *hyh* existe un aumento de expresión muy notable respecto al control *wt*, pudiendo ser debido a la compensación por la pérdida de AQP4 dispuesta en el tejido ependimario.



**CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

Las conclusiones más importantes obtenidas en esta tesis doctoral son:

1. La detección de anticuerpos NMO-IgG en el suero de pacientes mediante el método de doble inmunofluorescencia en células HEK transfectadas con AQP4, mostró una alta eficiencia, sensibilidad, rapidez y capacidad cuantitativa en el diagnóstico de la NMO.
2. El ensayo de diagnóstico desarrollado en este trabajo, de doble señal inmunofluorescente, permite evidenciar que los sueros positivos para los anticuerpos NMO-IgG (anti-AQP4) muestran la colocalización de la señal fluorescente por expresión de AQP4 y de la señal fluorescente unida a la anti-IgG que reconoce las IgG-anti-AQP4.
3. El natalizumab, reacciona con las alpha-integrinas de la membrana de las HEK, produciendo una señal inmune-fluorescente que da lugar a diagnósticos falsos positivos, por interacción de las anti-IgG con el anticuerpo monoclonal presente en el Natalizumab que se une a la membrana de las HEK, independientemente de la expresión o no de AQP4.

4. Los anticuerpos anti-AQP1, no parecen ser un buen marcador para el diagnóstico de pacientes del espectro del NMOSD.
5. En el LCR de los pacientes con hidrocefalia se detectó un aumento de los niveles de Acuaporinas. AQP1, mostró un aumento significativo en los casos de hidrocefalia comunicante, mientras que los niveles de AQP4 fueron superiores en los casos de hidrocefalia obstructiva.
6. En el cerebro, AQP1 se expresa únicamente en plexo coroideo, sin embargo, AQP4 y AQP9 además de expresarse en plexo coroideo, también se expresan en epéndima, estriado y corteza.
7. Las tres acuaporinas AQP1, AQP4 y AQP9, parecen modificarse en respuesta a hipoxia y por tanto participar en la homeostasis del LCR. No podemos descartar la posible expansión del volumen ventricular que sería indicador del desarrollo de la condición de hidrocefalia.
8. En los animales con fenotipo hidrocefálico *hyh*, se observa una fuerte sobreexpresión de AQP4 en plexo coroideo, mientras que en el epéndima, AQP4 y AQP9 ven reducida su expresión, lo que sugiere que las AQPs desempeñan un papel en el desarrollo de la hidrocefalia congénita.



## **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

- Abreu-Rodriguez, I., Sanchez Silva, R., Martins, A.P., Soveral, G., Toledo-Aral, J.J., Lopez-Barneo, J., y Echevarria, M. (2011). Functional and transcriptional induction of aquaporin-1 gene by hypoxia; analysis of promoter and role of Hif-1alpha. *PLoS One* 6, e28385.
- Arcienega, I., Brunet, J.F., Bloch, J., y Badaut, J. (2010). Cell locations for AQP1, AQP4 and 9 in the non-human primate brain. *Neuroscience* 167, 1103-1114.
- Armagan, H., Tuzun, E., Icoz, S., Birisik, O., Ulusoy, C., Demir, G., Altintas, A., y Akman-Demir, G. (2012). Long extensive transverse myelitis associated with aquaporin-4 antibody and breast cancer: favorable response to cancer treatment. *J Spinal Cord Med* 35, 267-269.
- Auguste, K.I., Jin, S., Uchida, K., Yan, D., Manley, G.T., Papadopoulos, M.C., y Verkman, A.S. (2007). Greatly impaired migration of implanted aquaporin-4-deficient astroglial cells in mouse brain toward a site of injury. *FASEB J* 21, 108-116.
- Badaut, J., Ashwal, S., Adami, A., Tone, B., Recker, R., Spagnoli, D., Ternon, B., y Obenaus, A. (2011). Brain water mobility decreases after astrocytic aquaporin-4 inhibition using RNA interference. *J Cereb Blood Flow Metab* 31, 819-831.
- Badaut, J., Fukuda, A.M., Jullienne, A., y Petry, K.G. (2014). Aquaporin and brain diseases. *Biochim Biophys Acta* 1840, 1554-1565.

- Badaut, J., y Regli, L. (2004). Distribution and possible roles of aquaporin 9 in the brain. *Neuroscience* 129, 971-981.
- Barnett, M.H., Prineas, J.W., Buckland, M.E., Parratt, J.D., y Pollard, J.D. (2012). Massive astrocyte destruction in neuromyelitis optica despite natalizumab therapy. *Mult Scler* 18, 108-112.
- Batiz, L.F., Paez, P., Jimenez, A.J., Rodriguez, S., Wagner, C., Perez-Figares, J.M., y Rodriguez, E.M. (2006). Heterogeneous expression of hydrocephalic phenotype in the *hyh* mice carrying a point mutation in alpha-SNAP. *Neurobiol Dis* 23, 152-168.
- Bergamaschi, R., Jarius, S., Robotti, M., Pichiecchio, A., Wildemann, B., y Meola, G. (2009). Two cases of benign neuromyelitis optica in patients with celiac disease. *J Neurol* 256, 2097-2099.
- Binder, D.K., Nagelhus, E.A., y Ottersen, O.P. (2012). Aquaporin-4 and epilepsy. *Glia* 60, 1203-1214.
- Bloch, O., Auguste, K.I., Manley, G.T., y Verkman, A.S. (2006). Accelerated progression of kaolin-induced hydrocephalus in aquaporin-4-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 26, 1527-1537.
- Bronson, R.T., y Lane, P.W. (1990). Hydrocephalus with hop gait (*hyh*): a new mutation on chromosome 7 in the mouse. *Brain Res Dev Brain Res* 54, 131-136.
- Brum, D.G., Barreira, A.A., dos Santos, A.C., Kaimen-Maciél, D.R., Matiello, M., Costa, R.M., Deghaide, N.H., Costa, L.S., Louzada-Junior, P., Diniz, P.R., y *col.*

(2010). HLA-DRB association in neuromyelitis optica is different from that observed in multiple sclerosis. *Mult Scler* 16, 21-29.

Castaneyra-Ruiz, L., Gonzalez-Marrero, I., Gonzalez-Toledo, J.M., Castaneyra-Ruiz, A., de Paz-Carmona, H., Castaneyra-Perdomo, A., y Carmona-Calero, E.M. (2013). Aquaporin-4 expression in the cerebrospinal fluid in congenital human hydrocephalus. *Fluids Barriers CNS* 10, 18.

Cossburn, M., Tackley, G., Baker, K., Ingram, G., Burtonwood, M., Malik, G., Pickersgill, T., te Water Naude, J., y Robertson, N. (2012). The prevalence of neuromyelitis optica in South East Wales. *Eur J Neurol* 19, 655-659.

Crane, J.M., Lam, C., Rossi, A., Gupta, T., Bennett, J.L., y Verkman, A.S. (2011). Binding affinity and specificity of neuromyelitis optica autoantibodies to aquaporin-4 M1/M23 isoforms and orthogonal arrays. *J Biol Chem* 286, 16516-16524.

Crane, J.M., y Verkman, A.S. (2009). Determinants of aquaporin-4 assembly in orthogonal arrays revealed by live-cell single-molecule fluorescence imaging. *J Cell Sci* 122, 813-821.

Cui, Y., y Bastien, D.A. (2011). Water transport in human aquaporin-4: molecular dynamics (MD) simulations. *Biochem Biophys Res Commun* 412, 654-659.

Charras, G.T., Yarrow, J.C., Horton, M.A., Mahadevan, L., y Mitchison, T.J. (2005). Non-equilibration of hydrostatic pressure in blebbing cells. *Nature* 435, 365-369.

- Cheng, H., Hong, W., Mei, Z., y Wang, X. (2015). Surgical management of non-communicating hydrocephalus in patients: meta-analysis and comparison of endoscopic third ventriculostomy and ventriculoperitoneal shunt. *J Craniofac Surg* 26, 481-486.
- Chu, V.T., Frohlich, A., Steinhäuser, G., Scheel, T., Roch, T., Fillatreau, S., Lee, J.J., Lohning, M., y Berek, C. (2011). Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. *Nat Immunol* 12, 151-159.
- Damkier, H.H., Brown, P.D., y Praetorius, J. (2010). Epithelial pathways in choroid plexus electrolyte transport. *Physiology (Bethesda)* 25, 239-249.
- Day, R.E., Kitchen, P., Owen, D.S., Bland, C., Marshall, L., Conner, A.C., Bill, R.M., y Conner, M.T. (2014). Human aquaporins: regulators of transcellular water flow. *Biochim Biophys Acta* 1840, 1492-1506.
- De Vidi, I., Boursier, G., Delouche, N., Portales, P., Cadars, E., Bouthier, M., Mettling, C., Lin, Y.L., Thouvenot, E., Carlander, B., y *col.* (2011). Strategy for anti-aquaporin-4 auto-antibody identification and quantification using a new cell-based assay. *Clin Immunol* 138, 239-246.
- Del Bigio, M.R., Khan, O.H., da Silva Lopes, L., y Juliet, P.A. (2012). Cerebral white matter oxidation and nitrosylation in young rodents with kaolin-induced hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 71, 274-288.
- Devic, E. (1894). Myelite subaiguë compliquée de névrite optique. *bull med* 8.
- Dombrowski, S.M., Deshpande, A., Dingwall, C., Leichliter, A., Leibson, Z., y Luciano, M.G. (2008). Chronic hydrocephalus-induced hypoxia: increased expression

of VEGFR-2+ and blood vessel density in hippocampus. *Neuroscience* 152, 346-359.

Dominguez-Pinos, M.D., Paez, P., Jimenez, A.J., Weil, B., Arraez, M.A., Perez-Figares, J.M., y Rodriguez, E.M. (2005). Ependymal denudation and alterations of the subventricular zone occur in human fetuses with a moderate communicating hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 595-604.

Echevarria, M., y Ilundain, A.A. (1998). Aquaporins. *J Physiol Biochem* 54, 107-118.

Echevarria, M., Windhager, E.E., Tate, S.S., y Frindt, G. (1994). Cloning and expression of AQP3, a water channel from the medullary collecting duct of rat kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 10997-11001.

Feng, X., Papadopoulos, M.C., Liu, J., Li, L., Zhang, D., Zhang, H., Verkman, A.S., y Ma, T. (2009). Sporadic obstructive hydrocephalus in Aqp4 null mice. *J Neurosci Res* 87, 1150-1155.

Filippidis, A.S., Kalani, M.Y., y ReKate, H.L. (2011). Hydrocephalus and aquaporins: lessons learned from the bench. *Childs Nerv Syst* 27, 27-33.

Filippidis, A.S., Kalani, M.Y., y ReKate, H.L. (2012). Hydrocephalus and aquaporins: the role of aquaporin-4. *Acta Neurochir Suppl* 113, 55-58.

Furman, C.S., Gorelick-Feldman, D.A., Davidson, K.G., Yasumura, T., Neely, J.D., Agre, P., y Rash, J.E. (2003). Aquaporin-4 square array assembly: opposing actions of M1 and M23 isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13609-13614.

- Fushimi, K., Uchida, S., Hara, Y., Hirata, Y., Marumo, F., y Sasaki, S. (1993). Cloning and expression of apical membrane water channel of rat kidney collecting tubule. *Nature* 361, 549-552.
- Gajofatto, A., y Benedetti, M.D. (2015). Treatment strategies for multiple sclerosis: When to start, when to change, when to stop? *World J Clin Cases* 3, 545-555.
- Gao, J., Tan, M., Gu, M., Marshall, C., Ding, J., Hu, G., y Xiao, M. (2012). Cellular localization of aquaporin-1 in the human and mouse trigeminal systems. *PLoS One* 7, e46379.
- Haj-Yasein, N.N., Vindedal, G.F., Eilert-Olsen, M., Gundersen, G.A., Skare, O., Laake, P., Klungland, A., Thoren, A.E., Burkhardt, J.M., Ottersen, O.P., y col. (2011). Glial-conditional deletion of aquaporin-4 (Aqp4) reduces blood-brain water uptake and confers barrier function on perivascular astrocyte endfeet. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 17815-17820.
- Higashida, T., Peng, C., Li, J., Dornbos, D., 3rd, Teng, K., Li, X., Kinni, H., Guthikonda, M., y Ding, Y. (2011). Hypoxia-inducible factor-1alpha contributes to brain edema after stroke by regulating aquaporins and glycerol distribution in brain. *Curr Neurovasc Res* 8, 44-51.
- Ho, J.D., Yeh, R., Sandstrom, A., Chorny, I., Harries, W.E., Robbins, R.A., Miercke, L.J., y Stroud, R.M. (2009). Crystal structure of human aquaporin 4 at 1.8 Å and its mechanism of conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 7437-7442.
- Hoftberger, R., Sepulveda, M., Armangue, T., Blanco, Y., Rostasy, K., Cobo Calvo, A., Olascoaga, J., Ramio-Torrenta, L., Reindl, M., Benito-Leon, J., y col. (2015).

Antibodies to MOG and AQP4 in adults with neuromyelitis optica and suspected limited forms of the disease. *Mult Scler* 21, 866-874.

Hsu, Y., Tran, M., y Linninger, A.A. (2015). Dynamic regulation of aquaporin-4 water channels in neurological disorders. *Croat Med J* 56, 401-421.

Hub, J.S., Grubmuller, H., y de Groot, B.L. (2009). Dynamics and energetics of permeation through aquaporins. What do we learn from molecular dynamics simulations? *Handb Exp Pharmacol*, 57-76.

Iorio, R., Fryer, J.P., Hinson, S.R., Fallier-Becker, P., Wolburg, H., Pittock, S.J., y Lennon, V.A. (2013). Astrocytic autoantibody of neuromyelitis optica (NMO-IgG) binds to aquaporin-4 extracellular loops, monomers, tetramers and high order arrays. *J Autoimmun* 40, 21-27.

Iorio, R., Lucchinetti, C.F., Lennon, V.A., Costanzi, C., Hinson, S., Weinschenker, B.G., y Pittock, S.J. (2011). Syndrome of inappropriate antidiuresis may herald or accompany neuromyelitis optica. *Neurology* 77, 1644-1646.

Iyer, A., Elson, L., Appleton, R., y Jacob, A. (2014). A review of the current literature and a guide to the early diagnosis of autoimmune disorders associated with neuromyelitis optica. *Autoimmunity* 47, 154-161.

Jacob, A., Hutchinson, M., Elson, L., Kelly, S., Ali, R., Saikans, I., Tubridy, N., y Boggild, M. (2012). Does natalizumab therapy worsen neuromyelitis optica? *Neurology* 79, 1065-1066.

- Jacob, A., Matiello, M., Wingerchuk, D.M., Lucchinetti, C.F., Pittock, S.J., y Weinschenker, B.G. (2007). Neuromyelitis optica: changing concepts. *J Neuroimmunol* 187, 126-138.
- Jarius, S., Aboul-Enein, F., Waters, P., Kuenz, B., Hauser, A., Berger, T., Lang, W., Reindl, M., Vincent, A., y Kristoferitsch, W. (2008). Antibody to aquaporin-4 in the long-term course of neuromyelitis optica. *Brain* 131, 3072-3080.
- Jarius, S., Franciotta, D., Paul, F., Ruprecht, K., Bergamaschi, R., Rommer, P.S., Reuss, R., Probst, C., Kristoferitsch, W., Wandinger, K.P., y col. (2010). Cerebrospinal fluid antibodies to aquaporin-4 in neuromyelitis optica and related disorders: frequency, origin, and diagnostic relevance. *J Neuroinflammation* 7, 52.
- Jarius, S., Ruprecht, K., Wildemann, B., Kuempfel, T., Ringelstein, M., Geis, C., Kleiter, I., Kleinschnitz, C., Berthele, A., Brettschneider, J., y col. (2012). Contrasting disease patterns in seropositive and seronegative neuromyelitis optica: A multicentre study of 175 patients. *J Neuroinflammation* 9, 14.
- Jung, J.S., Bhat, R.V., Preston, G.M., Guggino, W.B., Baraban, J.M., y Agre, P. (1994). Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 13052-13056.
- Kalani, M.Y., Filippidis, A.S., y ReKate, H.L. (2012). Hydrocephalus and aquaporins: the role of aquaporin-1. *Acta Neurochir Suppl* 113, 51-54.
- Kalluri, S.R., Illes, Z., Srivastava, R., Cree, B., Menge, T., Bennett, J.L., Berthele, A., y Hemmer, B. (2010). Quantification and functional characterization of

- antibodies to native aquaporin 4 in neuromyelitis optica. *Arch Neurol* 67, 1201-1208.
- Kaur, C., Sivakumar, V., Zhang, Y., y Ling, E.A. (2006). Hypoxia-induced astrocytic reaction and increased vascular permeability in the rat cerebellum. *Glia* 54, 826-839.
- Kim, W., Kim, S.H., y Kim, H.J. (2011). New insights into neuromyelitis optica. *J Clin Neurol* 7, 115-127.
- Kim, Y.J., Jung, S.W., Kim, Y., Park, Y.J., Han, K., y Oh, E.J. (2012). Detection of anti-aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica: comparison of tissue-based and cell-based indirect immunofluorescence assays and ELISA. *J Clin Lab Anal* 26, 184-189.
- Kimbrough, D.J., Fujihara, K., Jacob, A., Lana-Peixoto, M.A., Leite, M.I., Levy, M., Marignier, R., Nakashima, I., Palace, J., de Seze, J., y *col.* (2012). Treatment of Neuromyelitis Optica: Review and Recommendations. *Mult Scler Relat Disord* 1, 180-187.
- Kitley, J., Evangelou, N., Kuker, W., Jacob, A., Leite, M.I., y Palace, J. (2014a). Catastrophic brain relapse in seronegative NMO after a single dose of natalizumab. *J Neurol Sci* 339, 223-225.
- Kitley, J., Waters, P., Woodhall, M., Leite, M.I., Murchison, A., George, J., Kuker, W., Chandratre, S., Vincent, A., y Palace, J. (2014b). Neuromyelitis optica spectrum disorders with aquaporin-4 and myelin-oligodendrocyte glycoprotein antibodies: a comparative study. *JAMA Neurol* 71, 276-283.

- Kitley, J., Woodhall, M., Waters, P., Leite, M.I., Devenney, E., Craig, J., Palace, J., y Vincent, A. (2012). Myelin-oligodendrocyte glycoprotein antibodies in adults with a neuromyelitis optica phenotype. *Neurology* 79, 1273-1277.
- Klawiter, E.C., Alvarez, E., 3rd, Xu, J., Paciorkowski, A.R., Zhu, L., Parks, B.J., Cross, A.H., y Naismith, R.T. (2009). NMO-IgG detected in CSF in seronegative neuromyelitis optica. *Neurology* 72, 1101-1103.
- Kleiter, I., Hellwig, K., Berthele, A., Kumpf, T., Linker, R.A., Hartung, H.P., Paul, F., Aktas, O., y Neuromyelitis Optica Study, G. (2012). Failure of natalizumab to prevent relapses in neuromyelitis optica. *Arch Neurol* 69, 239-245.
- Kremer, L., Mealy, M., Jacob, A., Nakashima, I., Cabre, P., Bigi, S., Paul, F., Jarius, S., Aktas, O., Elson, L., y *col.* (2013). Brainstem manifestations in neuromyelitis optica: a multicenter study of 258 patients. *Mult Scler.*
- Lana-Peixoto, M.A. (2008). Devic's neuromyelitis optica: a critical review. *Arq Neuropsiquiatr* 66, 120-138.
- Lee, D.J., Hsu, M.S., Seldin, M.M., Arellano, J.L., y Binder, D.K. (2012). Decreased expression of the glial water channel aquaporin-4 in the intrahippocampal kainic acid model of epileptogenesis. *Exp Neurol* 235, 246-255.
- Lennon, V.A., Wingerchuk, D.M., Kryzer, T.J., Pittock, S.J., Lucchinetti, C.F., Fujihara, K., Nakashima, I., y Weinshenker, B.G. (2004). A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet* 364, 2106-2112.

- Long, Y., Zheng, Y., Chen, M., Zhang, B., Gao, C., Shan, F., Yang, N., y Fan, Y. (2014a). Serum thyroid-stimulating hormone and anti-thyroglobulin antibody are independently associated with lesions in spinal cord in central nervous system demyelinating diseases. *PLoS One* 9, e100672.
- Long, Y., Zheng, Y., Shan, F., Chen, M., Fan, Y., Zhang, B., Gao, C., Gao, Q., y Yang, N. (2014b). Development of a cell-based assay for the detection of anti-aquaporin 1 antibodies in neuromyelitis optica spectrum disorders. *J Neuroimmunol* 273, 103-110.
- Lu, M., Lee, M.D., Smith, B.L., Jung, J.S., Agre, P., Verdijk, M.A., Merks, G., Rijss, J.P., y Deen, P.M. (1996). The human AQP4 gene: definition of the locus encoding two water channel polypeptides in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10908-10912.
- Lucchinetti, C.F., Mandler, R.N., McGavern, D., Bruck, W., Gleich, G., Ransohoff, R.M., Trebst, C., Weinshenker, B., Wingerchuk, D., Parisi, J.E., y *col.* (2002). A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain* 125, 1450-1461.
- Lun, M.P., Monuki, E.S., y Lehtinen, M.K. (2015). Development and functions of the choroid plexus-cerebrospinal fluid system. *Nat Rev Neurosci* 16, 445-457.
- Mader, S., Gredler, V., Schanda, K., Rostasy, K., Dujmovic, I., Pfaller, K., Lutterotti, A., Jarius, S., Di Pauli, F., Kuenz, B., y *col.* (2011). Complement activating antibodies to myelin oligodendrocyte glycoprotein in neuromyelitis optica and related disorders. *J Neuroinflammation* 8, 184.

- Magana, S.M., Matiello, M., Pittock, S.J., McKeon, A., Lennon, V.A., Rabinstein, A.A., Shuster, E., Kantarci, O.H., Lucchinetti, C.F., y Weinschenker, B.G. (2009). Posterior reversible encephalopathy syndrome in neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology* 72, 712-717.
- Mandler, R.N. (2006). Neuromyelitis optica - Devic's syndrome, update. *Autoimmun Rev* 5, 537-543.
- Marignier, R., Bernard-Valnet, R., Giraudon, P., Collongues, N., Papeix, C., Zephir, H., Cavillon, G., Rogemond, V., Casey, R., Frangoulis, B., y col. (2013). Aquaporin-4 antibody-negative neuromyelitis optica: distinct assay sensitivity-dependent entity. *Neurology* 80, 2194-2200.
- Marmarou, A. (2007). A review of progress in understanding the pathophysiology and treatment of brain edema. *Neurosurg Focus* 22, E1.
- Mata, S., y Lolli, F. (2011). Neuromyelitis optica: an update. *J Neurol Sci* 303, 13-21.
- Matiello, M., Kim, H.J., Kim, W., Brum, D.G., Barreira, A.A., Kingsbury, D.J., Plant, G.T., Adoni, T., y Weinschenker, B.G. (2010). Familial neuromyelitis optica. *Neurology* 75, 310-315.
- Matiello, M., Schaefer-Klein, J.L., Hebrink, D.D., Kingsbury, D.J., Atkinson, E.J., Weinschenker, B.G., y Collaborators, N.M.O.G. (2011). Genetic analysis of aquaporin-4 in neuromyelitis optica. *Neurology* 77, 1149-1155.
- Matsushita, T., Matsuoka, T., Isobe, N., Kawano, Y., Minohara, M., Shi, N., Nishimura, Y., Ochi, H., y Kira, J. (2009). Association of the HLA-DPB1\*0501 allele with anti-aquaporin-4 antibody positivity in Japanese patients with

idiopathic central nervous system demyelinating disorders. *Tissue Antigens* 73, 171-176.

McKeon, A., Lennon, V.A., Jacob, A., Matiello, M., Lucchinetti, C.F., Kale, N., Chan, K.H., Weinshenker, B.G., Apiwattanakul, M., Wingerchuk, D.M., y col. (2009). Coexistence of myasthenia gravis and serological markers of neurological autoimmunity in neuromyelitis optica. *Muscle Nerve* 39, 87-90.

McKeon, A., Lennon, V.A., Lotze, T., Tenenbaum, S., Ness, J.M., Rensel, M., Kuntz, N.L., Fryer, J.P., Homburger, H., Hunter, J., y col. (2008). CNS aquaporin-4 autoimmunity in children. *Neurology* 71, 93-100.

McKeon, A., Pittock, S.J., y Lennon, V.A. (2011). CSF complements serum for evaluating paraneoplastic antibodies and NMO-IgG. *Neurology* 76, 1108-1110.

Mealy, M.A., Wingerchuk, D.M., Greenberg, B.M., y Levy, M. (2012). Epidemiology of neuromyelitis optica in the United States: a multicenter analysis. *Arch Neurol* 69, 1176-1180.

Min, J.H., Kim, B.J., y Lee, K.H. (2012). Development of extensive brain lesions following fingolimod (FTY720) treatment in a patient with neuromyelitis optica spectrum disorder. *Mult Scler* 18, 113-115.

Misu, T., Hoftberger, R., Fujihara, K., Wimmer, I., Takai, Y., Nishiyama, S., Nakashima, I., Konno, H., Bradl, M., Garzuly, F., y col. (2013). Presence of six different lesion types suggests diverse mechanisms of tissue injury in neuromyelitis optica. *Acta Neuropathol* 125, 815-827.

- Mobasheri, A., Marples, D., Young, I.S., Floyd, R.V., Moskaluk, C.A., y Frigeri, A. (2007). Distribution of the AQP4 water channel in normal human tissues: protein and tissue microarrays reveal expression in several new anatomical locations, including the prostate gland and seminal vesicles. *Channels (Austin)* *1*, 29-38.
- Nagelhus, E.A., Veruki, M.L., Torp, R., Haug, F.M., Laake, J.H., Nielsen, S., Agre, P., y Ottersen, O.P. (1998). Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes. *J Neurosci* *18*, 2506-2519.
- Nakamura, M., Endo, M., Murakami, K., Konno, H., Fujihara, K., y Itoyama, Y. (2005). An autopsied case of neuromyelitis optica with a large cavitory cerebral lesion. *Mult Scler* *11*, 735-738.
- Nielsen, S., Nagelhus, E.A., Amiry-Moghaddam, M., Bourque, C., Agre, P., y Ottersen, O.P. (1997). Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci* *17*, 171-180.
- Nielsen, S., Smith, B.L., Christensen, E.I., y Agre, P. (1993). Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 7275-7279.
- Oshio, K., Binder, D.K., Yang, B., Schechter, S., Verkman, A.S., y Manley, G.T. (2004). Expression of aquaporin water channels in mouse spinal cord. *Neuroscience* *127*, 685-693.

- Oshio, K., Watanabe, H., Song, Y., Verkman, A.S., y Manley, G.T. (2005). Reduced cerebrospinal fluid production and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel Aquaporin-1. *FASEB J* 19, 76-78.
- Papadopoulos, M.C., Bennett, J.L., y Verkman, A.S. (2014). Treatment of neuromyelitis optica: state-of-the-art and emerging therapies. *Nat Rev Neurol* 10, 493-506.
- Papadopoulos, M.C., Manley, G.T., Krishna, S., y Verkman, A.S. (2004). Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *FASEB J* 18, 1291-1293.
- Papadopoulos, M.C., y Verkman, A.S. (2005). Aquaporin-4 gene disruption in mice reduces brain swelling and mortality in pneumococcal meningitis. *J Biol Chem* 280, 13906-13912.
- Papadopoulos, M.C., y Verkman, A.S. (2007). Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatr Nephrol* 22, 778-784.
- Papadopoulos, M.C., y Verkman, A.S. (2013). Aquaporin water channels in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 14, 265-277.
- Papais-Alvarenga, R.M., Miranda-Santos, C.M., Puccioni-Sohler, M., de Almeida, A.M., Oliveira, S., Basilio De Oliveira, C.A., Alvarenga, H., y Poser, C.M. (2002). Optic neuromyelitis syndrome in Brazilian patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 73, 429-435.
- Papeix, C., Vidal, J.S., de Seze, J., Pierrot-Deseilligny, C., Tourbah, A., Stankoff, B., Lebrun, C., Moreau, T., Vermersch, P., Fontaine, B., y *col.* (2007).

Immunosuppressive therapy is more effective than interferon in neuromyelitis optica. *Mult Scler* 13, 256-259.

Paul, L., Madan, M., Rammling, M., Chigurupati, S., Chan, S.L., y Pattisapu, J.V. (2011). Expression of aquaporin 1 and 4 in a congenital hydrocephalus rat model. *Neurosurgery* 68, 462-473.

Phuan, P.W., Ratelade, J., Rossi, A., Tradtrantip, L., y Verkman, A.S. (2012). Complement-dependent cytotoxicity in neuromyelitis optica requires aquaporin-4 protein assembly in orthogonal arrays. *J Biol Chem* 287, 13829-13839.

Pittock, S.J., Lennon, V.A., de Seze, J., Vermersch, P., Homburger, H.A., Wingerchuk, D.M., Lucchinetti, C.F., Zephir, H., Moder, K., y Weinschenker, B.G. (2008). Neuromyelitis optica and non organ-specific autoimmunity. *Arch Neurol* 65, 78-83.

Pittock, S.J., Weinschenker, B.G., Lucchinetti, C.F., Wingerchuk, D.M., Corboy, J.R., y Lennon, V.A. (2006). Neuromyelitis optica brain lesions localized at sites of high aquaporin 4 expression. *Arch Neurol* 63, 964-968.

Polman, C.H., O'Connor, P.W., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Miller, D.H., Phillips, J.T., Lublin, F.D., Giovannoni, G., Wajgt, A., y *col.* (2006). A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 354, 899-910.

Preston, G.M., y Agre, P. (1991). Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 11110-11114.

- Preston, G.M., Carroll, T.P., Guggino, W.B., y Agre, P. (1992). Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256, 385-387.
- Raina, S., Preston, G.M., Guggino, W.B., y Agre, P. (1995). Molecular cloning and characterization of an aquaporin cDNA from salivary, lacrimal, and respiratory tissues. *J Biol Chem* 270, 1908-1912.
- Rash, J.E., Yasumura, T., Hudson, C.S., Agre, P., y Nielsen, S. (1998). Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11981-11986.
- Ratelade, J., Bennett, J.L., y Verkman, A.S. (2011). Evidence against cellular internalization in vivo of NMO-IgG, aquaporin-4, and excitatory amino acid transporter 2 in neuromyelitis optica. *J Biol Chem* 286, 45156-45164.
- Ratelade, J., y Verkman, A.S. (2012). Neuromyelitis optica: aquaporin-4 based pathogenesis mechanisms and new therapies. *Int J Biochem Cell Biol* 44, 1519-1530.
- Reindl, M., Di Pauli, F., Rostasy, K., y Berger, T. (2013). The spectrum of MOG autoantibody-associated demyelinating diseases. *Nat Rev Neurol* 9, 455-461.
- Rekate, H.L. (2009). A contemporary definition and classification of hydrocephalus. *Semin Pediatr Neurol* 16, 9-15.

- Rivera, J.F., Kurtzke, J.F., Booth, V.J., y Corona, V.T.t. (2008). Characteristics of Devic's disease (neuromyelitis optica) in Mexico. *J Neurol* 255, 710-715.
- Roales-Bujan, R., Paez, P., Guerra, M., Rodriguez, S., Vio, K., Ho-Plagaro, A., Garcia-Bonilla, M., Rodriguez-Perez, L.M., Dominguez-Pinos, M.D., Rodriguez, E.M., y col. (2012). Astrocytes acquire morphological and functional characteristics of ependymal cells following disruption of ependyma in hydrocephalus. *Acta Neuropathol* 124, 531-546.
- Rothstein, J.D., Patel, S., Regan, M.R., Haenggeli, C., Huang, Y.H., Bergles, D.E., Jin, L., Dykes Hoberg, M., Vidensky, S., Chung, D.S., y col. (2005). Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 433, 73-77.
- Ruiz-Gaviria, R., Baracaldo, I., Castaneda, C., Ruiz-Patino, A., Acosta-Hernandez, A., y Rosselli, D. (2015). Specificity and sensitivity of aquaporin 4 antibody detection tests in patients with neuromyelitis optica: A meta-analysis. *Mult Scler Relat Disord* 4, 345-349.
- Saadoun, S., Papadopoulos, M.C., Watanabe, H., Yan, D., Manley, G.T., y Verkman, A.S. (2005). Involvement of aquaporin-4 in astroglial cell migration and glial scar formation. *J Cell Sci* 118, 5691-5698.
- Sanchez Gomar, I., Diaz Sanchez, M., Ucles Sanchez, A.J., Casado Chocan, J.L., Ramirez-Lorca, R., Serna, A., Villadiego, J., Toledo-Aral, J.J., y Echevarria, M. (2014). An immunoassay that distinguishes real neuromyelitis optica signals from a labeling detected in patients receiving natalizumab. *BMC Neurol* 14, 139.

- Sato, D.K., Callegaro, D., Lana-Peixoto, M.A., Waters, P.J., de Haidar Jorge, F.M., Takahashi, T., Nakashima, I., Apostolos-Pereira, S.L., Talim, N., Simm, R.F., y *col.* (2014). Distinction between MOG antibody-positive and AQP4 antibody-positive NMO spectrum disorders. *Neurology* 82, 474-481.
- Satoh, J., Tabunoki, H., Yamamura, T., Arima, K., y Konno, H. (2007). Human astrocytes express aquaporin-1 and aquaporin-4 in vitro and in vivo. *Neuropathology* 27, 245-256.
- Schanda, K., Waters, P., Holzer, H., Aboulenein-Djamshidian, F., Leite, M.I., Palace, J., Vukusic, S., Marignier, R., Berger, T., y Reindl, M. (2015). Antibodies to aquaporin-1 are not present in neuromyelitis optica. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2, e160.
- Solenov, E., Watanabe, H., Manley, G.T., y Verkman, A.S. (2004). Sevenfold-reduced osmotic water permeability in primary astrocyte cultures from AQP-4-deficient mice, measured by a fluorescence quenching method. *Am J Physiol Cell Physiol* 286, C426-432.
- Speake, T., Freeman, L.J., y Brown, P.D. (2003). Expression of aquaporin 1 and aquaporin 4 water channels in rat choroid plexus. *Biochim Biophys Acta* 1609, 80-86.
- Spector, R., Keep, R.F., Robert Snodgrass, S., Smith, Q.R., y Johanson, C.E. (2015). A balanced view of choroid plexus structure and function: Focus on adult humans. *Exp Neurol* 267, 78-86.

- Suzuki, Y., Nakamura, Y., Yamada, K., Huber, V.J., Tsujita, M., y Nakada, T. (2013). Aquaporin-4 positron emission tomography imaging of the human brain: first report. *J Neuroimaging* 23, 219-223.
- Tait, M.J., Saadoun, S., Bell, B.A., y Papadopoulos, M.C. (2008). Water movements in the brain: role of aquaporins. *Trends Neurosci* 31, 37-43.
- Trebst, C., Jarius, S., Berthele, A., Paul, F., Schippling, S., Wildemann, B., Borisow, N., Kleiter, I., Aktas, O., Kumpfel, T., y col. (2014). Update on the diagnosis and treatment of neuromyelitis optica: recommendations of the Neuromyelitis Optica Study Group (NEMOS). *J Neurol* 261, 1-16.
- Tzartos, J.S., Stergiou, C., Kilidireas, K., Zisimopoulou, P., Thomaidis, T., y Tzartos, S.J. (2013). Anti-aquaporin-1 autoantibodies in patients with neuromyelitis optica spectrum disorders. *PLoS One* 8, e74773.
- Venero, J.L., Vizueté, M.L., Ilundain, A.A., Machado, A., Echevarria, M., y Cano, J. (1999). Detailed localization of aquaporin-4 messenger RNA in the CNS: preferential expression in periventricular organs. *Neuroscience* 94, 239-250.
- Vennegoor, A., Rispens, T., Strijbis, E.M., Seewann, A., Uitdehaag, B.M., Balk, L.J., Barkhof, F., Polman, C.H., Wolbink, G., y Killestein, J. (2013). Clinical relevance of serum natalizumab concentration and anti-natalizumab antibodies in multiple sclerosis. *Mult Scler* 19, 593-600.
- Verkman, A.S. (2005). More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins. *J Cell Sci* 118, 3225-3232.

- Vernant, J.C., Cabre, P., Smadja, D., Merle, H., Caubarrere, I., Mikol, J., y Poser, C.M. (1997). Recurrent optic neuromyelitis with endocrinopathies: a new syndrome. *Neurology* 48, 58-64.
- Walz, T., Fujiyoshi, Y., y Engel, A. (2009). The AQP structure and functional implications. *Handb Exp Pharmacol*, 31-56.
- Wang, D., Nykanen, M., Yang, N., Winlaw, D., North, K., Verkman, A.S., y Oowler, B.K. (2011). Altered cellular localization of aquaporin-1 in experimental hydrocephalus in mice and reduced ventriculomegaly in aquaporin-1 deficiency. *Mol Cell Neurosci* 46, 318-324.
- Waters, P., y Vincent, A. (2008). Detection of anti-aquaporin-4 antibodies in neuromyelitis optica: current status of the assays. *Int MS J* 15, 99-105.
- Wingerchuk, D.M. (2009). Neuromyelitis optica: effect of gender. *J Neurol Sci* 286, 18-23.
- Wingerchuk, D.M., Banwell, B., Bennett, J.L., Cabre, P., Carroll, W., Chitnis, T., de Seze, J., Fujihara, K., Greenberg, B., Jacob, A., y col. (2015). International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders. *Neurology* 85, 177-189.
- Wingerchuk, D.M., Hogancamp, W.F., O'Brien, P.C., y Weinshenker, B.G. (1999). The clinical course of neuromyelitis optica (Devic's syndrome). *Neurology* 53, 1107-1114.

- Wingerchuk, D.M., Lennon, V.A., Pittock, S.J., Lucchinetti, C.F., y Weinshenker, B.G. (2006). Revised diagnostic criteria for neuromyelitis optica. *Neurology* 66, 1485-1489.
- Wolburg, H. (1995). Orthogonal arrays of intramembranous particles: a review with special reference to astrocytes. *J Hirnforsch* 36, 239-258.
- Yang, B., Brown, D., y Verkman, A.S. (1996). The mercurial insensitive water channel (AQP-4) forms orthogonal arrays in stably transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 271, 4577-4580.
- Yang, B., Ma, T., y Verkman, A.S. (1995). cDNA cloning, gene organization, and chromosomal localization of a human mercurial insensitive water channel. Evidence for distinct transcriptional units. *J Biol Chem* 270, 22907-22913.
- Zephir, H., Fajardy, I., Outteryck, O., Blanc, F., Roger, N., Fleury, M., Rudolf, G., Marignier, R., Vukusic, S., Confavreux, C., y col. (2009). Is neuromyelitis optica associated with human leukocyte antigen? *Mult Scler* 15, 571-579.
- Zhang, H., y Verkman, A.S. (2013). Eosinophil pathogenicity mechanisms and therapeutics in neuromyelitis optica. *J Clin Invest* 123, 2306-2316.