

Plexo coroideo y envejecimiento: Estudio morfológico e histoquímico

Alumnos que han realizado y presentado el trabajo:

Carlos Castellano Herrera

Saúl De Burgos González

Esther Espinosa Padrón

Tutora:

Emilia Carmona Calero

Departamento de Anatomía y Embriología Humana

Facultad de Medicina

Universidad de La Laguna

ÍNDICE

| | |
|---------------------------------------|----|
| RESUMEN_____ | 2 |
| INTRODUCCIÓN_____ | 4 |
| HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS_____ | 10 |
| MATERIAL Y MÉTODOS_____ | 11 |
| RESULTADOS _____ | 13 |
| DISCUSIÓN_____ | 20 |
| CONCLUSIONES_____ | 24 |
| ¿QUÉ HEMOS APRENDIDO?_____ | 25 |
| BIBLIOGRAFÍA_____ | 26 |

RESUMEN

Introducción: Los plexos coroideos (PC) son estructuras localizadas en los ventrículos laterales, tercer y cuarto ventrículo. Se encargan de la producción y la filtración del LCR, segregan gran variedad de sustancias como transferrina, citoquinas o transtirretina (TTR) entre otras. Forman parte de la barrera sangre-LCR. En este estudio queremos observar los cambios que ocurren en los PC en la senescencia.

Material y métodos: Se ha observado al microscopio óptico muestras de PC de 8 casos de edades comprendidas entre los 63 y los 97 años. Estas muestras fueron teñidas con violeta y tratadas con técnicas inmunohistoquímicas para TTR y AQP1.

Resultados: Hemos observado la presencia de alteraciones en la anatomía de los PC, destacando alteraciones a nivel del epitelio, encontramos un progresivo aumento de la separación entre las células, pérdida de la altura pasando de una capa monoestratificada de células cuboideas a células planas. Finalmente, se aprecian cambios en la disposición nuclear de las células. En el estroma llama la atención la presencia de fibrosis, calcificaciones y cuerpos de Psamoma. La vasculatura comienza presentando pequeñas modificaciones en sus tunicas para acabar apareciendo vasos de gran calibre y con una reducción importante del grosor de sus paredes. Las técnicas inmunohistoquímicas revelaron la disminución de la TTR, y también de AQP1. Hay que destacar la disminución de AQP1 en nuestros casos con ventriculomegalia.

Conclusiones: Se objetiva una progresiva alteración en la anatomía del PC, disminuyen los niveles de TTR y se produce un aumento de AQP1, salvo en presencia de ventriculomegalia donde disminuye.

PALABRAS CLAVE: plexos coroideos, envejecimiento, inmunohistoquímica, microscopía.

SUMMARY

Introduction: Choroid plexus (CP) are structures located in the lateral ventricles, third and fourth ventricles. Their main function is to produce and filtrate CSF, segregate a great variety of substances like transferrin, cytokines or transthyretin (TTR) among others. They are part of the blood-CSF barrier. In this research, we want to regard the changes that happen in the CP through the senescence.

Materials and methods: It has been observed with the optical microscope the CP of 8 cases whose ages are between 63 and 97 years old. These samples were dyed in purple and treated with immunohistochemical techniques for TTR y AQP1.

Results: We have observed that the presence of alterations in the CP anatomy, highlighting alterations at epithelium's level, where we can find a progressively increased separation of cells, loss of height from presenting a monostratified layer of cuboid cells to flat cells. Finally, we can appreciate changes in the nuclear distribution of cells. In the stroma, attention is drawn to fibrosis, calcifications, and bodies of Psammoma. Vasculature starts showing small modifications in its tunics to ending appearing large vessels and with a significant reduction in the thickness of their walls. The immunohistochemical techniques revealed the decrease of the TTR, and also of AQP1. We must highlight the decrease in AQP1 in our cases with ventriculomegaly.

Conclusions: A progressive alteration in the anatomy of the CP is observed, TTR levels decrease and there is an increase of AQP1, except in the presence of ventriculomegaly where it decreases.

KEY WORDS: choroid plexus, aging, immunochemistry, microscopy.

INTRODUCCIÓN

Plexos coroideos

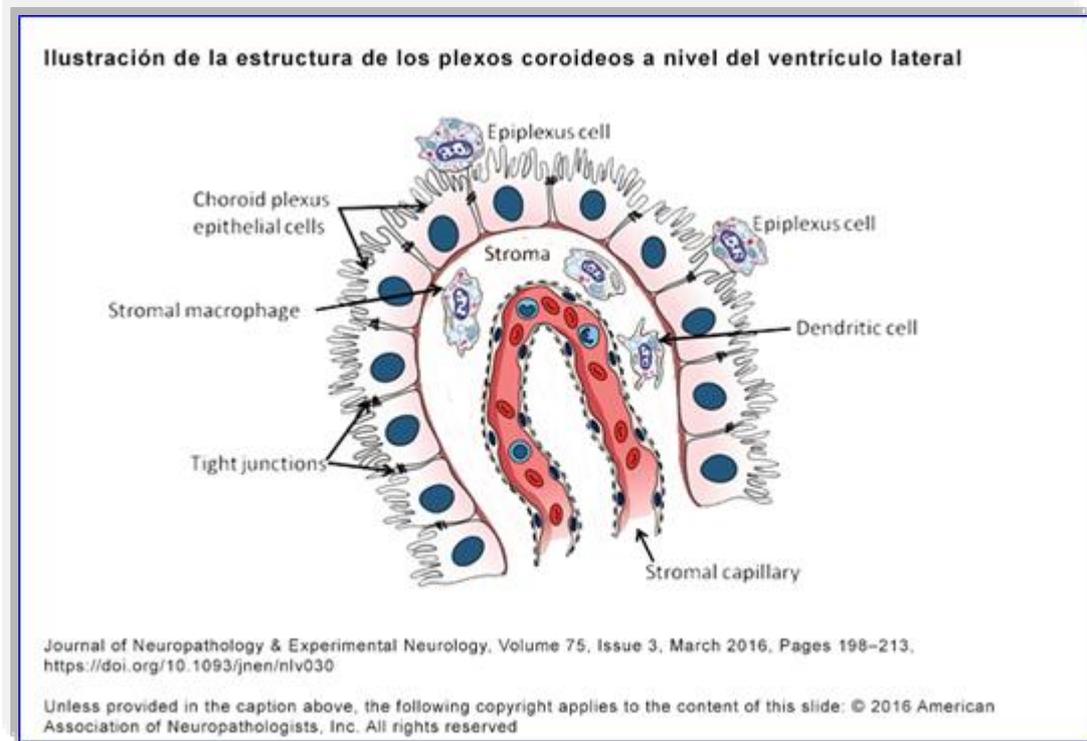
Los plexos coroideos (PC) son estructuras localizadas a nivel encefálico formados, por una capa epitelial única y un eje estromal por donde discurren los vasos sanguíneos. Las células de esta monocapa epitelial tienen forma cuboidea, núcleo esférico a nivel basal o central y pueden contener hasta tres nucléolos y un citoplasma con mitocondrias abundantes, sobre todo a nivel basal que compensan las altas necesidades metabólicas y los requerimientos energéticos de las células. Se estima que el número de células epiteliales que conforman los PC es de unos 100 millones y su eje longitudinal es de unas 15 μm . En su polo apical presentan numerosas microvellosidades y pocos cilios. En estudios con ratas se ha descrito que tienen una superficie de unos 75 cm^2 , algo menos de la mitad de la superficie total (155 cm^2) de los capilares de la barrera hematoencefálica (BHE). En su polo basal separando el epitelio del estroma, se encuentra la membrana basal. El estroma contiene interdigitaciones ricas en fibras de colágeno IV, pocas células y grandes capilares fenestrados. Los PC son estructuras muy vascularizadas, en ratas incluso más que la propia corteza cerebral. En la parte proximal del tejido conectivo se sitúan los capilares fenestrados de gran calibre, derivadas de las arterias coroideas. Las fenestraciones permiten el paso de pequeñas moléculas hidrófilas al líquido intersticial (1-3).

Las arteriolas más grandes también se pueden ver en la base del plexo coroideo. En el glomus¹, los vasos del plexo coroideo tienen características diferentes y se consideran venas modificadas, ya que no tienen capa muscular en sus paredes. En esta área, los vasos de gran calibre pueden verse anastomosados con otros de calibre muy pequeño. Además, el endotelio y el tejido conectivo de estos vasos son inseparables del tejido conjuntivo circundante del plexo coroideo (4).

En la especie humana la irrigación de los ventrículos laterales corre a cargo de las arterias coroideas anteriores (ramas de la arteria carótida interna) y coroideas posteriores

¹ Agrandamiento del plexo coroideo situado en el cuerpo de los ventrículos laterales.

(ramas de la arteria cerebral posterior), participando, estas últimas, en la irrigación del tercer ventrículo (5).



Desarrollo de los plexos coroideos (PC)

Los PC surgirán del eje dorsal del tubo neural, el epitelio del ectodermo y el estroma del mesodermo primero a nivel del cuarto ventrículo sobre la novena semana de gestación (6). Le siguen los ventrículos laterales y, finalmente, el tercero. Independientemente de la duración de la gestación siempre se sigue el mismo orden. Durante su desarrollo el epitelio de los PC va sufriendo una serie de cambios histológicos lo que permite dividirlo en cuatro fases, tal y como postularon en 1975 los autores Netsky y Shuangshoti (7). En la primera fase, el tejido parece tener epitelio pseudoestratificado con núcleos centrales y carece de glucógeno. En la segunda, las células epiteliales se diferencian en epitelio columnar bajo con núcleos apicales y abundante glucógeno. Ya en la tercera, el epitelio columnar da paso a un epitelio cuboidal con núcleo central o apical y un descenso del contenido de glucógeno. En la cuarta y última, el epitelio sigue siendo cuboidal o escamoso, pero ya carente de glucógeno.

La presencia de ese glucógeno parece estar en relación con satisfacer las necesidades metabólicas del desarrollo (8).

Funciones de los plexos coroideos

Sabemos que los PC sintetizan una variedad de sustancias, como por ejemplo, transferrina (proteína transportadora selectiva del hierro), factores de crecimiento (insulínico, hepático, nervioso, fibroblástico y del endotelio vascular), neuropéptidos, citoquinas o transtiretina (TTR), entre otras. La TTR se sintetiza principalmente en tres localizaciones distintas. En primer lugar, a nivel hepático, para posteriormente pasar a la sangre donde actúa como transportadora de la hormona tiroidea. A nivel del PC representa hasta el 25% de las proteínas sintetizadas por éste y un 5% de las proteínas presentes en el líquido cefalorraquídeo (LCR). Esto nos permite, si conocemos sus niveles, saber el volumen de secreción de LCR por parte de los PC, lo que constituye un hallazgo relevante en la hipertensión arterial (HTA), por ejemplo. González-Marrero et al (9), en 2012, observaron que los niveles de TTR en ratas hipertensas de mediana edad se encontraban disminuidos y, en consecuencia, la síntesis de LCR; aunque en las ratas de mayor edad se observó un ligero aumento de la TTR que se pensó que era consecuencia de un mecanismo de compensación por esa pérdida de producción de LCR. Sin embargo, su función principal a este nivel consiste en controlar el transporte de la hormona tiroidea desde la sangre hacia el cerebro (5).

Además, la barrera entre la sangre y el LCR se encuentra en los plexos coroideos. En la zona donde se encuentran ambos fluidos circulantes, estas estructuras vasculares, ricamente vascularizadas, muestran una morfología peculiar explicada por su origen en el desarrollo embrionario, y cumplen varias funciones esenciales para la homeostasis del SNC. Forman una barrera neuroprotectora que evita la acumulación de compuestos nocivos en el LCR y el cerebro, y secretan el LCR, que participa en el mantenimiento de un entorno interno del SNC estable. La circulación del LCR juega un papel importante en la transmisión de volumen dentro del cerebro en desarrollo y en el adulto, y los compartimentos del LCR son clave para la vigilancia inmunológica del SNC. Al ser susceptibles, tanto a los cambios fisiológicos en la homeostasis del cerebro como a los estímulos periféricos o centrales, como la inflamación, también actúan como centinelas para el SNC. Finalmente, su papel en el control del intercambio de células inmunitarias entre la sangre y el LCR confiere a los plexos coroideos una función en la regulación neuroinmune y los implica en la neuroinflamación.

Los plexos coroideos, por lo tanto, merecen más atención al investigar la fisiopatología de las enfermedades del SNC y las comorbilidades relacionadas (10).

Plexos coroideos y líquido cefalorraquídeo

El LCR es un ultrafiltrado de plasma contenido dentro de los ventrículos del cerebro y los espacios subaracnoideos del cráneo y la columna vertebral. Desempeña funciones vitales, como proporcionar nutrición, eliminación de desechos y protección al cerebro. Se estima que el volumen de LCR en adultos es de 150 ml con una distribución de 125 ml dentro de los espacios subaracnoideos y 25 ml dentro de los ventrículos. Las acuaporinas son un conjunto de proteínas transmembrana que controlan el paso de agua a través de las membranas biológicas, destacando a nivel de los PC la acuaporina-1 (AQP1). Se han encontrado, sobre todo, en la parte apical celular, aunque puede variar durante la embriogénesis, en caso de hidrocefalia o dilatación ventricular. La principal función de la AQP1 es permitir que el agua se desplace siguiendo el gradiente osmótico por lo que es sumamente importante en la transferencia de agua en los PC y, por ende, en la producción del LCR. Oshio et al (11), en 2003, observaron que en ratones mutantes que no expresan AQP1, dicha acuaporina se redujo 4,8 veces, así como la producción de LCR en un 20%.

El LCR es secretado predominantemente por el plexo coroideo con otras fuentes que desempeñan un papel no definido completamente. Su secreción varía entre personas en la edad adulta, generalmente está entre 400 y 600 ml por día. La secreción constante de LCR contribuye a completar la renovación de LCR de cuatro a cinco veces durante un período de 24 horas en el adulto joven promedio. La reducción de la rotación del LCR puede contribuir a la acumulación de metabolitos observados en el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas. La composición del LCR está estrechamente regulada, y cualquier variación se puede utilizar para fines diagnósticos (5, 12).

Los plexos coroideos y la isquemia

El cerebro es uno de los órganos más dependientes del aporte de oxígeno del cuerpo, por lo que una falta de éste afectaría en gran medida a su correcto funcionamiento. Cuando existe un déficit en el aporte de oxígeno (hipoxia), de sangre (isquemia) o de ambos las células epiteliales de los plexos coroideos se verán afectadas, lo que se reflejará en el

citoplasma de dichas células, que encontraremos hinchado y lleno de vacuolas compactadas. Otras consecuencias de estos déficits son el aumento de los espacios intercelulares y la muerte celular, que provocan el incremento de la permeabilidad de la barrera entre sangre y LCR. Este hecho favorece, por un lado, el acceso citoquinas circulantes, aminoácidos excitadores, calcio y moléculas citotóxicas al LCR y, por otro, la reducción de la secreción de factores tróficos, lo que explica el daño cerebral (8).

La producción de LCR también se verá afectada en situaciones de isquemia o hipoxia disminuyendo hasta un 33% en perros neonatales con respecto al grupo de control. Este hecho se puede explicar tanto por la apoptosis que sufren las células del PC como por la capacidad de la hipoxia para aumentar los niveles de vasopresina. Recordemos que la vasopresina reduce el flujo de sangre, incluido a nivel de los PC, disminuyendo la cantidad de LCR producido. Aunque la hipoxia tenga este efecto perjudicial fomenta la expresión del factor nuclear derivado del eritroide 2 (Nrf2) y el factor 1a inducible por hipoxia (HIF-1a) a nivel de los PC que favorecen la expresión de genes protectores y transportadores y, con ello, el flujo de salida. Holloway y Cassin (13), en 1972, comprobaron que, tras una situación de hipoxia, aumenta el aclaramiento de la albúmina sérica humana marcada con yodo radioactivo, el p-aminohipurato y el lactato sódico a nivel de los PC. Además, D'Angelo et al. (14), en 2013 demostraron, en relación con la falta de oxígeno, que los PC aumentan su expresión de las proteínas asociadas a la resistencia a múltiples fármacos (MRP-1). En un contexto hipóxico-isquémico también se ha registrado que el exceso de citoquinas podría reducir el flujo de prostaglandina-E2, involucrada en la inflamación, desde el LCR a la sangre. Podemos deducir que en estas situaciones hipóxico-isquémicas existen cambios en los mecanismos de entrada y salida de diferentes moléculas activas, que provocan concentraciones variables en el LCR influyendo en la homeostasis cerebral (8).

Los plexos coroideos y el envejecimiento

A medida que envejecen humanos y animales, se van produciendo cambios tisulares por todo el organismo. Se ha visto que el estrés oxidativo va aumentando con la edad, en relación con la acumulación de péptidos A β en las células epiteliales pues la capacidad del PC para su eliminación se ve mermada con la edad. Como consecuencia de esta acumulación tenemos la ruptura de la barrera sangre-LCR. Además, estos péptidos también se han relacionado con la disfunción mitocondrial, que propicia una disminución de la actividad de

las enzimas involucradas en la fosforilación oxidativa (como la citocromo C oxidasa) afectando a la síntesis de proteínas en los PC. A nivel del PC encontraremos cambios morfológicos como la disminución de la altura y volumen de sus células epiteliales por la atrofia; aumento del grosor de la membrana basal, de la pared de los vasos sanguíneos y del estroma (15).

Cuando usamos los términos “estroma” o “fibrosis intersticial” de los PC nos referimos al incremento de tejido conectivo en el espacio pericapilar, a menudo formando nódulos. Esta apariencia ya fue comparada por Adams y Sidman (16), en el año 1968, a la fibrosis que sufren los glomérulos renales con la edad avanzada. Además, Cobb (17), en 1932, ya había observado que ese incremento de tejido conectivo intersticial era el principal cambio patológico más frecuente en el PC con respecto a la vejez. Sin embargo, en la literatura actual, tanto la fibrosis, como los cuerpos de psammoma², los anillos de Biondi³ y los xantogranulomas, que se encuentran en el cerebro envejecido, son considerados como cambios degenerativos sin ninguna consecuencia fisiológica conocida. En 2016, Prineas et al. (18), demostraron que ese cambio en los PC en relación con la edad, del que hablaba Cobb, está relacionado con una reacción inflamatoria del espacio pericapilar y con la presencia de complemento activado y células inflamatorias. Ésta se considera normal en adultos, tanto en individuos con enfermedades del sistema nervioso central como aquellos sin ellas.

El envejecimiento también juega un papel importante en la circulación del LCR y su composición. Se sabe que los niveles de vasopresina aumentan con la edad lo que conlleva una disminución del flujo sanguíneo a nivel de los PC y de la producción de LCR. Esta disminución podría afectar a la acción de diferentes moléculas a nivel cerebral, como la leptina, transtirretina, la transferrina o el propio hierro. Las alteraciones producto de la edad a nivel la barrera sangre-LCR de los PC pueden estar implicadas en los cambios del cerebro envejecido e incluso, en cerebros patológicos como en la enfermedad de Alzheimer (EA). Una desregulación del nivel de hierro en el cerebro mejorará la vía amiloidogénica y potenciará la agregación y la toxicidad de A β que, junto con una disminución de la excreción de A β a través del LCR en los PC, puede llevar consigo la progresión de la patología cerebral en la EA. Debido a estas modificaciones a nivel de la composición del LCR y de su alterada

² Calcificaciones distróficas en el estroma del plexo coroideo.

³ Inclusiones en células epiteliales positivas a la plata.

circulación, que se ve igualmente afectada con la edad, el adecuado funcionamiento neuronal se ve alterado (15).

HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

El incremento en la esperanza de vida está originando un crecimiento acelerado en el porcentaje de personas mayores, que se traduce en un aumento del envejecimiento de la población. Por ello se hace necesario conocer los cambios que se producen en el cerebro resultado del envejecimiento.

Objetivos Generales

Analizar las variaciones y cambios morfológicos y las alteraciones funcionales que afectan a los plexos coroideos en el envejecimiento.

Objetivos Específicos

1. En primer lugar, nos planteamos hacer una revisión de las investigaciones sobre el envejecimiento y los cambios de los plexos coroideos en adultos.
2. En segundo lugar, evaluar los cambios y la variabilidad en la secuencia temporal de la morfología de los plexos en ocho cerebros humanos de 63 a 97 años de edad y también analizar la función mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas para TTR y AQP1.

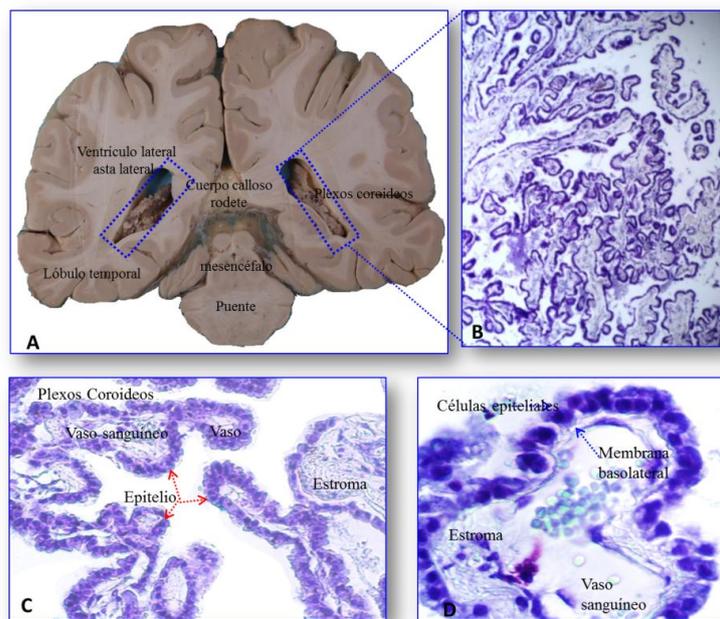
MATERIAL Y MÉTODOS

Material

El estudio se realizó en cerebros humanos de adultos post-mórtem de entre 63-97 años, procedentes de donaciones para la docencia y la investigación de la Unidad departamental de Anatomía y Embriología Humana de la Universidad de la Laguna (Tabla 1). Se disponen de pocos detalles sobre las causas de muerte (tabla 1).

| | | | | | | | | |
|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| EDAD | 63 | 65 | 73 | 78 | 82 | 85 | 88 | 97 |
| SEXO | ♂ | ♀ | ♂ | ♂ | ♀ | ♀ | ♂ | ♀ |

Los cerebros fueron retirados del cráneo y fijados en Formol al 10 %, posteriormente, se realizaron cortes coronales de 5 cm de grosor, con idéntica orientación y alineados entre el quiasma óptico y el rodete del cuerpo calloso para posteriormente diseccionar los plexos coroideos del asta lateral de los ventrículos laterales.



A: Corte coronal del cerebro humano donde se señalan la región de los ventrículos laterales (asta lateral). B: Detalle de plexos. C y D: Coroideos teñidos con violeta. Detalle Estructura del plexo coroideo.

Métodos

Preparación de tejidos:

Las piezas de biopsia fueron fijadas en formol, deshidratadas e incluidas en parafina. La técnica de fijación, deshidratación e inclusión fue la misma para todos los sujetos.

Cortes Histológicos:

Las piezas fueron cortadas a 8 micras de espesor, en 4 series alternas A, B, C y D. La serie A fue teñida con violeta las restantes series fueron procesadas con métodos inmunohistoquímicos.

Técnica Inmunohistoquímica

Los cortes se incubaron durante 18 horas en anticuerpo primario (Anti-TTR: 1/500 y Anti AQP-1: 1/400). Como anticuerpo secundario se utilizó el kit RTU Vectastain Universal Elite ABC (Vector Laboratories).

Después del lavado, las secciones, la reacción se visualizó con 0,05% DAB y 0,01% de H₂O₂ en PBS 0,1 M durante 5-10 minutos. Después las muestras fueron deshidratadas en alcoholes a concentraciones crecientes (70°, 96° y 100°) y posteriormente pasados por xileno. Una vez finalizados estos pasos se montaron con Eukitt. El control de la técnica inmunohistoquímica se llevó a cabo un control negativo de la técnica, donde se procesaron simultáneamente secciones en las que se omitió la incubación en el Anticuerpo primario correspondiente, sustituyendo este paso por una incubación en el tampón de dilución. En todos los casos, los controles negativos no presentaron inmunotinción alguna, demostrando la especificidad de la técnica.

Captura de imágenes

La adquisición de las imágenes se realizó con una cámara CANON EOS 600 D. Todas las imágenes fueron tratadas mediante Adobe Photoshop.

RESULTADOS

Análisis morfológico del plexo coroideo

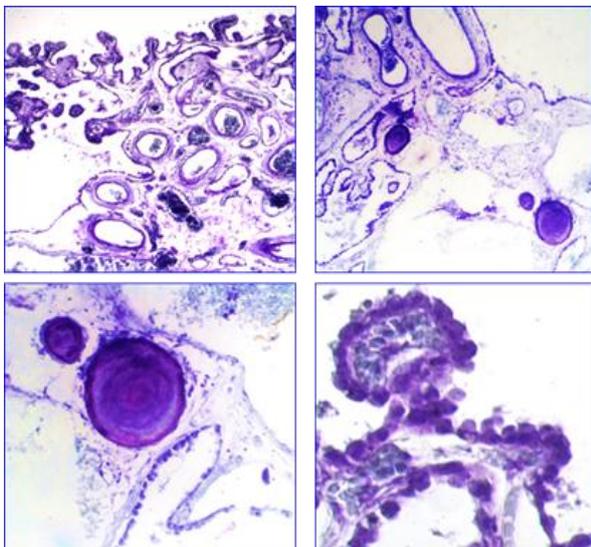
Tras realizar un estudio morfológico en personas con edades comprendidas entre 63 y 97 años, hemos observado cambios en la morfología normal del epitelio, el estroma y de las estructuras vasculares de los plexos.

En nuestros casos de edades más jóvenes (63 y 65 años), los resultados muestran variaciones en la estructura típica del plexo coroideo. Apreciamos un aumento de la separación de las células del epitelio monoestratificado, en cambio la morfología celular y la localización de los núcleos celulares se mantienen conservadas.

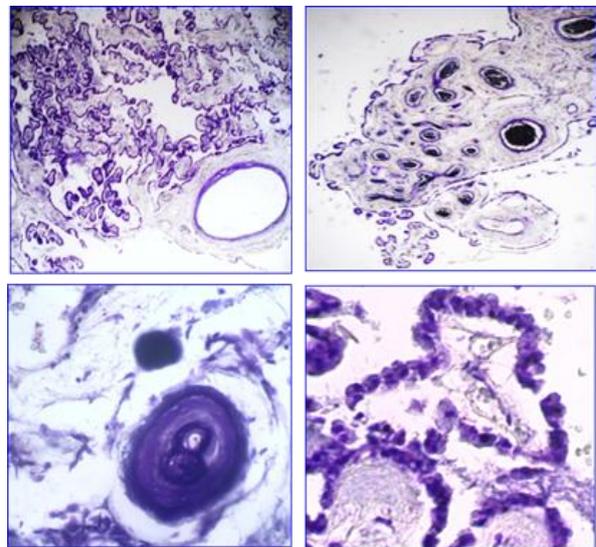
A nivel del estroma, han perdido tejido conectivo laxo en las proximidades de los vasos y de la membrana basal en la que se sustentan las células epiteliales. También se detecta un aumento del estroma que no es uniforme en todo el plexo y que aumenta con la edad.

La vasculatura presenta pequeñas variaciones histológicas, mostrando separaciones mínimas entre las tunicas vasculares. Cabe destacar que en los plexos de 63 y 65 años se puede apreciar cómo el diámetro de la luz de algunos vasos sanguíneos ha aumentado considerablemente.

63 Años Masculino



65 Años Femenino

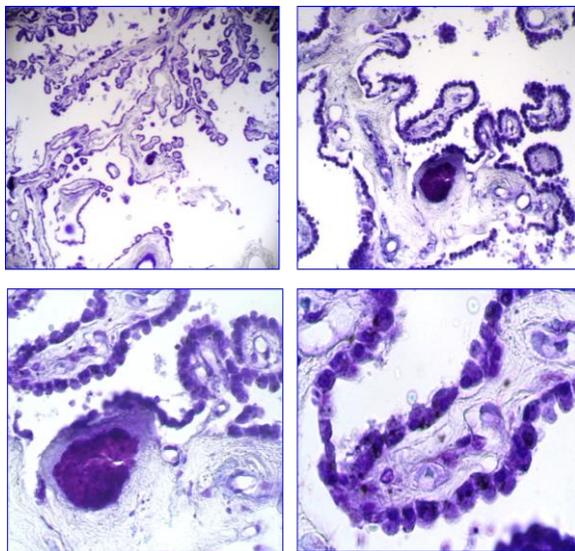


Los resultados obtenidos en la 7° década de la vida (73 y 78 años), muestran la pérdida de la morfología cuboidea del epitelio junto a un aumento de los espacios intercelulares frente al grupo de los sesenta años. Los núcleos continúan conservando su localización habitual.

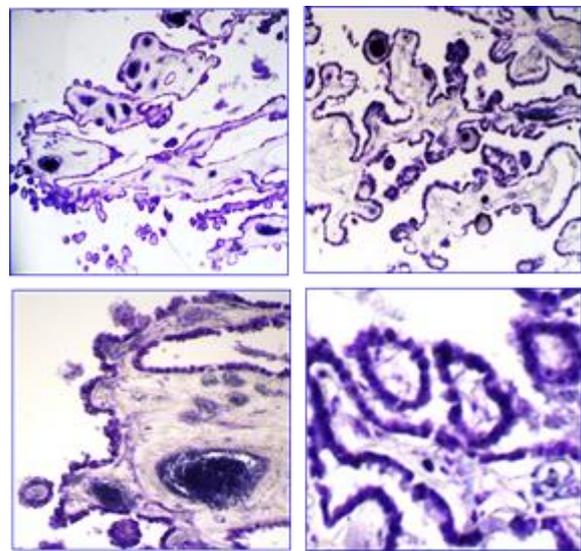
El tejido conectivo muestra más contenido fibroso, siendo menor en nuestra muestra de 73 años; además en su interior observamos la presencia de cuerpos de psamoma.

A nivel vascular, llama la atención la disminución en el grosor de las paredes vasculares, detectándose a su vez alteraciones en su morfología. Debemos destacar que, en los casos de 73 y 78, años cursaban con ventriculomegalia de los ventrículos laterales.

73 Años Masculino



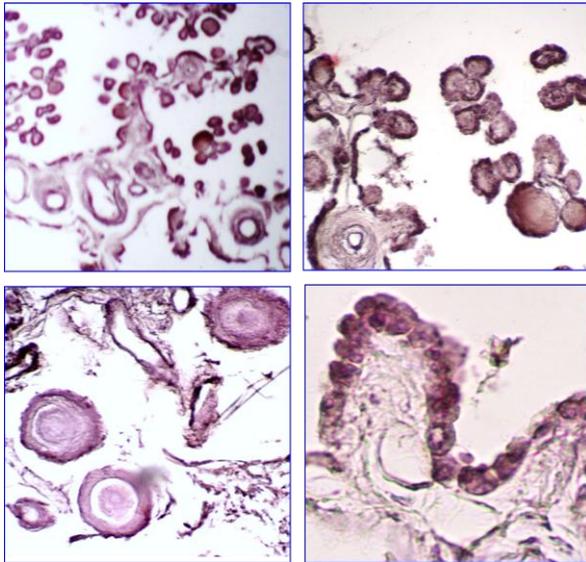
78 Años Masculino



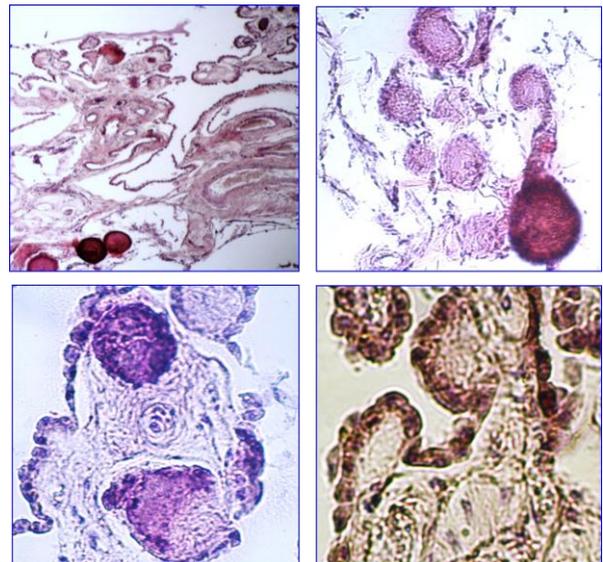
En los casos de 82 y los 85 años, los plexos muestran una mayor distorsión del tejido epitelial: cambios en la morfología cuboidea del epitelio, apareciendo una morfología plana; también se advierte un aumento del espacio intercelular y comenzamos a ver cambios en la disposición de los núcleos, que comienzan a situarse en localización apical.

El estroma de éstos, en este grupo de edad ha disminuido, siendo cada vez más rica en tejido fibroso. Las formaciones calcáreas se van volviendo más comunes, llegando a observar algunas en proceso de formación. A nivel vascular, estos plexos presentan aumento del diámetro de los vasos, siendo además sus paredes finas.

82 Años Femenino



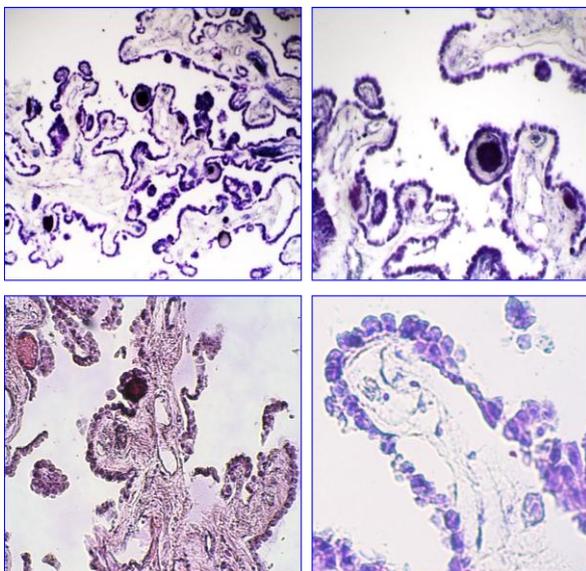
85 Años Femenino



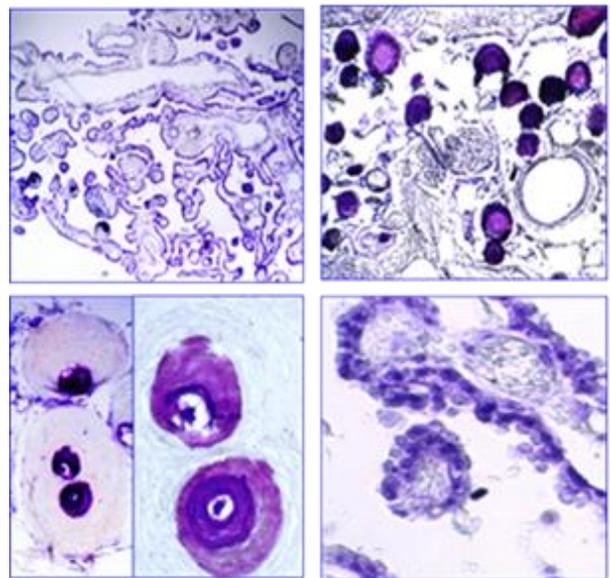
También en la edad de 88 se detecta un ligero aumento de los ventrículos laterales.

En el caso más añoso, 97 años, se objetiva una alteración casi total de la morfología del plexo, se produce una pérdida de la monocapa del epitelio, donde además vemos núcleos en posiciones apicales, células con morfología plana y gran separación intercelular. El estroma muestra gran presencia de tejido fibroso, llama la atención una cantidad abundante de cuerpos de Psamoma. En cuanto a la vasculatura, vemos grandes vasos que además poseen paredes cuyo grosor se ha visto altamente reducido.

88 Años Masculino



97 Años Femenino



Resultados Análisis inmunohistoquímico del plexo coroideo

Transtirretina (TTR)

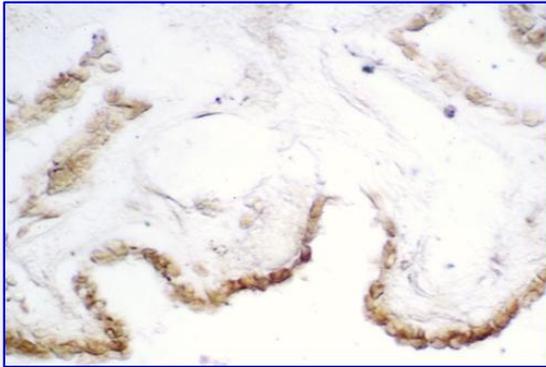
La TTR (prealbúmina) es sintetizada en los plexos coroideos y secretada al LCR. En nuestro estudio ha sido detectada en los plexos a lo largo del período investigado. El anticuerpo marcó el citoplasma de las células epiteliales, de manera importante en su porción más apical, sin embargo, el patrón de expresión fue diferente en las edades analizadas.

En los dos casos analizados de sexagenarios, se observa que la expresión de TTR no es homogénea en todo el plexo, donde se puede apreciar su localización en el polo apical del epitelio. También se contempla la presencia de acúmulos en el interior del citoplasma a la edad de 65 años.

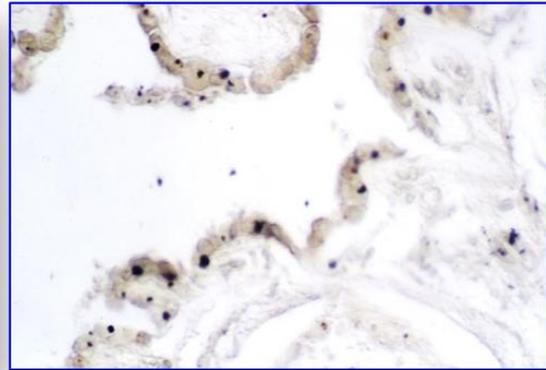
En la séptima década de la vida y principio de los ochenta años, se puede apreciar una moderada pérdida de la expresión del anticuerpo, donde observamos cómo la disposición de la TTR en el epitelio es discontinua, quedando localizada en un menor número de grupos de células.

En la década de los 80 se observa este mismo patrón, que observamos en el grupo de edad anterior, pero con una reducción importante en la cantidad de células marcadas. Sin embargo, el caso de mayor edad no sigue el mismo patrón que el resto de las edades de este grupo.

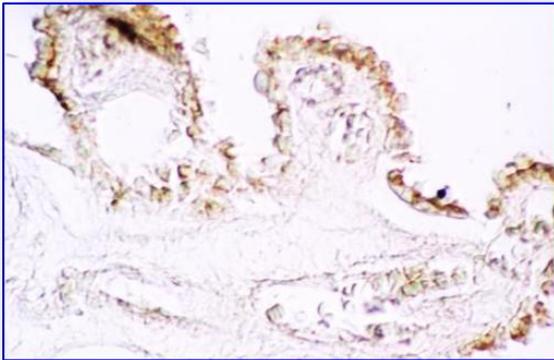
63 Masculino



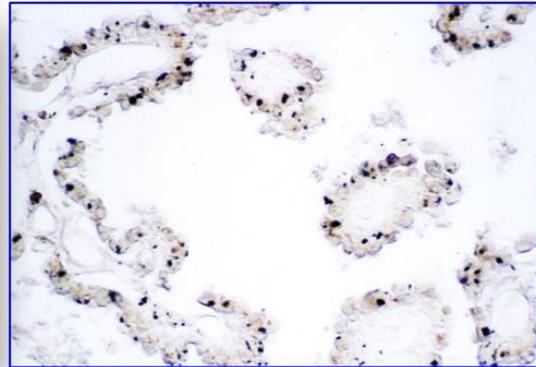
65 Femenino



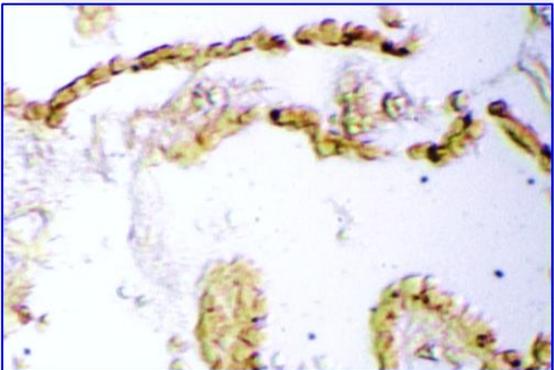
73 Masculino



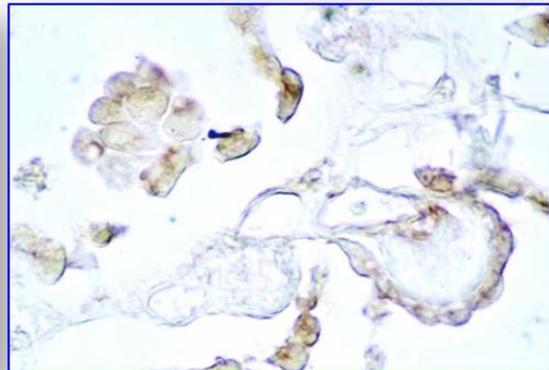
78 Masculino



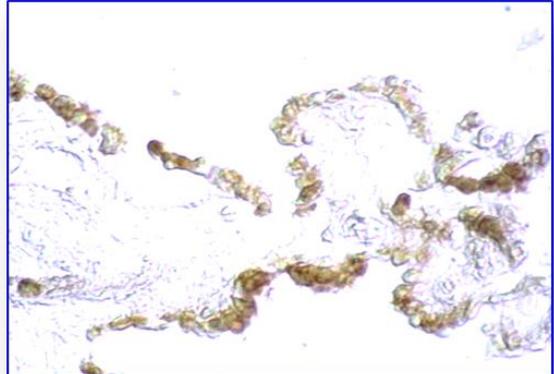
82 Femenino



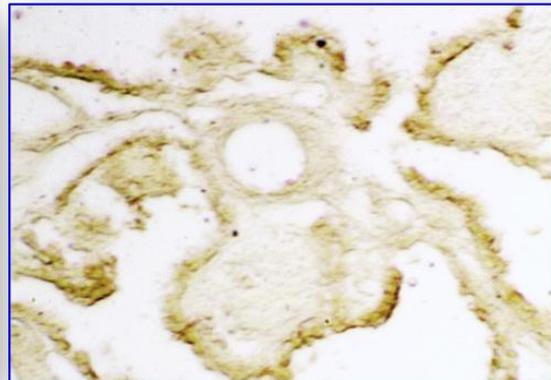
85 Femenino



88 Masculino



97 Femenino



En los resultados del presente trabajo encontramos, utilizando técnicas inmunohistoquímicas, que hay una disminución de TTR en el PC según se aumenta la edad analizada. Por otra parte, existen pequeñas variaciones individuales donde también se observa la presencia de TTR en el citoplasma de las células epiteliales de los plexos coroideos, este hallazgo podría significar alteraciones en las secreciones de TTR por parte de las células de los PC teniendo en cuenta que en esas edades había una dilatación ventricular.

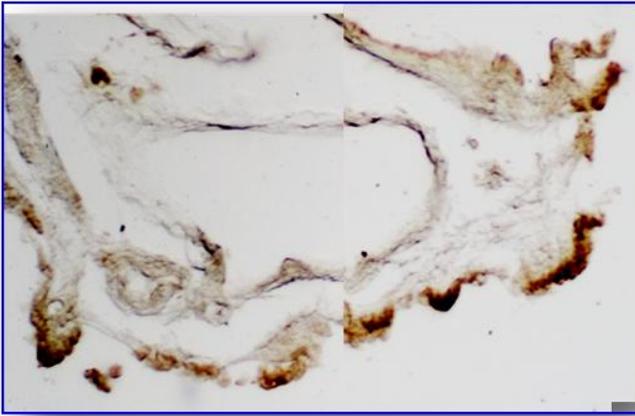
Aquaporin-1 (AQP1)

Las acuaporinas son una familia de proteínas integrales de membrana que funcionan como canales de agua. La Aquaporina-1 (AQP1) es una proteína selectiva del canal de agua localizada en el polo apical del epitelio coroideo, que juega un papel central en la homeostasis del agua del cuerpo humano y se expresa en el PC y en el endotelio.

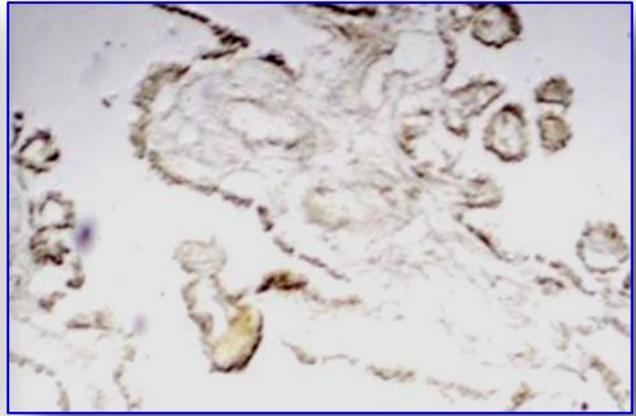
La expresión de AQP1 en las edades analizadas se observó principalmente en el polo apical y basal de las células epiteliales del plexo coroideo y en el estroma en algunos casos, así como en la membrana basal de las células endoteliales, estas últimas localizaciones del anticuerpo no se observan en los casos de dilatación ventricular.

Al analizar las imágenes respecto a la expresión de AQP1, hemos encontrado resultados diferentes entre los grupos de edad. Los casos de 70 años cuentan con una menor expresión de esta proteína. A su vez, en los casos de mayor edad, la AQP1 se expresa en mayor medida en aquellos que no presentaban dilatación ventricular en comparación con los casos que sí padecían esta afección.

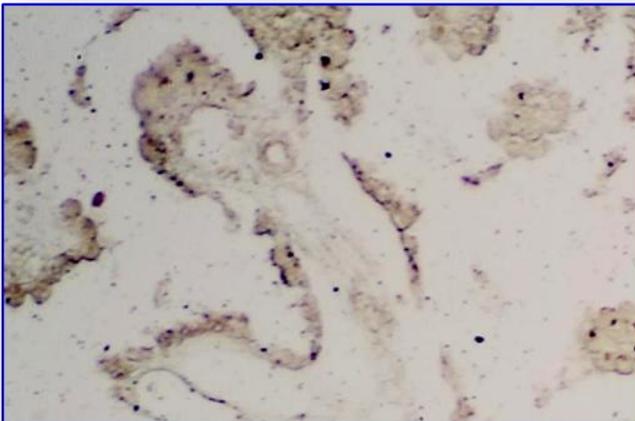
63 Masculino



65 Femenino



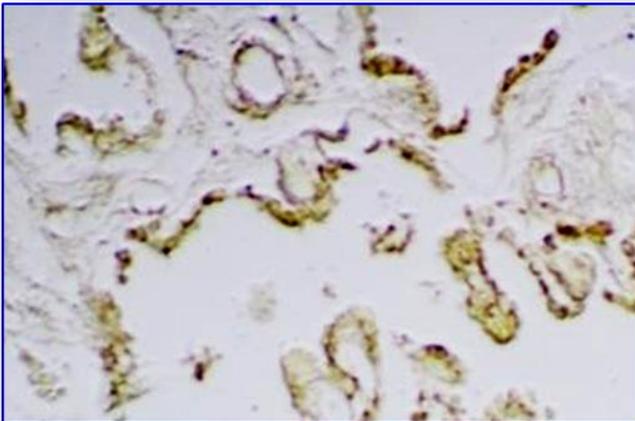
73 Masculino



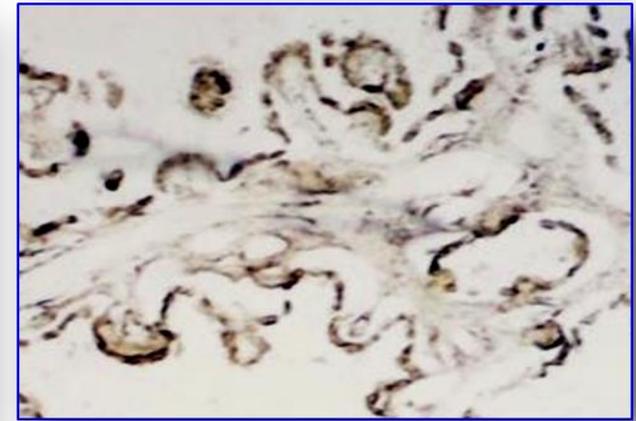
78 Masculino



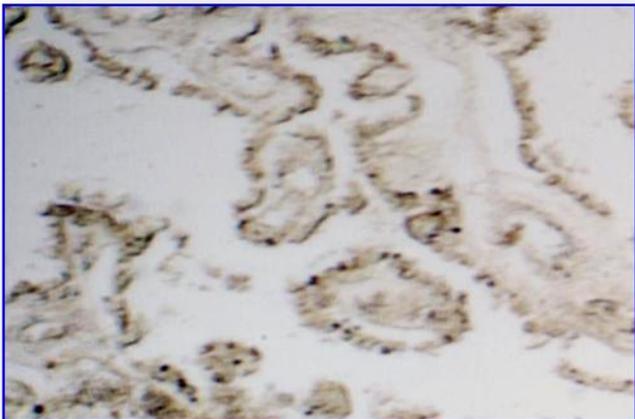
82 Femenino



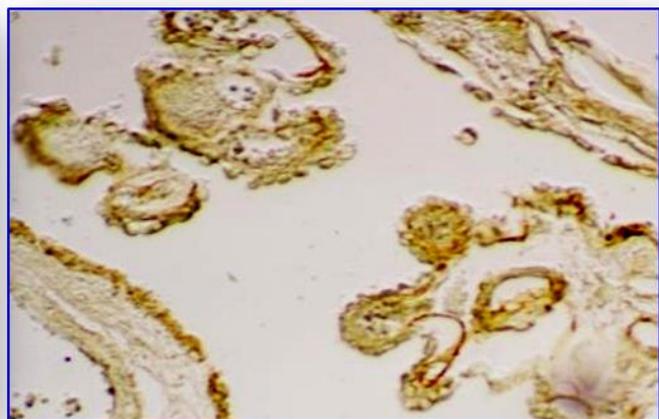
85 Femenino



88 Masculino



97 Femenino



DISCUSIÓN

El plexo coroideo de humanos y otros mamíferos es un órgano bien perfundido que se localiza en el cerebro abarcando una gran área de superficie. Éste secreta la mayor parte del LCR en el que se encuentran una cantidad abundante de moléculas provenientes del torrente sanguíneo (19).

Serot et al. (20) refieren en seres humanos la disminución de la altura de las células epiteliales de los PC en relación con la edad. Además, exponen que en los citoplasmas de estas células envejecidas se encuentran inclusiones fibrilares y depósitos de lipofuscina. Los núcleos son irregulares y más planos encontrando una membrana basal más engrosada. También se describe un aumento del grosor del estroma apreciándose fibras de colágeno, cuerpos hialinos, calcificaciones y cuerpos de psamoma. Con relación a las arterias de los PC se manifiesta que se engrosan las paredes arteriales a nivel de la túnica media y la adventicia. En este estudio los autores indican que al envejecer el volumen de LCR disminuye y la producción enzimática se ve afectada. Estos datos coinciden con nuestros resultados, en los que observamos también estas alteraciones a nivel celular del plexo coroideo.

Por otra parte, y en relación con la fibrosis de los PC, se estima que el número de vellosidades afectadas aumenta con la edad. Así mismo, tras examinar el contenido de estos nódulos se llegó a la conclusión de que estaban formados por colágeno y partículas densas similares a las encontradas en la fibrosis del estroma de los PC y en la formación de cuerpos de Psamoma (18).

Yalcin et al. (21) observan la presencia de calcificaciones macroscópicas en los plexos coroideos, siendo estas de mayor tamaño y más abundantes, según se produce la senescencia y sin guardar relación aparente con alguna patología. También se aprecia en este estudio que estas calcificaciones son más comunes en hombres que en mujeres.

Esto parece coincidir con nuestros resultados, en los que observamos que las formaciones calcáreas se vuelven más frecuentes según avanza la edad de nuestros casos. Además, destacar que, en nuestros casos más jóvenes, dos hombres de 63 y 73 años y una mujer de 65 años, es en ésta última en la que menor cantidad de calcificaciones se aprecia.

Mesquita et al. (15), en 2012, relacionan las alteraciones morfológicas y funcionales de los PC envejecidos con aquellas que se encuentran en los PC de pacientes con Alzheimer. Concluyen que las modificaciones relacionadas con el envejecimiento pueden tener impacto en los eventos patológicos que ocurren en un cerebro con enfermedad de Alzheimer.

En el plexo de mayor edad que hemos analizado (97 años) hemos encontrado las diferencias más significativas. En este caso observamos por primera vez en nuestras muestras la alteración de la localización nuclear del epitelio del PC, se pierde también la forma típica cuboidea de este tejido, apareciendo una morfología plana y una gran separación intercelular.

Estos cambios se han descrito ya como parte normal del proceso de senescencia de los PC, incluyendo en estas modificaciones el acortamiento de las microvellosidades, disminución de la membrana basal, depósitos de colágeno y lipofusina. Además, se ha observado que se producen alteraciones que afectan a la integridad de la barrera sangre-LCR, teniendo esto consecuencias sobre el Interferón (IFN) e incluso sobre los linfocitos Th2 (22).

Las hormonas tiroideas son relevantes en el desarrollo del cerebro. De esta manera el trasvase de cantidades apropiadas de estas hormonas desde la sangre al cerebro en etapas específicas del desarrollo es crítico. Tanto en reptiles, pájaros como en mamíferos la principal proteína sintetizada y secretada por los PC es una proteína distribuidora de hormonas tiroideas: la Transtirretina. Esta es secretada en el líquido cefalorraquídeo y transporta las hormonas tiroideas desde la sangre al LCR. Mediante un enfoque evolutivo, molecular, funcional y del desarrollo, se publica un estudio del transporte de hormonas tiroideas a través de los PC. En él, se indica que los plexos coroideos son el tejido en el que se encuentra la mayor concentración de ARNm de Transtirretina (TTR) por gramo de tejido, siendo considerablemente mayor que la producción de TTR en otros órganos de múltiples especies animales. Esta proteína es secretada desde los PC al LCR y no a la sangre demostrando, en apariencia, una gran importancia en la liberación de hormonas tiroideas al LCR (23).

Las acuaporinas (AQPs) son una familia de proteínas transportadoras de agua que se expresan ampliamente en células de mamíferos. Son dos las AQPs localizadas en el sistema nervioso central, la AQP1 y la AQP4, que podrían desempeñar un papel en la hidrocefalia y son, por lo tanto, potenciales objetivos de fármacos. Estructuralmente, estas proteínas son canales de agua localizados en las membranas plasmáticas y muy relacionadas con el

desarrollo y la resolución del edema cerebral. Expresiones alteradas de estas AQP's en modelos animales y en humanos muy limitados sugiere su intervención en el desarrollo de la fisiopatología de la hidrocefalia. Datos provenientes de estudios en ratas demuestran un efecto protector en una menor expresión de AQP1 y un factor de riesgo en caso de AQP4 en hidrocefalia (24).

La Aquaporina-1 (AQP1) está altamente expresada en el plexo coroideo, localizándose principalmente en el polo apical de las células del PC. Hace una contribución sustancial a la producción de LCR y es una diana terapéutica potencial en el tratamiento de los trastornos circulatorios del LCR. En estudios realizados con ratas hidrocefálicas se ha revelado un aumento y redistribución de AQP1 en el PC, donde la AQP1 se expresaba no sólo en el polo apical celular, sino también en el polo basal y en el estroma. Los cambios inmunohistoquímicos observados en la hidrocefalia tanto comunicante como no comunicante, sugieren una variación en la eficacia de las células del PC, donde la AQP1 podría realizar tanto la producción como la reabsorción de LCR para retrasar la dilatación ventricular. Aunque la AQP1 apical contribuye significativamente a la producción de LCR, no está claro cómo se facilita el paso del agua a través de la membrana basolateral. Existen informes de que se ha identificado AQP1 en la membrana basolateral del epitelio del plexo coroideo, pero la información es relativamente escasa (25).

La regulación de la AQP1 puede ocurrir a través de varios mecanismos. Primero, la función puede ser alterada por varios compuestos o procesos biológicos. Segundo, debido a que la función de la AQP1 depende de su ubicación en la membrana apical del plexo coroideo, la AQP1 puede ser regulada por cambios en su ubicación dentro de la célula (26).

En estudios realizados con ratones sometidos a hipoxia se ha demostrado que esta reducción del aporte de oxígeno y el envejecimiento juegan un papel importante en el desarrollo de hidrocefalia. Esto ocurre por tres factores principales: aumento en los canales de AQP4, menor tasa de evacuación de LCR y disminución de la distensibilidad cerebral. En este mismo estudio se sostiene que la hipoxia induce el desarrollo de ventriculomegalia y además que este aumento en la producción de LCR ocurre dependiendo de los canales de AQP4 y no de AQP1. Enfrentando el modelo clásico de formación y producción de LCR a un nuevo modelo que plantea la participación de todo el sistema del LCR, siendo especialmente importante el espacio de Virchow-Robin (27).

Kalani et al. (28), en 2012 tras realizar una revisión sobre el papel de AQP1 en los PC, observan que la expresión de AQP1 se redujo en ratas con hidrocefalia congénita, mientras que los niveles de AQP4 aumentaron en el cerebro y la corteza cerebral, y se produjo una disminución leve en los niveles de AQP4 presentes en los PC. También en esta revisión determinaron que la hidrocefalia genera un mecanismo de feedback negativo sobre la AQP1, con intención de frenar la producción de LCR y del aumento de la presión intracraneal. Estos datos coinciden con nuestros resultados, dado que de nuestros cuatro casos con ventriculomegalia observamos en tres de ellos (73, 82 y 88 años) una disminución significativa de la AQP1.

CONCLUSIONES

Tras la realización de nuestro estudio hemos podido concluir que entre los efectos de los años en los PC podemos destacar los siguientes:

- Se observa un proceso secuencial en la alteración de la morfología normal del plexo, empezando como pequeñas alteraciones en el epitelio, el estroma y las paredes vasculares y finalizando en una pérdida significativa de la estructura original en la que destaca la localización anómala de los núcleos epiteliales y la aparición de grandes vasos en las etapas finales.
- A través de las técnicas inmunohistoquímicas se ha visto una disminución de la expresión de TTR en casos de mayor edad.
- Respecto a la AQP1 hemos observado que se produce un aumento en su expresión con la edad, mientras que la presencia de ventriculomegalia conlleva a un proceso de feedback negativo, generando un descenso de sus niveles.

¿QUÉ HEMOS APRENDIDO EN ESTE TRABAJO?

Durante la realización de este trabajo de investigación en el departamento de Anatomía y Embriología Humana hemos puesto en práctica los conocimientos que durante la carrera hemos adquirido, especialmente en referencia a la revisión bibliográfica, dado que hemos tenido que acudir a recursos que se nos han ido presentado y explicando durante nuestro proceso formativo (pubmed, uptodate...). También nos hemos enfrentado a la revisión de la bibliografía principalmente en inglés, esto ha significado para nosotros un reto al no estar acostumbrados a relacionarnos con terminología técnica en otro idioma. Así mismo, y teniendo en cuenta que nuestras prácticas con microscopía óptica fueron realizadas en los primeros cursos de la carrera, hemos vuelto a valorar la dificultad de estos procesos, al ser la parte que nos ha resultado más compleja. Debemos destacar nuestro aprendizaje de los métodos de investigación que hemos empleado: extracción, preparación de muestras y técnicas inmunohistoquímicas.

BIBLIOGRAFIA

1. Dohrmann GJ. The choroid plexus: a historical review. *Brain Res* [Internet] 1970 [Consultado 4 May 2019]; 18:197–218. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006899370903240?via%3Dihub>
2. Redzic ZB, Segal MB The structure of the choroid plexus and the physiology of the choroid plexus epithelium. *Adv Drug Deliv Rev.* [Internet]. 2004 [Consultado 15 Mayo 2019]; 56 :1695–1716. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15381330>
3. Thanos CG, Bintz B, Emerich DF. Microencapsulated choroid plexus epithelial cell transplants for repair of the brain. *Adv Exp Med Biol* [Internet] 2010 [Consultado 13 May 2019]; 670:80–91. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20384220>
4. Mortazavi MM, Griessenauer CJ, Adeeb N, Deep A, Bavarsad Shahripour R, Loukas M, Tubbs RI, Tubbs RS. The choroid plexus: a comprehensive review of its history, anatomy, function, histology, embryology, and surgical considerations. *Childs Nerv Syst.*[Internet] 2014 [Consultado 13 May 2019]; 30(2):205-14. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00381-013-2326-y>
5. Gonzalez-Marrero I, Hernández-Abad LG, Castañeyra-Ruiz L, Carmona-Calero EM, Castañeyra-Perdomo A. Changes in the choroid plexuses and brain barriers associated with high blood pressure and ageing. *Nrl* [Internet] 2018 [Consultado 19 Abr 2019]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-neurologia-295-linkresolver-variaciones-los-plexos-coroideos-las-S0213485318301750>
6. Catala M. Embryonic and fetal development of structures associated with the cerebrospinal fluid in man and other species. Part I: The ventricular system, meninges and choroid plexuses. *Arch Anat Cytol Pathol* [Internet] 1998 [Consultado 14 May 2019] 46: 153– 69. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9754371>
7. Netsky MG, Shuangshoti S. *The Choroid Plexus in Health and Disease.* Charlottesville, VA: University of Virginia Press, 1975:249-264
8. Kaur C, Rathnasamy G, . The Choroid Plexus in Healthy and Diseased Brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* [Internet] 2016 [Consultado 4 May 2019]; 75(3):198-213. Disponible en: <https://academic.oup.com/jnen/article/75/3/198/1848403>
9. González-Marrero I, Castañeyra-Ruiz L, González-Toledo JM, Castañeyra-Ruiz A, Paz-Carmona H, Ruiz-Mayor L, *et al.* High blood pressure effects on the brain barriers and choroid plexus secretion. *Neurosci Med* [Internet] 2012 [Consultado 18 May 2019]; 3:60-64. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/ijhy/2013/164653/>

10. Ghersi-Egea JF, Strazielle N, Catala M, Silva-Vargas V, Doetsch F, Engelhardt B. Molecular anatomy and functions of the choroidal blood-cerebrospinal fluid barrier in health and disease. *Acta Neuropathol* [Internet] 2018 [Consultado 2 May 2019]; 135(3):337-361. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29368213>
11. Oshio K, Song Y, Verkman AS, Manley GT. Aquaporin-1 deletion reduces osmotic water permeability and cerebrospinal fluid production. *Acta Neurochir Suppl* [Internet] 2003 [Consultado 14 May 2019]; 86: 525-8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14753499>
12. Telano LN, Baker S. Physiology, Cerebral Spinal Fluid (CSF) [Updated 2018 Oct 27]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519007/>
13. Holloway LS Jr, Cassin S. Cerebrospinal fluid dynamics in the newborn dog during normoxia and hypoxia. *Am J Physiol.* [Internet]. 1972 [Consultado 9 May 2019]; 223(3):499–502. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5055304>
14. D'Angelo B, Ek C J, Sandberg M, Mallard C. Expression of the Nrf2-system at the blood-CSF barrier is modulated by neonatal inflammation and hypoxia-ischemia. *J Inherit Metab Dis* [Internet] 2013 [Consultado 18 May 2019]; 36(3): 479–490. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3664399/>
15. Mesquita SD, Ferreira AC, Sousa JC, Santos NC, Correia-Neves M, Sousa N, Palha J A and Marques F. Modulation of iron metabolism in aging and in Alzheimer's disease: relevance of the choroid plexus. Review Article *Front. Cell. Neurosci* [Internet] 2012 [Consultado 13 May 2019]; 6:25. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3357636/>
16. Adams RD, Sidman RL. *Introduction to Neuropathology*. New York, Toronto, Sydney, London: McGraw-Hill; 1968
17. Cobb S. The cerebrospinal blood vessels. En: Penfield W, editor. , ed. *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System*. Vol. 2 New York: Paul B. Hoeber; 1932:577-610
18. Prineas JW, Parratt John DE, Kirwan PD. Fibrosis of the Choroid Plexus Filtration Membrane. *J Neuropathol Exp Neurol.* [Internet] 2016 [Consultado 17 May 2019]; 75(9): 855–867. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5015658/>
19. Spector R, Keep R. F, Snodgrass SR, Smith QR, Johanson C. E. A balanced view of choroid plexus structure and function: Focus on adult humans. *Exp Neurol.* [Internet]

- 2015 [Consultado 20 May 2019]; 267:78-86. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001448861500062X?via%3Dihub>
20. Serot JM, Béné MC, Faure GC. Choroid plexus ageing of the brain and Alzheimer s disease. *Front Bios [Internet]* 2003 [Consultado 18 May 2019]; 8:s515-521. Disponible en: <https://www.bioscience.org/2003/v8/s/1085/fulltext.htm>
 21. Yalcin A, Ceylan M, Bayraktutan OF, Sonkaya R, Yuce I. Age and gender related prevalence of intracranial calcifications in CT imaging; data from 12,000 healthy subjects. *Jour Chem Neur [Internet]* 2016 [Consultado 8 Jun 2019]; 78:20-24. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891061816300783?via%3Dihub>
 22. Vandembroucke RE. A Hidden Epithelial Barrier in the Brain with a Central Role in Regulating Brain Homeostasis. Implications for Aging. *Ann Am Thorac Soc [Internet]* 2016 [Consultado 8 May 2019]; 13(5): S407-410. Disponible en: https://www.atsjournals.org/doi/full/10.1513/AnnalsATS.201609-676AW?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed
 23. Richardson SJ, Wijayagunaratne RC, D´Souza DG, Darras VM, Van Herck SLJ. Transport of thyroid hormones via the choroid plexus into the brain: the roles of transthyretin and thyroid hormone transmembrane transporters. *Front Neurosci [Internet]* 2015 [Consultado 18 May 2019]; 9:66. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2015.00066/full>
 24. Verkman AS, Anderson MO, Papadopoulos MC. Aquaporins: important but elusive drug targets. *Nat Rev Drug Discov [Internet]* 2014 [Consultado 17 May 2019]; 13(4): 259-277. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4067137/>
 25. Oowler BK, Pitham T, Wang D. Aquaporins: relevance to cerebrospinal fluid physiology and therapeutic potential in hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Res [Internet]* 2010 [Consultado 10 May 2019]; 7: 15. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2949735/>
 26. Praetorius J, Nielsen S. Distribution of sodium transporters and aquaporin-1 in the human choroid plexus. *Am J Physiol Cell Physiol. [Internet]* 2006 [Consultado 10 May 2019]; 291(1): C59-57. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16481371>
 27. Trillo-Contreras JL, Ramírez-Lorca R, Hiraldo-González L, Sánchez-Gomar I, Galán-Cobo A, Suárez-Luna N, Sánchez de Rojas-de Pedro E, Toledo-Aral JJ, Villadiego J, Echevarría M. Combined effects of aquaporin-4 and hypoxia produce age-related hydrocephalus. *Biochim Biophys Acta Moi Basis Dis. [Internet]* 2018 [Consultado 7 Jun

2019]; 1864(10): 3515-3526. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0925443918302916?via%3Dihub>

28. Kalani M.Y.S., Filippidis A.S., ReKate H.L. Hydrocephalus and Aquaporins: The Role of Aquaporin-1. In: Aygok G., ReKate H. (eds) Hydrocephalus. Acta Neurochirurgica Supplementum. Vienna: Springer; 2012. vol 113: 51-54