



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

## TESIS DOCTORAL

Doctorado en Biomedicina y Biotecnología. RD 1393/2007

**“Acuaporinas en el desarrollo cortical humano y sus implicaciones en la hidrocefalia congénita”**

**Leandro Castañeyra Ruiz**

Departamento de Medicina Física y Farmacología  
Departamento de Ciencias Medicas Básicas  
Facultad de Medicina  
Julio de 2015





*A mis padres y hermanos*

## TESIS DOCTORAL

Doctorado en Biomedicina y Biotecnología. RD 1393/2007

**“Acuaporinas en el desarrollo cortical humano y sus implicaciones en la hidrocefalia congénita”**

**Leandro Castañeyra Ruiz**

**DIRECTOR: Dr. Ricardo Borges Jurado**

**CODIRECTOR: Dr. Agustín Castañeyra Perdomo**

**CODIRECTOR: Dr. Emilia Carmona Calero**

**CODIRECTOR: Dr. Ibrahim Gonzales Marrero**

Departamento de Medicina Física y Farmacología  
Departamento de Ciencias Médicas Básicas  
Facultad de Medicina

D. Ricardo Borges Jurado, Catedrático Farmacología, del Departamento de Medicina Física y Farmacología de la Universidad de La Laguna, miembro del grupo de Investigación *Exocitosis y Biología del tráfico de vesículas secretoras*.

CERTIFICO:

Que D Leandro Castañeyra Ruiz, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación correspondiente a la Tesis Doctoral titulados:

**Acuaporinas en el desarrollo cortical humano y sus implicaciones en la hidrocefalia congénita**

Revisado el trabajo, estimo que puede ser presentado para ser juzgado por el tribunal que sea designado para su lectura.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, en el cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendiendo y firmo el presente certificado en La Laguna a 17 de Julio de 2015.



Fd. Ricardo Borges Jurado

D. Agustín Castañeyra Perdomo, Catedrático Anatomía y Embriología Humana del Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Universidad de La Laguna.

CERTIFICO:

Que D Leandro Castañeyra Ruiz, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación correspondiente a la Tesis Doctoral titulados:

**Acuaporinas en el desarrollo cortical humano y sus implicaciones en la hidrocefalia congénita**

Revisado el trabajo, estimo que puede ser presentado para ser juzgado por el tribunal que sea designado para su lectura.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, en el cumplimiento de las disposiciones vigentes, extiendo y firmo el presente certificado en La Laguna a 17 de Julio de 2015.



Fd. Agustín Castañeyra Perdomo

Dña. Emilia Carmona Calero Profesora Titular de Anatomía y Embriología Humana, Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Universidad de La Laguna.

CERTIFICO:

Que D Leandro Castañeyra Ruiz, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación correspondiente a la Tesis Doctoral titulados:

**Acuaporinas en el desarrollo cortical humano y sus implicaciones en la hidrocefalia congénita**

Revisado el trabajo, estimo que puede ser presentado para ser juzgado por el tribunal que sea designado para su lectura.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, en el cumplimiento de las disposiciones vigentes, extiendo y firmo el presente certificado en La Laguna a 17 de Julio de 2015.



Fd. Emilia M Carmona Calero

D. Ibrahim González Marrero Profesor Ayudante Doctor del Anatomía y Embriología Humana. Departamento de Ciencias Médicas Básicas, Universidad de La Laguna.

CERTIFICO:

Que D Leandro Castañeyra Ruiz, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de investigación correspondiente a la Tesis Doctoral titulados:

**Acuaporinas en el desarrollo cortical humano y sus implicaciones en la hidrocefalia congénita**

Revisado el trabajo, estimo que puede ser presentado para ser juzgado por el tribunal que sea designado para su lectura.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, en el cumplimiento de las disposiciones vigentes, extiendo y firmo el presente certificado en La Laguna a 17 de Julio de 2015.



Fd. Ibrahim Gonzalez Marrero

### **Agradecimientos:**

Agradezco en especial a los Directores de mi Tesis Doctoral, los Doctores. Ibrahim González Marrero, Emilia Carmona Calero, Ricardo Borges Jurado y Agustín Castañeyra Perdomo, por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo bajo su tutela. En especial a mi padre que siempre ha confiado en mí y ha sabido como motivarme, en los momentos difíciles.

Además me gustaría transmitir mis agradecimientos a; la Dra. Gundela Meyer, que sin su ayuda este trabajo no hubiera sido posible, con la aportación de tan buen material y valiosísimos consejos en cuanto al desarrollo cortical humano. Al Dr. Esteban Rodríguez, y todo su grupo en la universidad Austral de Chile, que han sido un referente para mi evolución como profesional, y de los que he aprendido muchísimo. La Dra. Miriam González, que siempre ha estado dispuesta a colaborar, a la Dra. Marta R. Pardo, por sus sabios consejos técnicos. La Dra. María Jesús Domínguez por su Ayuda con la citometría de flujo y a la Dra. Rebeca B. Dávila que me ha ayudado muchísimo en mi último tramo de la tesis, no solo motivándome personalmente sino también enseñándome todos los detalles de forma, necesarios para llevar a cabo este trabajo.

También, mi agradecimiento a los miembros de la unidad de Anatomía y Embriología Humana de la ULL, especialmente a Juan Manuel González Toledo por su ayuda con el material.

Además me gustaría agradecer a mi nueva familia laboral, Ayoze y Judith con los que he compartido la recta final de mi tesis y numerosas conversaciones en “el sillón de pensar” en las que uno se enriquece como investigador y como persona.

Finalmente no podría dejar fuera de estos agradecimientos al resto de compañeros de trabajo; Emilio, Carolina, Estefanía, Laura y Sara, siempre dispuestos a colaborar cuando he pedido ayuda y con los que he compartido numerosas conversaciones, que más allá de lo profesional, lo que queda, es la amistad.

## Abreviaturas

**LCR:** Líquido cefalorraquídeo  
**ZV:** Zona ventricular  
**ZSV:** Zona subventricular  
**GR:** Glía radial  
**CMNs:** Células madre neuronales  
**PI:** progenitores intermedios  
**GRA:** Glía radial apical  
**ZSVe:** Zona subventricular externa  
**GRb:** Glía radial basal  
**AQP:** Acuaporina  
**SG:** Semanas de gestación  
**OAS:** Obstrucción del Acueducto de Silvio  
**Post H:** hidrocefalia posthemorrágica  
**4V des:** Hidrocefalia tetraventricular de origen desconocido o comunicante  
**Cont:** Control  
**VL:** Ventrículo lateral  
**Ta:** Tálamo  
**EG:** Eminencias ganglionares  
**3V:** tercer ventrículo  
**Hta:** Hipotálamo  
**Hip D:** Hipocampo dorsal  
**EGL:** Eminencia ganglionar lateral  
**CC:** Cuerpo Calloso  
**Fo:** Fórnix  
**Ct:** Corteza telencefálica  
**Ca:** Caudado  
**EGM:** Eminencia ganglionar medial  
**Ce:** Cápsula externa  
**Pu:** Putamen

**Ci:** Capsula interna

**Hip V:** Hipocampo ventral

**ZSVi:** Zona subventricular interna

**SP/ZI:** Subplaca, Zona intermedia

**PCo:** Placa cortical

**ZM:** Zona Marginal

**Lat:** Lateral

**Med:** Medial

**TTr:** Trastirretina

# ***Índice***



# ÍNDICE

A. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Desarrollo del sistema nervioso central.....	1
1.1 Células Madre Neuronales (CMNs).....	1
1.2. Gliogénesis.....	5
2. Hidrocefalia.....	6
2.1 Concepto de hidrocefalia.....	6
2.2 Redefiniendo el concepto de hidrocefalia congénita.....	9
3. Principales estructuras implicadas en la función normal y patológica del LCR y del sistema ventricular.....	11
3.1 Plexos Coroideos.....	11
2 Líquido cefalorraquídeo.....	15
4.1 Microvesículas en el LCR.....	17
4.2 LCR y biomarcadores de prognosis y evolución de la hidrocefalia.....	17
4.3. Acuaporinas.....	19
B. PLANTEAMIENTO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	25
C. MATERIAL Y MÉTODOS.....	33
1. Telencéfalos:.....	33
2. Líquidos cefalorraquídeos:.....	34
3. Procesamiento del tejido.....	34
3.1 Tinciones convencionales.....	36
3.2 Inmunohistoquímica.....	37
3.3. Inmunofluorescencia.....	38
3.4. Visualización y cuantificación.....	39
3.5 Análisis estadístico.....	39
4. Extracción de Vesículas del LCR.....	39
5 Técnica de inmunotransferencia (Western-Blot, WB).....	40
5.1 Visualización, adquisición y cuantificación.....	41
6 ELISA.....	41
6.1 Análisis de Datos.....	42
7 Citometría de Flujo.....	42
7.1 Análisis.....	43
7.2 Visualización.....	43
D. RESULTADOS.....	47
1. AQP1 Inmunohistoquímica.....	47
1.1 Expresión de la AQP1 en el desarrollo de los Plexos Coroideos.....	47
1.2 Expresión de AQP1 en condiciones patológicas (Hidrocefalia y Lisencefalia).....	48
2. Expresión de la Acuaporina-4 en el desarrollo fetal Humano.....	54
3 AQP4 y su vinculación glial.....	59
3.1 AQP4 y vimentina.....	59
3.2. AQP4 y GFAP.....	63
3.3 AQP4 y S100.....	63
4. AQP4 Hidrocefalia.....	66
4.1 Activación glial y disrupción endimaria.....	66
5. Bioquímica.....	71
5.1 Cuantificación de Acuaporinas, TNF $\alpha$ y proteínas totales del LCR:.....	71
5.2 TTR en el LCR de los casos controles e hidrocefálicos.....	73
5.3 Expresión de AQP4 en las fracciones microvesiculares.....	74
5.4 Expresión de AQP4 y GFAP en las fracciones vesiculares.....	75
5.5 Expresión de AQP4 y GFAP de la fracción microvesicular mediante citometría de flujo.....	76
5.6 Microvesículas mediante microscopía confocal.....	76
E. DISCUSIÓN.....	81
1. AQP1 en el desarrollo gestacional de los plexos coroideos.....	81
2. Expresión de la AQP1 en condiciones, control y de hidrocefalia.....	82
3. Expresión de la AQP4 en el desarrollo de la corteza humana:.....	84
4. Linajes celulares que expresan AQP4 en el desarrollo cortical.....	86

# Índice

4.1 AQP4 y Glía radial.....	86
4.2 AQP4 y progenitores intermedios.....	87
4.3 AQP4 en el Neuroepitelio / Ependimo.....	88
5. AQP4 e Hidrocefalia.....	89
5.1 Revestimiento ventricular.....	89
5.2 Activación Glial y AQP4.....	90
6. Hidrocefalia y LCR.....	91
6.1 Cuantificación de Proteínas en el LCR.....	92
7. Microvesículas como biomarcador.....	93
7.1 Citometría de flujo.....	94
E. CONCLUSIONES:.....	99
F. REFERENCIAS.....	103

# ***Introducción***



## A. INTRODUCCIÓN.

### 1. Desarrollo del sistema nervioso central.

A medida que avanza el desarrollo embrionario, el tubo neural sufre una serie de constricciones y dilataciones progresivas, controladas y selectivas que darán lugar a las distintas zonas del encéfalo y de la medula espinal. La cavidad neural se corresponderá con el sistema ventricular embrionario (Gilbert, 2000). Este sistema está lleno de líquido cefalorraquídeo (LCR) y está revestido por células neuroepiteliales en el periodo embrionario y fetal temprano y por células endoteliales en el periodo fetal tardío y adulto. La mayoría de las células del encéfalo de mamíferos en desarrollo se producen en dos zonas germinales asociadas a las proximidades ventriculares: la zona ventricular (ZV) y la zona subventricular (ZSV) (Brazel *et al.*, 2003). La ZV se encuentra conforma la línea divisoria entre los ventrículos y el parénquima cerebral, y adyacente a esta se encuentra la ZSV, encontrándose principalmente a lo largo de las paredes de los ventrículos del cerebro siendo una importante capa germinal que se forma durante el desarrollo. La ZSV está muy desarrollada en la pared de los ventrículos laterales donde constituye las eminencias ganglionares medial, lateral y caudal (Doetsch *et al.*, 1997). Las neuronas y células gliales se originan mediante un proceso de proliferación y diferenciación de células de la ZV (neuroepitelio) y de la ZSV. Desde aquí migran a través de la glía radial hacia la placa cortical. El desarrollo normal de la corteza ocurre a través de un programa coordinado de eventos que incluyen división, migración, muerte selectiva y diferenciación celular (Miyazaki *et al.*, 2003).

#### 1.1 Células Madre Neuronales (CMNs)

Según la etapa del desarrollo cerebral, la ZV puede estar tapizada secuencialmente por células fenotípicamente diferentes: células neuroepiteliales (neuroepitelio), células de la glía radial y endotelios (Tramontin *et al.*, 2003).

Hasta hace poco más de dos décadas, se decía que la glía radial (GR) servía solo de andamiaje para dirigir la migración neuronal. Sin embargo, este concepto comenzó a ser desafiado cuando se evidenció la proliferación de la GR (Misson *et*

*al.*, 1988). En la actualidad, está ampliamente demostrado que la GR no sólo es el soporte para la migración de neuronas postmitóticas desde la ZV hasta su ubicación final, sino que también representa la principal población de CMNs durante el proceso neurogliogénico del desarrollo del sistema nervioso central (Götz & Huttner, 2005; Malatesta *et al.*, 2003; Malatesta *et al.*, 2008). La proliferación de la GR seguir dos vías principales: la vía directa, con la de la generación inmediata de neuronas, o la indirecta que puede pasar por uno o múltiples estadios de amplificación (progenitores intermedios) (Kriegstein *et al.*, 2009). La autorenovación de la GR puede ocurrir por división celular simétrica, generando dos células hijas iguales, o por divisiones celulares asimétricas, generando una célula hija que es idéntica a la madre y una segunda de diferente tipo celular, tal como un progenitor intermedio (PI) o una neurona (Götz & Huttner, 2005). La identificación de CMN y PI es crítica para el entendimiento del desarrollo del cerebro, la neurogénesis del adulto y para el desarrollo de nuevas estrategias para reparar el daño cerebral (Kriegstein *et al.*, 2009). **(Figura 1)**

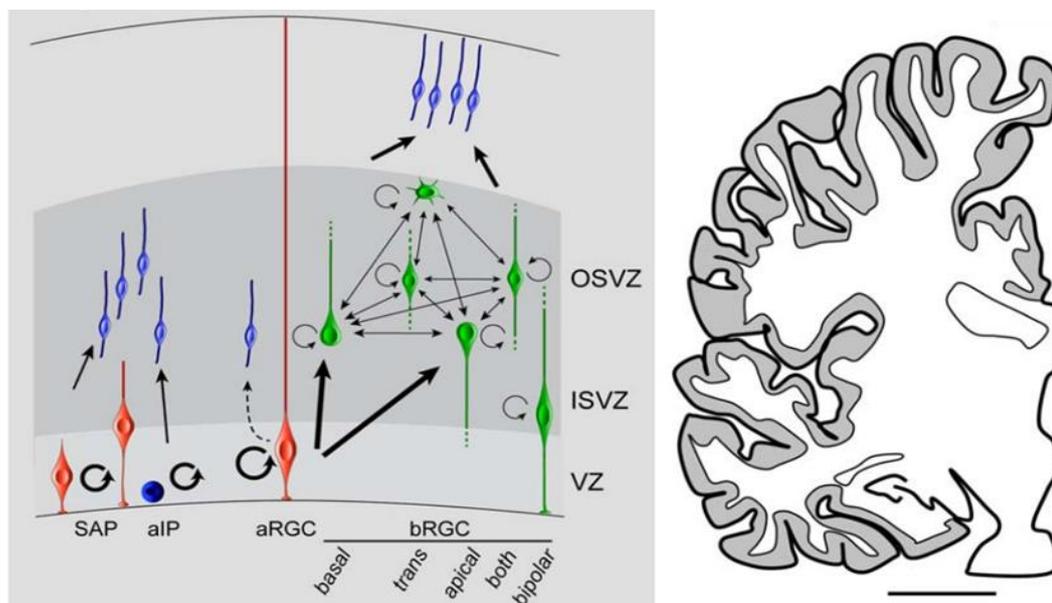
**1.1.1 Células Neuroepiteliales:** son altamente proliferativas y poseen prolongaciones que contactan tanto la superficie apical (ventricular) como la superficie basal (pial) del tubo neural. Las células neuroepiteliales en estadios tempranos del desarrollo se dividen simétricamente para generar más células del mismo tipo. A medida que proliferan, sus núcleos cambian de localización a lo largo del eje ápico-basal, reflejando la etapa del ciclo celular en la que se encuentran: con el núcleo migrando hacia la zona basal durante la fase G1, permaneciendo en la base durante la fase S y luego migran de regreso hacia la zona apical durante la fase G2. Este movimiento, es conocido como migración nuclear interkinética (Götz & Huttner., 2005).

**1.1.2 Glía Radial Apical:** con el inicio de la neurogénesis, las células del neuroepitelio comienzan a definirse como células de la glía radial apical (GRA), perdiendo ciertas características de epitelio. De forma notable, desaparecen las uniones estrechas, aunque conservan las proteínas asociadas a las uniones adherentes. Estas uniones son críticas para mantener la integridad de la ZV y el

funcionamiento de las CMNs (Kriegstein *et al.*, 2009). Además persiste una fuerte polaridad apico-basal manteniéndose el contacto, tanto con la zona ventricular como con la superficie basal. Estas células tienen la capacidad, además, de dividirse de diferentes formas: pueden llevar a cabo divisiones proliferativas simétricas (produciendo dos GRAs), pueden producir divisiones neurogénicas asimétricas (donde se genera una GRA y una neurona) y finalmente puede producir divisiones proliferativas asimétricas (donde se genera una GRA y otra célula progenitora, principalmente una célula progenitora intermedia) (Gotz & Huttner, 2005, Romero & Borrell 2015).

**1.1.3 Progenitores Intermedios:** son células progenitoras no epiteliales con morfología multipolar. Se generan en la zona ventricular por mediación de una división proliferativa asimétrica de la GRA y luego migran basalmente hasta colocarse en la segunda capa germinal que es la ZSV (Attardo y cols 2008). Una vez aquí estas células principalmente producirán divisiones neurogénicas simétricas.

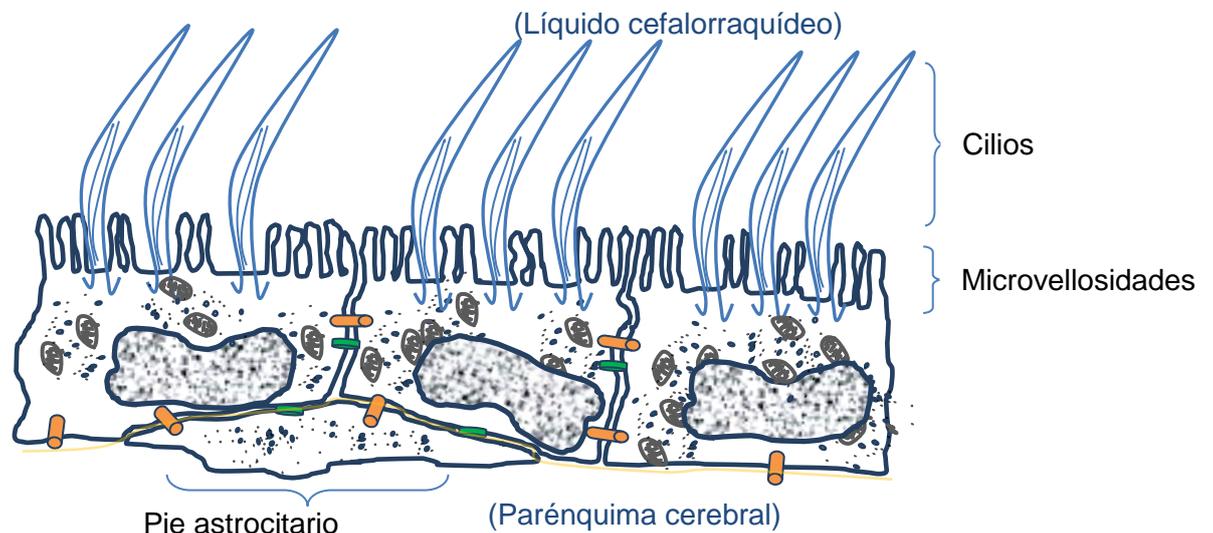
**1.1.4 Glía radial Basal:** en el humano y otros mamíferos girencefálicos, se ha demostrado la presencia de una glía radial cuyo soma se encuentra en la zona subventricular externa (ZSVe). Debido a la ausencia de vinculación con la zona apical se la ha denominado glía radial basal (GRb) (Fietz et al., 2010; Hansen et al., 2010; Reillo et al., 2011; Romero et al 2015). Estas células comparten muchas características con la GRA, como la expresión de vimentina, o la presencia de un proceso basal radial que contacta con la placa cortical. Sin embargo, no presentan prolongación apical y por lo tanto no recibe señales directas del LCR. Estas células son, en mayor medida, responsables de la producción de neuronas (Fietz et al., 2010; Hansen et al., 2010; Reillo et al., 2011, Romero et al 2015). Es importante destacar que estas células prácticamente son inexistentes en los roedores, ya que estos presentan una zona subventricular mucho más simple. En el humano la zona subventricular se encuentra dividida en zona subventricular externa e interna, y se ha sugerido que la glía radial basal es fundamental para la migración neuronal en mamíferos girencefálicos (Romero y Borrel 2015).



**Fig. 1: Representación de los distintos tipos celulares del sistema nervioso central de roedores y humanos.** Tomado de Romero *et al.*, 2015. Donde: SAP, refiere a las células neuroepiteliales; aIP, a los progenitores intermedios; aRGC, a la glía radial apical; bRGC, a la glía radial basal; VZ, a la zona ventricular; ISVZ, a la zona subventricular interna y OSVZ a la zona subventricular externa

**1.1.5 Ependimo:** a medida que el cerebro se desarrolla, una subpoblación de CMNs se compromete con el linaje ependimario y ocupan progresivamente la ZV

hasta adquirir las características de epéndimo maduro (Spassky *et al.*, 2005). Las células endimarias maduras que recubren las cavidades ventriculares carecen de uniones estrechas y de prolongaciones basales, constituyendo una barrera entre el parénquima cerebral y el LCR. Su superficie apical posee microvellosidades y abundantes cilios (Brightman & Palay, 1963), (**Figura 2**)



**Fig. 2: Representación del epéndimo maduro**

## 1.2. Gliogénesis

En primer lugar, es importante aclarar que los astrocitos en diferentes etapas del desarrollo embrionario y postnatal son morfológicamente muy diferentes, y probablemente también lo sean funcionalmente. Se ha especulado que la astrogénesis progresa siguiendo, al menos, cuatro etapas: una fase de glía radial proliferativa, una etapa de progenitores intermedios, otra de astrocitos inmaduros, y la de astrocitos adultos. Sin embargo, esto no puede ser más que una especulación, ya que a día de hoy prácticamente no existen marcadores de progenitores gliales. (Molofky *et al.*, 2012)

La fase de Glia radial desempeña un papel fundamental en el desarrollo del cerebro ya que, no solo está comprometido con un linaje glial, sino que sirven como progenitores neurales y, además, proporcionan el andamiaje por el cual migran los neuroblastos (Rakic 2007; Rowitch & Kriegstein 2010). Tras el cese de la neurogénesis durante la mitad de la gestación, la glía radial pasa a ser

gliogénica y da lugar a la proliferación de precursores de astrocitos y oligodendrocitos (Figura 3).

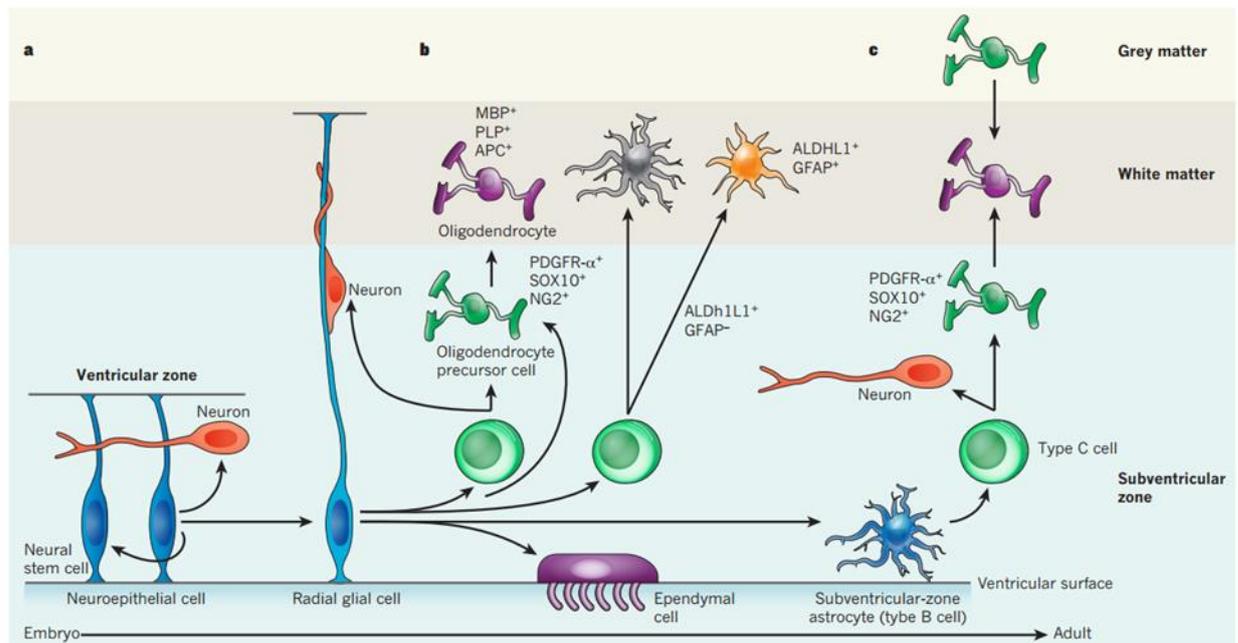


Fig. 3: Representación de la gliogénesis, tomado de Rowitch & Kriegstein 2010

## 2. Hidrocefalia

### 2.1 Concepto de hidrocefalia

La hidrocefalia, del griego *hydor* ('agua') y *cephali* ('cabeza'), es una enfermedad compleja, cuya definición ha ido variando a lo largo del tiempo. El profesor Walter Dandy (1919) estudió la fisiopatología de esta enfermedad con la finalidad de desarrollar tratamientos para ella. Basándose en estos estudios, clasificó la hidrocefalia en "comunicante" y "no comunicante". Esta clasificación derivó de la propia técnica que el Dr. Dandy utilizó para la comprensión de esta patología y, a pesar de la antigüedad de la misma, sigue siendo muy utilizada en la actualidad. Así se definió:

- **Hidrocefalia comunicante:** aquella en la que, cuando se inyectaba un colorante en los ventrículos laterales, éste podía recuperarse en el espacio subaracnoideo, confirmando que existía un movimiento del líquido entre los ventrículos y el espacio subaracnoideo, (Dandy, 1919). En estos casos, la circulación del líquido cefaloraquídeo (LCR) se ve bloqueada después de salir de

los ventrículos, aunque los mecanismos etiológicos implicados son, actualmente, desconocidos.

- **Hidrocefalia no comunicante:** se trataba de aquel tipo de hidrocefalia en la que, tras la administración del colorante, éste no podía recuperarse del espacio subaracnoideo, indicando su ausencia de comunicación con los ventrículos. En estos casos el flujo del LCR se ve bloqueado a lo largo de una o más de las vías que conectan los ventrículos (Malagón-Valdez, 2006).

En 1949, el Dr. Russell propuso una nueva clasificación de la hidrocefalia en **obstruktiva** o **no obstruktiva** (Russell, 1949). La diferencia con el modelo de Dandy estriba en que no se centra únicamente en clasificar las hidrocefalias en función de la capacidad de paso del LCR entre los ventrículos y el espacio subaracnoideo, sino que asume la existencia de una obstrucción en cualquier región de las principales vías del LCR, incluyendo los corpúsculos de Pacchioni en el espacio subaracnoideo. De este modo, la única causa que explicaría la existencia de hidrocefalia no obstruktiva, sería la sobreproducción de líquido cefalorraquídeo por los plexos coroideos o a la mala absorción por parte de los senos venosos (Malagón-Valdez, 2006). En base a esto, los plexos coroideos cumplen un papel fundamental en este tipo de hidrocefalia.

En la actualidad, la hidrocefalia se define como una distensión activa del sistema ventricular cerebral por acumulación excesiva de LCR, y es debida a un mal funcionamiento del flujo de dicho líquido, ya sea en los puntos de producción, dentro de los ventrículos o bien en los puntos de absorción en el sistema circulatorio (Rekate, 2008 y 2009), provocando una acumulación del mismo.

Puede ser una patología de origen congénito o adquirido (Pudenz, 1981). La **hidrocefalia adquirida** se desarrolla en el momento del nacimiento o en un momento posterior. Este tipo de hidrocefalia puede afectar a personas de todas las edades y estar ocasionada por una lesión o una enfermedad, por problemas infecciosos, parasitarios, hemorragias intraventriculares y tumores. (Malagón-Valdez, 2006). Por otro lado, se define como **hidrocefalia congénita** a aquella que está presente en el individuo al nacer, pudiendo ser ocasionada por influencias ambientales durante el desarrollo del feto o por predisposición genética. La **congénita** es el tipo de hidrocefalia que ha sido objeto de estudio en esta tesis.

### 2.1.1 Hidrocefalia Congénita

La hidrocefalia congénita se produce por la acumulación del líquido cefalorraquídeo en el sistema ventricular del cerebro antes del nacimiento, (Rizvi y Anjum, 2005). La acumulación de líquido puede incrementar el perímetro cefálico del niño muy por encima de la media para la edad gestacional normal y produce una presión creciente en el cerebro que lo daña, por lo que ocasiona una pérdida de las habilidades físicas y mentales. En la **Tabla I** se recogen las causas más frecuentes de hidrocefalia congénita.

Su incidencia en países desarrollados es de 1-3 casos por cada 1000 nacimientos (Pattisapu, 2001; Jimenez *et al.*, 2001). Sin embargo, en países subdesarrollados puede llegar a 1 de cada 100 nacimientos, de modo que a nivel medio, su incidencia es de 1 caso cada 500 nacimientos en todo el mundo (Pattisapu, 2001). Se trata de una enfermedad grave cuyo único tratamiento es sintomático, que se basa en la derivación quirúrgica del LCR hacia otra cavidad corporal, para aliviar la presión encefálica. Sin tratamiento puede conducir a la muerte. Por lo tanto, el tratamiento y manejo de pacientes con hidrocefalia ha sido uno de las mayores contribuciones a la neurociencia moderna (Zheng & Chodobski, 2005).

<b>Causas más frecuentes de hidrocefalia congénita</b>	<b>%</b>
Estenosis del acueducto de Silvio	33
Malformación de Arnold-Chiari con mielomeningocele	28
Hidrocefalia comunicante de origen desconocido.	22
Malformación de Dandy-Walker	7
Otros	10

**Tabla 1: Causas de la Hidrocefalia congénita** Tomada de Malagón-Valdez, 2006.

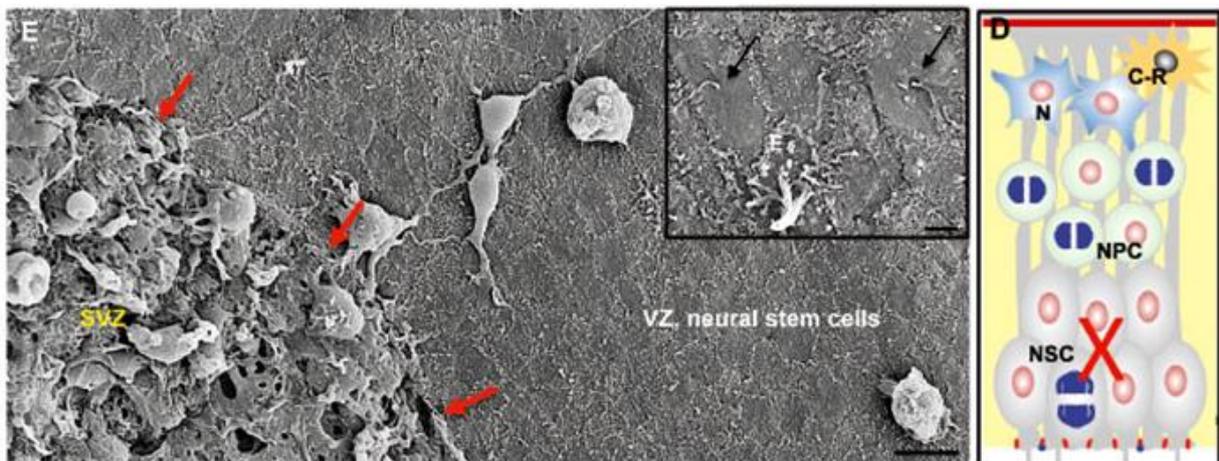
## 2.2 Redefiniendo el concepto de hidrocefalia congénita

La visión clásica postula que la hidrocefalia es una patología mecánica en la cual, la obstrucción del flujo de LCR provoca un aumento de la presión en las cavidades ventriculares, con su correspondiente dilatación y un daño secundario en el tejido nervioso (Vetsika *et al.*, 1999). Sin embargo, se ha sugerido recientemente, que la hidrocefalia comienza en estadios tempranos del desarrollo gestacional, asociada a una patología del neuroepitelio/epéndimo, que conforma la zona ventricular (ZV) mucho antes de que se produzca la dilatación ventricular o el incremento de la presión intracraneal (Perez-Figares *et al.*, 1998; Jimenez *et al.*, 2001; Wagner *et al.*, 2003; Dominguez- Pinos *et al.*, 2005; Guerra *et al.*, 2015) Estas alteraciones, principalmente se centran en una pérdida de la ZV, que cuando ocurre en el acueducto de Silvio, provoca un contacto de la zona subventricular de un lado con la pared del lado contrario, produciéndose la obliteración de este conducto. Mientras que, cuando la pérdida de la ZV se produce en otras partes del ventrículo, implica la pérdida de las células que recubren las cavidades del SNC fetal, que en su mayoría corresponden con GRA, además exponen a los progenitores intermedios de la zona ZSV al lumen ventricular (Guerra *et al.*, 2015) (**Figura 4**). Dependiendo del periodo del desarrollo en que ocurra la denudación, las células que sufren disrupción pueden corresponder a neuroepitelio, GRA o epéndimo (Jimenez *et al.*, 2001). Por lo tanto este fenómeno disruptivo se vincula con la pérdida de células madre neuronales, que a su vez se asocia con variaciones patológicas en el desarrollo del sistema nervioso central, como la presencia heterotopías (Guerra *et al.*, 2015). Muchas de las alteraciones en la migración neuronal que se observan en la hidrocefalia, son consecuencia de estas alteraciones celulares de la ZV, y no secundarias a fenómenos exclusivamente físicos tal y como se había pensado clásicamente (Mashayekhi *et al.*, 2002; Chae *et al.*, 2004). Por ello, la hidrocefalia congénita se puede definir como una enfermedad de neurogénesis anormal, no por los daños mecánicos secundarios a la dilatación ventricular, sino por los fenómenos intrínsecos de la propia enfermedad, producidos mucho antes del incremento de la presión intracraneal o de la dilatación ventricular (Guerra *et al.*, 2015).

Los mecanismos asociados a esta disrupción neuroepitelial no han sido bien definidos todavía, sin embargo, se han asociado con anomalías de las uniones

celulares, tales como las adherentes o las gap. Las proteínas que componen estas uniones no son transportadas adecuadamente a las membranas celulares, produciéndose acumulaciones citoplasmáticas de las mismas. De esta manera se sugiere que las células de la zona ventricular se desconectan de las que se encuentran adyacentemente, haciendo que caigan al interior de los ventrículos. (Guerra *et al.*, 2015).

Asociado a este fenómeno disruptivo existe una activación glial, donde los astrocitos originan algo parecido a una cicatriz glial que cubre la superficie ventricular para reemplazar la ausencia de epéndimo (Páez *et al.*, 2007; Roales-Buján *et al.*, 2012). La formación de esta cicatriz es un fenómeno común en la hidrocefalia (Miller & McAllister 2007). Esos astrocitos pueden desempeñar un intento de atenuar las consecuencias negativas, expresando mecanismos de transporte paracelulares e intracelulares parecidos a los del epéndimo, así como de reabsorción de agua en los edemas periventriculares por medio de canales acuosos como la aquaporina 4 (Roales-Buján *et al.*, 2012). Los astrocitos también pueden producir factores anti-inflamatorios que pueden atenuar la respuesta microglial, contribuyendo a atenuar los efectos negativos de la hidrocefalia (Kim *et al.*, 2010).



**Fig. 4** Micrografía de la disrupción del neuroepitelio y esquema de la pérdida de la Glía radial apical Tomado de Rodriguez *et al.*,2012.

### **3. Principales estructuras implicadas en la función normal y patológica del LCR y del sistema ventricular.**

#### **3.1 Plexos Coroideos**

El Plexo coroideo (PC) es un tejido muy vascularizado situado en cada uno de los cuatro ventrículos. En el adulto está especializado en la secreción de LCR, sin embargo con el fin de mantener la homeostasis en el entorno cerebral, es también una barrera de interfase entre la sangre y el LCR. Actualmente se le da también una función de aclaramiento de sustancias tóxicas provenientes del parénquima cerebral. Los plexos están suspendidos en el LCR de los cuatro ventrículos unidos al epéndimo por un fino tallo ependimario. (Zheng & Chodobski, 2005)

##### **3.1.2 Descripción anatómica**

Los PC están formados por las siguientes estructuras: **Figura 5**

1. El Epitelio coroidal, que es capa simple de células epiteliales cúbicas formando un tejido escamoso, que se sostiene sobre una membrana basal epitelial, también conocida por la lámina basolateral.
2. Microvellosidades coroidales situadas en la superficie apical de los plexos coroideos
3. La matriz extracelular, que se encuentra entre los vasos y el tejido epitelial coroideo, delimitada por la lámina basal endotelial de los vasos coroideos y por la membrana basolateral.
4. Vasos sanguíneos coroidales

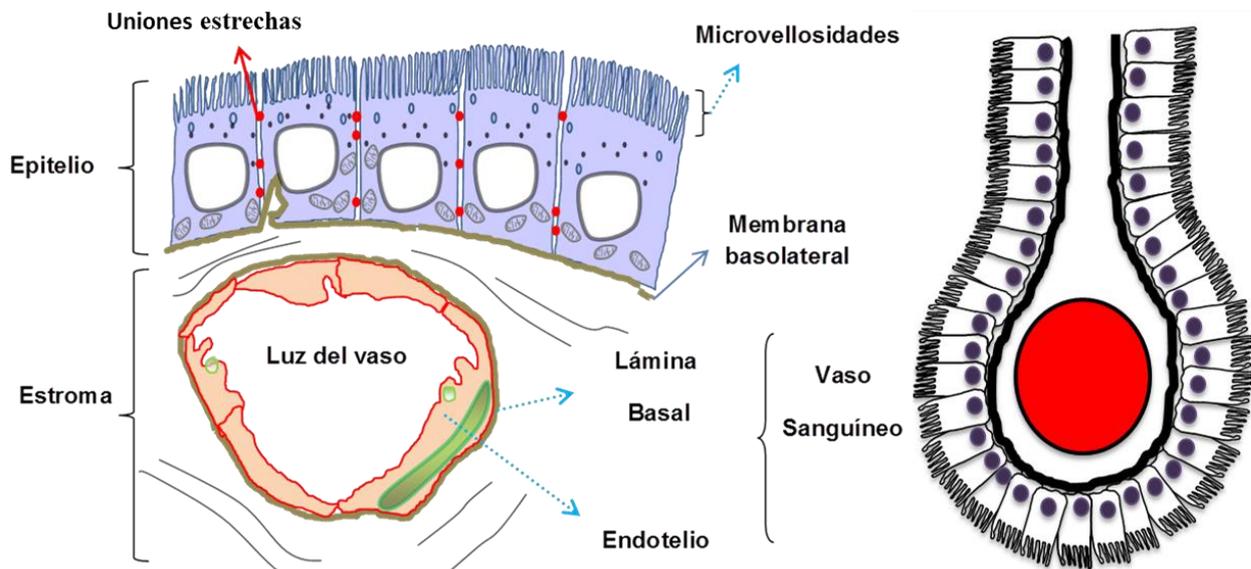


Fig. 5 Representación gráfica de los plexos coroideos

### 3.1.3 Epitelio de los Plexos coroideos

El epitelio coroidal es una capa simple de células cúbicas que forma un tejido escamoso, que se sostiene sobre una membrana basal, también conocida como la membrana basolateral. Esta membrana suele presentar repliegues, que incrementan la superficie de contacto entre la entre la matriz extracelular y las células coroidales (Zheng & Chodobski, 2005).

La función como barrera sangre-LCR, se debe a la presencia de uniones estrechas (Del Bigio, 1995) donde no existe transporte paracelular **Figura.5** de esta manera los solutos no pueden pasar desde la sangre hasta la cavidad ventricular. La vía de paso es, a través de las células epiteliales, que poseen la capacidad seleccionar, modificar o restringir solutos activamente regulando la entrada de sustancias a la cavidad ventricular. (Zheng & Chodobski, 2005)

### 3.1.4 Microvellosidades epiteliales

La superficie apical de los plexos coroideos presenta una gran cantidad de microvellosidades **Figura 5**. En estas vellosidades se encuentran numerosas enzimas metabólicas y moléculas de adhesión leucocitaria, siendo además susceptibles a toxinas y patógenos. A diferencia del epéndimo, el epitelio coroidal casi no presenta cilios. Las microvellosidades incrementan notablemente la superficie de la cara apical del epitelio coroidal, siendo esta superficie de unos 200 cm<sup>2</sup> (Zheng & Chodobski, 2005).

Las microvellosidades carecen totalmente de orgánulos no existiendo ni tan siquiera ribosomas, además son sensibles a numerosos agentes nocivos y a cambios en las condiciones ambientales como las variaciones gravitacionales o las posiciones de la cabeza (Davet *et al.*, 1998; Massequin *et al.*, 2001).

### **3.1.5 Matriz extracelular**

La matriz extracelular (ME) está compuesta de una malla de proteoglicanos y glucosaminoglucanos. Está limitada internamente por la lámina basal endotelial o perivascular que rodea el capilar fenestrado y externamente por la lámina basal subepitelial, o la membrana basolateral (Brightman, 1968), además mantiene la integridad estructural de ambas (Handler *et al.*, 1997). Estas láminas constan principalmente de tres moléculas que se estructuran como una malla: colágeno tipo IV, laminina y fibronectina.

### **3.1.6 Vascularización de los Plexos coroideos.**

En los plexos como en la mayoría de los órganos circunventriculares, el endotelio es fenestrado (Brightman, 1968). Estas fenestras u orificios endoteliales miden sobre 60 nm de diámetro, aunque no están perforados completamente ya que están cubiertos por un fino diafragma (Zheng & Chodobski; 2005). Este diafragma es permeable para el agua, pero no para solutos (Pino, 1985).

### **3.1.7 Función de los plexos coroideos**

Una de las funciones más importantes del PC es la producción de LCR. La formación del LCR se produce en dos fases: primero la filtración pasiva de líquido a través de capilares del PC (Pollay, 1983), y segundo una secreción activa a través del epitelio. El transporte bidireccional de iones se produce en ambos polos de las células epiteliales coroideas, pero la formación de LCR es esencialmente el transporte neto de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$  y agua del plasma al epitelio coroidal y de ahí a los ventrículos. Iones y agua son absorbidos por la membrana basolateral, pasan a través del citoplasma y luego son liberados o secretados activamente por la cara apical del PC al LCR. Una de las proteínas más importantes implicada en la formación de LCR es la AQP1, que se expresa en la superficie apical de las células epiteliales del plexo coroideo por numerosos grupos (Oshio, 2003; Speake, 2003).

### 3.1.8 Desarrollo Morfológico de los Plexos Coroideos

Los plexos coroideos tanto en adulto como en perinatales poseen estructuras similares (Gomez & Potts, 1981). Sin embargo, en el periodo embrionario y fetal existen diferencias que la mayoría de las veces son obviadas (Zheng & Chodobski, 2005).

Los Plexos coroideos se forman como una invaginación del neuroepitelio, que a su vez se diferencia en células epiteliales más especializadas. Los diferentes plexos coroideos aparecen durante el desarrollo en el mismo orden en cada una de las especies de mamíferos estudiadas: primero se forman los plexos coroideos del cuarto ventrículo, a continuación se forman los plexos coroideos de los ventrículos laterales y por último se forman los del tercer ventrículo (Zheng & Chodobski, 2005).

<b>Especies</b>	<b>4<sup>o</sup> ventrículo</b>	<b>1<sup>er</sup> y 2<sup>o</sup> ventrículo</b>	<b>3<sup>er</sup> ventrículo</b>	<b>Gestación total</b>
Ratón <sup>1-2</sup>	Día 11	Día 11	Día 14-15	21 días
Rata <sup>3</sup>	Día 13	Día 13	Día 15-16	21 días
Conejo <sup>4</sup>	Día 14	Día 14	-	30-32 días
Humano <sup>5,6</sup>	Día 45-48	Día 49-51	Día 53-55	40 semanas

**Tabla 2: Calendario de formación de los plexos coroideos en diferentes especies durante el desarrollo cerebral;** <sup>1</sup>Sturrock (1979), <sup>2</sup>Zaki (1981), <sup>3</sup>Zheng & Chodobski (2005), <sup>4</sup>Tennyson & Pappas (1964), <sup>5</sup>O’Rahilly & Müller (1990), <sup>6</sup>Otani & Tanaka (1988).

Clásicamente se han establecido tres fases de maduración de los plexos coroideos. En la fase I las células epiteliales forman un epitelio pseudoestratificado, en la fase II las células epiteliales, forman un epitelio simple con células columnares y en la fase III las células se aplanan y se ensanchan formando un epitelio escamoso.

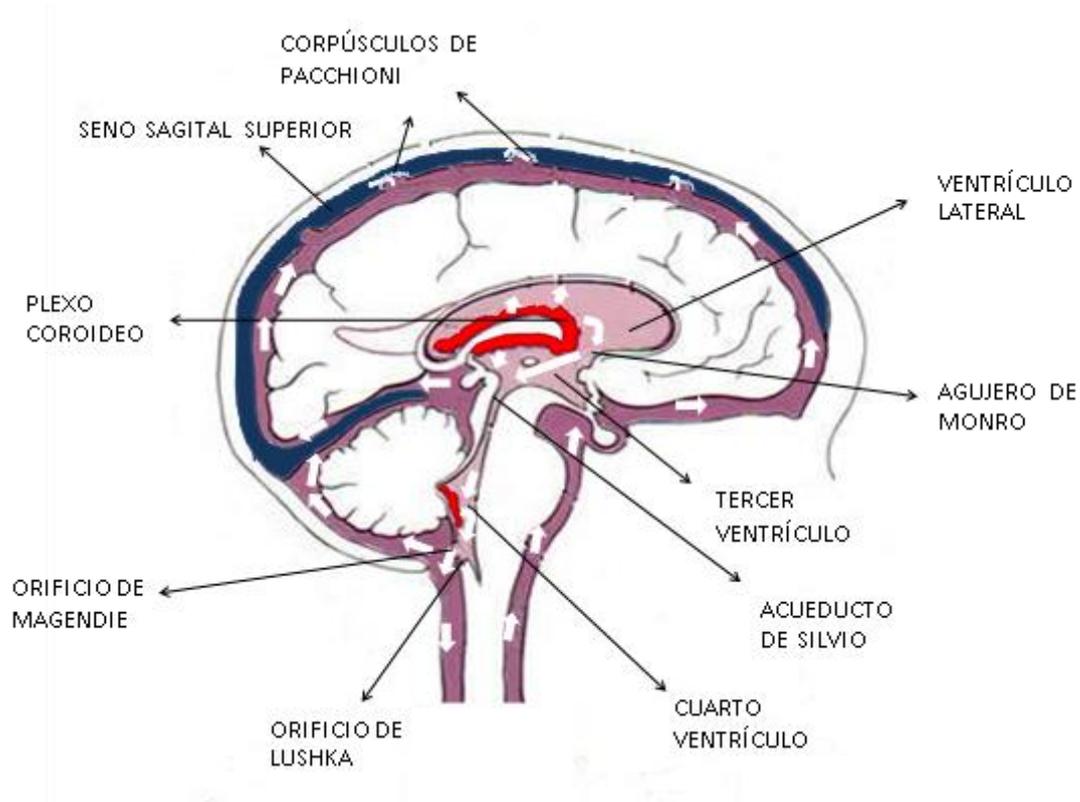
Los plexos coroideos muestran una diferenciación que va de la porción más distal de la raíz del plexo coroideo a la más proximal (el-Gammal, 1981,1983). Esto fue confirmado por Ek *et al.* (2003), ya que observaron que en las zonas proximales existían más células en fase mitótica y presentaban un epitelio pseudoestratificado frente a las zonas distales donde se observaba un epitelio más maduro.

## **2 Líquido cefalorraquídeo**

El líquido cefalorraquídeo (LCR) es la parte más importante del fluido extracelular del sistema nervioso central (SNC), la adecuada regulación de su composición es de vital importancia para el funcionamiento del cerebro (Johanson, 2008; Redzic & cols. 2005). Se trata de un medio fisiológico para el cerebro y proporciona un soporte mecánico, en el que el cerebro flota, lo que reduce su peso efectivo (Segal, 1993).

Los principales espacios en el cerebro donde se localiza el LCR son los ventrículos laterales, el tercer ventrículo y el cuarto ventrículo. Los ventrículos laterales están conectados a través del foramen de Monro con el tercer ventrículo y este con el cuarto ventrículo por el acueducto de Silvio o acueducto del mesencéfalo. A continuación, el cuarto ventrículo, se conecta a través de 3 orificios; dos laterales (agujeros Luschka) y uno medial (agujero de Magendi), con el espacio subaracnoideo, que se encuentra entre el aracnoides y la pía-madre (Davson & Segal 1996., Keep, 1998) (**Figura 6**).

El LCR se produce en mayor medida por los plexos coroideos de los ventrículos cerebrales, en un proceso que consume energía y que denota que el líquido es más que un simple trasudado del plasma (**Figura 6**), y en bastante menor medida se produce en los capilares subependimarios de los ventrículos, en el espacio subaracnoideo, en los capilares pioaracnoideos y en las arterias parenquimales. Desde su lugar de producción el LCR circula a través de los ventrículos nombrados anteriormente hasta llegar al cuarto ventrículo, donde sigue dos rutas; puede continuar hacia la cisterna magna, a través del orificio de magendi, circulando en sentido descendente por la porción dorsal de la médula espinal y ascendente por la ventral hasta llegar a las cisternas del espacio subaracnoideo de la base del cráneo, o puede pasar a través de los agujeros de Lushka a las cisternas del ángulo pontocerebeloso, y de allí, al resto de cisternas subaracnoideas de la base del cráneo. Desde éstas pasa al espacio de la convexidad del encéfalo y a sus lugares de absorción, fundamentalmente las granulaciones aracnoideas en contacto con los senos venosos donde pasa a la circulación venosa (**Figura 6**) (Milhorat, 1972).



**Fig. 6 Principales vías de producción, circulación y absorción del LCR (Flechas blancas)**

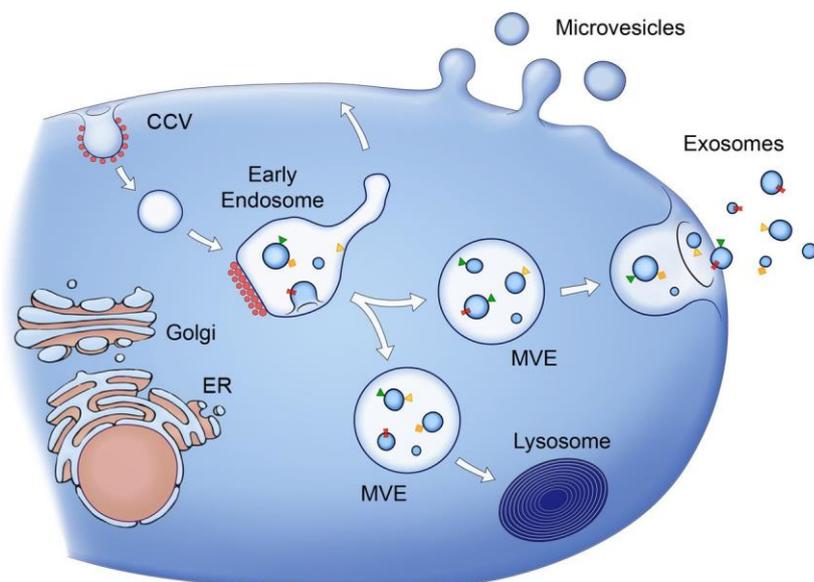
La circulación del LCR se debe a varios factores, como la existencia de un gradiente de presión entre los diferentes lugares por los que circula, la presión hidrostática del LCR, los movimientos de los cilios de las células endimarias y la fuerza pulsátil intermitente ejercida por la sangre en los plexos coroidales. (Davson & Segal, 1996).

La velocidad de producción del LCR en condiciones normales oscila entre 0,3 y 0,4 ml/min. Cada 6 horas se renuevan de entre 150 a 160ml de LCR, que es el volumen normal que posee una persona y, para que este volumen se mantenga constante, debe permanecer un equilibrio entre la producción y la absorción (Silverberg et al., 2001). Recientemente se ha definido un tipo de circulación del LCR Intraparenquimatosamente; La teoría capilar, donde se afirma que la producción del líquido intersticial cerebral ocurre principalmente en los capilares encefálicos, y la reabsorción en la vía de drenaje linfático cerebral, confirmándose así, la inexistencia de una única circulación unidireccional del LCR (Tokuda & Kida, 2015; Louveau et al., 2015).

#### 4.1 Microvesículas en el LCR

En las últimas dos décadas se ha definido un nuevo mecanismo de comunicación celular mediante la transferencia intercelular de vesículas extracelulares. Estas vesículas sirven como vehículos para la transferencia de proteínas citosólicas, lípidos, y ARN (Raposo & Stoorvogel 2013). **Figura. 7**

Recientemente, se ha demostrado que estas microvesículas pueden provenir de la activación glial del SNC, donde Verderio *et al.*, (2012) encontraron niveles incrementados de estas vesículas en el LCR de pacientes con esclerosis múltiple con lo cual se ha propuesto el estudio de las mismas como un posible biomarcador en enfermedades neuroinflamatorias.



**Fig7: Representación gráfica de microvesículas y exosomas,** tomado de Raposo & Stoorvogel, 2013.

#### 4.2 LCR y biomarcadores de prognosis y evolución de la hidrocefalia

La naturaleza multifactorial de la hidrocefalia es el principal obstáculo en el avance del conocimiento hacia las causas de este trastorno. La composición del LCR es un fiel reflejo de lo que está sucediendo en el sistema nervioso central, de hecho se ha considerado la fuente más fidedigna para la obtención de biomarcadores moleculares de la fisiología del sistema nervioso central (Kahle *et al.*, 2000; Naureen *et al.*, 2014)

El LCR está perfectamente aislado de la sangre mediante dos barreras: la barrera hematoencefálica y la barrera sangre-líquido (plexos coroideos). Ambas permiten de manera muy selectiva el paso de sustancias desde la sangre al sistema nervioso central. La composición del LCR está, por tanto, muy controlada. Por otro lado, se ha demostrado que el LCR es un medio eficiente para el crecimiento de células madre neurales, tanto durante etapas embrionarias (Gato *et al.*, 2005; Martín *et al.*, 2009) como durante las etapas fetales y postnatales del desarrollo cortical (Buddensiek *et al.*, 2009, 2010). De tal manera que alteraciones en la composición del LCR podrían tener efectos importantes sobre el desarrollo del cerebro.

### **4.2.1 TNF- $\alpha$ como biomarcador de hidrocefalia**

En la aparición de la hidrocefalia, los daños celulares y tisulares periventriculares tienen diversas consecuencias neuroinflamatorias y neurodegenerativas. Uno de los moduladores inflamatorios más importante es el TNF-alfa (del Inglés Tumor Necrosis Factor- alpha), una citoquina con acciones pleiotrópicas que promueve la inflamación y proporciona señales de muerte celular, que se relacionan con problemas neurológicos (Koblach *et al.*, 1999, Venters *et al.*, 2000a,b). Además promueve la neurodegeneración a través de la inhibición de la señal de supervivencia dada por el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) (Venters *et al.*, 2000b). El TNF-alfa se produce, en numerosas condiciones neuropatológicas que incluyen infecciones, daños, isquemia, degeneración de la sustancia blanca periventricular, etc., por el epéndimo, la astrogía, la microglía y las meninges (Deng *et al.*, 2010; Watters & O'Connor 2011). Este factor está producido por los astrocitos reactivos periventriculares y en menor medida por la microglía. La producción astrocitaria de TNF-alfa puede estar implicada en la permeabilidad endotelial en la barrera hematoencefálica (Utsumi *et al.*, 2000). De hecho, es bien conocido que TNF-alfa se implica, en condiciones patológicas e inflamatorias, en la apertura de uniones estrechas (Landoni *et al.*, 2012, Shen, 2012). Por todo ello, la presencia de TNF-alfa en el LCR ha sido considerada como un marcador prometedor de la hidrocefalia normotensiva y crónica de adultos (Tarkowski *et al.*, 2003). No obstante, hay datos contradictorios (Tarnaris *et al.*, 2006). En el modelo animal de hidrocefalia Hyh se han encontrado

sobreexpresados los niveles de mRNA para TNF-alfa y de su receptor R1, además del propio TNF-alfa en el LCR (Jiménez *et al.*, 2014). Por otro lado, también se postula que el factor TNF-alfa puede desempeñar un papel clave en la hidrocefalia feto-neonatal.

### 4.2.2 Acuaporinas en el LCR

Las acuaporinas 1 y 4, encargadas el balance hídrico del SNC, se han detectado significativamente elevadas en el LCR de pacientes con meningitis bacteriana (Blocher 2011). La meningitis es una enfermedad que presenta un marcado carácter inflamatorio, tal y como ocurre en la hidrocefalia. Sin embargo, la presencia de estas proteínas en el LCR no ha sido explicada.

### 4.3. Acuaporinas

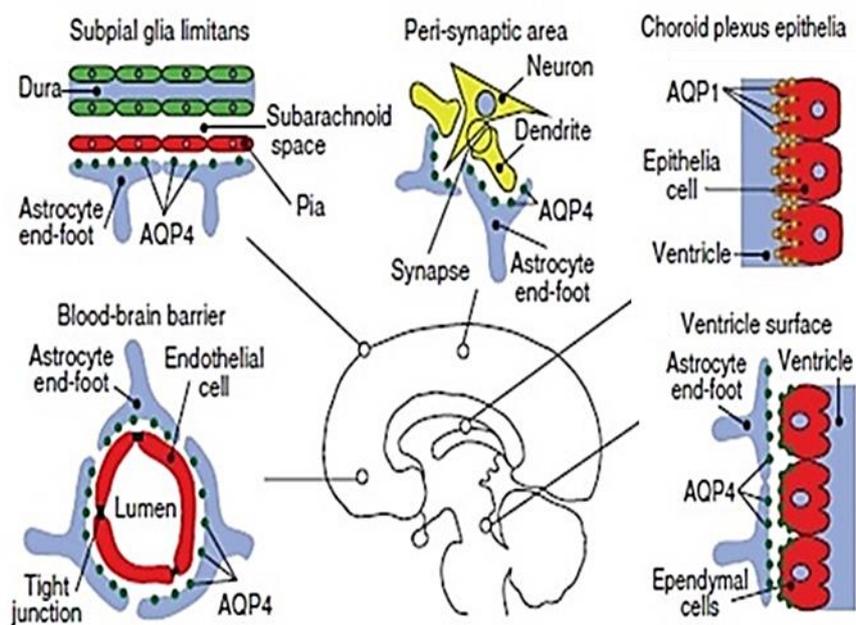
El agua es el principal componente de todos los organismos vivos interviniendo en la regulación de la mayoría de los procesos biológicos. Existe una elevada permeabilidad al agua, en la mayoría de las membranas biológicas respondiendo a mínimas diferencias osmóticas, lo que permite que los compartimientos intra y extracelular mantengan su isotonicidad, necesaria para la homeostasis intracelular. El agua puede atravesar la membrana por difusión simple o a través de poros acuosos, aunque por muchos años se asumió que el transporte de agua ocurría sólo por medio del primer mecanismo. (Sanchez, 2003)

La existencia de ciertas membranas impermeables al agua puso en evidencia que la permeabilidad al agua no era una propiedad de la bicapa lipídica en sí misma, sino que depende de un componente proteico, cuya expresión y funcionalidad puede variar en los diferentes tipos de células. Este hecho produjo que un gran número de investigadores focalizara en encontrar las proteínas responsables de la formación de poros acuosos en la membrana, que pudieran explicar la dinámica del transporte de agua en las membranas biológicas. A inicios de la década de 1990, se halló, en eritrocitos una proteína de 28 kD, organizada en forma de tetrámeros, que fue llamada inicialmente CHIP 28 (Channel-like Integral Protein of 28 KD) (Saboori *et al.*, 1988; Preston *et al.*, 1992), permeable selectivamente a agua y que explicaba la elevada permeabilidad en las membranas en las que estaba presente. Posteriormente fue sugerido el nombre de acuaporina 1 (AQP

1) para esta proteína (King & Agre, 1996; Agre *et al.*,1993). Más tarde se describieron varias proteínas del mismo tipo, las cuales han recibido el mismo nombre seguido de un número secuencial en relación con la cronología de su descubrimiento.

Existen, principalmente, dos tipos de acuaporina en el SNC relacionadas con el balance hídrico del cerebro, la AQP1 y la AQP4. La AQP1 se encuentra en la membrana apical del plexo coroideo (Nielsen *et al.*, 1993; Praetorius & Nielsen, 2006), y no comienza a expresarse hasta el final del desarrollo embrionario además está involucrada en la producción del LCR (Johansson *et al.*, 2005)

**Figura 8.** Por otro lado la AQP4 se encuentra en los pies de los astrocitos, rodeando los capilares y las zonas perisinápticas del sistema nervioso central, así como a lo largo de la membrana basolateral de las células endimarias. (Atkinson & Baum 2009). **Figura 8**



**Figura 8 Localización de las acuaporinas 1 y 4 en el sistema nervioso central** tomado de Atkinson & Baum 2009.

#### 4.3.1 Acuaporina 1 en la hidrocefalia

La comprensión de la respuesta de la AQP1 a los cambios fisiopatológicos en el LCR es importante para determinar un posible uso terapéutico de estos canales

de membrana. Mao *et al.*, (2006) examinaron la expresión AQP1 en ratas con hidrocefalia inducida por inyección de caolín en la cisterna magna. En este modelo crónico de hidrocefalia, La AQP1 y el ARNm que codifica para ella, se mantuvieron sin cambios en comparación con los controles, tanto a las 4 semanas y como a los 9 meses después de la inducción de la hidrocefalia. Posteriormente, Brian *et al.*, (2010) estudiaron inmunohistológicamente la expresión de la AQP1 en el plexo coroideo de ratones adultos, en el mismo tipo de hidrocefalia. Así detectaron que, en los casos de hidrocefalia inducida, la AQP1 se expresaba en el citoplasma, conformando vesículas. Mientras que en los ratones control, la expresión se encontraba únicamente en la superficie apical del epitelio de los plexos coroideos. Estos cambios en la localización de la AQP1, se asociaron con otros cambios ultraestructurales como la reducción en el número de microvellosidades (que se hicieron más cortas y se hincharon), la formación en el citoplasma de endosomas y lisosomas, o la aparición de hendiduras intercelulares (Brain *et al.*, 2010; Tirapelli y *et al.*, 2007). Sin embargo, nada de esto ha sido probado a día de hoy en casos de hidrocefalia humana.

### 4.3.2 AQP 4 en la Hidrocefalia

Como se ha nombrado anteriormente, la AQP4 se encuentra principalmente en los pies de los astrocitos, y en las membranas basolaterales de las células endimarias (Nielsen *et al.*, 1997; Rash *et al.*, 1998; Atkinson & Baum 2009). Sin embargo este patrón de expresión no se consigue hasta edades avanzadas en el desarrollo del SNC. Shen XQ y cols. (2006) señalaron que la expresión de AQP4 estaba ausente en ratas con un día de edad. No empezando a observarse hasta bien avanzada la primera semana de edad, posteriormente, también fue vista en regiones de la corteza subpial, en la zona periventricular y en los pies de los astrocitos rodeando los vasos cerebrales a las 4 y 8 semanas de edad. La cantidad de AQP4, tanto a niveles de ARNm como a nivel proteico estaban incrementados en los modelos hidrocefálicos frente a los controles (Mao *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2006). Estos autores sugieren que el aumento de la AQP4 se produce como un mecanismo de compensación de la hidrocefalia mediante el aprovechamiento de una vía transependimaria (Brian *et al.*, 2010). Esta hipótesis fue reforzada por Bloch *et al.*, (2006), quienes estudiaron el desarrollo de

hidrocefalia después de la inyección de caolín en la cisterna magna en ratones carentes de AQP4 frente a ratones de tipo salvaje, de manera que el grado de dilatación ventricular y la presión intracraneal fueron significativamente mayores en los ratones *Knock out* para AQP4 con respecto a los ratones de tipo salvaje. Estos autores también examinaron la importancia relativa de la AQP4 asociada a los pies de los astrocitos frente a la asociada a la membrana vasolateral de las células endimarias en condiciones de hidrocefalia. De acuerdo con sus modelos matemáticos, la AQP4 asociada a los pies astrocíticos fue la que tuvo más relevancia en cuanto a su sobreexpresión (Pena et al., 2002; Brian et al., 2010). Además la AQP4 está implicada en los fenómenos de activación astrocítica, no solo vinculada a la hidrocefalia (Roales-bujan et al., 2012), sino también asociada a modelos experimentales de encephalomyelitis autoinmune (Jukkola et al., 2013).

Li et al., (2009) demostraron que la mayoría de los ratones carentes de AQP4 presentaban menor tamaño ventricular, reducción de la producción de LCR y el aumento del contenido de agua cerebral en comparación con ratones de tipo salvaje. Estos autores también definieron la importancia de AQP4 en el mantenimiento de la integridad del epéndimo, ya que un 40 por ciento de estos ratones presentaban disrupción del epéndimo. Además un 9,6 por ciento del total de los ratones *knock out* para este canal acuoso no solo presentaban esta disrupción sino que desarrollaban hidrocefalia. Con lo que parece que la AQP4 está jugando un papel mucho más importante en la hidrocefalia, que un simple efecto compensatorio pues está implicado en un importante fenómeno etiológico de la hidrocefalia, como es la disrupción de endimaria.

## ***Planteamiento, Hipótesis y Objetivos***



## **B. PLANTEAMIENTO, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

1. La hidrocefalia de inicio fetal conlleva una neurogénesis anormal, causada por una patología primaria del neuroepitelio/epéndimo asociada a la pérdida de células madre encefálicas. Por ello, se ha sugerido que la hidrocefalia debe ser tratada como una enfermedad del neurodesarrollo *per se*, y no como consecuencia de un daño físico secundario al incremento del volumen ventricular, tal y como se pensaba clásicamente (Wagner *et al.*, 2003; Guerra *et al.*, 2015). La mayoría de los esfuerzos llevados a cabo para esclarecer las bases etiopatológicas de esta enfermedad han sido llevados a cabo en modelos animales. Sin embargo, es importante tener en cuenta ciertas consideraciones cuando se pretende extrapolar información proveniente de ratas o ratones a enfermedades del neurodesarrollo, ya que los roedores son lisencefálicos, mientras que el ser humano es girencefálico. Este simple hecho implica importantísimas diferencias en la migración glial y neuronal. Además, en el ser humano existe una capa germinativa muy importante, la zona subventricular externa (ZS<sub>Ve</sub>), que ni siquiera está presente en el ratón o la rata (Romero *et al.*, 2015). A todo esto habría que sumarle que el antecesor común entre el humano y los roedores era girencefálico, esto significa que los roedores siguieron un camino evolutivo muy diferente al nuestro, teniendo un cerebro incluso más evolucionado, que no necesita ser girencefálico. Por lo tanto creemos que es muy importante realizar esfuerzos en investigar las etiopatologías cerebrales en humanos.

2. A pesar de que la AQP1 es la principal proteína implicada en la producción de LCR, histológicamente ha sido muy poco estudiado en el desarrollo del sistema nervioso central. Además, los mecanismos asociados a la hidrocefalia nunca han sido validados en humanos y menos en etapas fetales, que es cuando realmente comienza la enfermedad. Por lo tanto, es importante conocer las implicaciones de este canal de agua en los mecanismos implícitos de la hidrocefalia congénita humana desde su origen en el desarrollo fetal.

3. El 90% del tejido cerebral está compuesto por la glía sin embargo, su papel en el desarrollo de enfermedades del sistema nervioso central no ha sido estudiado en profundidad. Los astrocitos desempeñan un rol fundamental en el desarrollo cortical durante la sinaptogénesis (Slezak & Pfriederger 2003). Además, se ha vinculado a desórdenes en neurodesarrollo tales como el síndrome de Rett, (Lioy *et al.*, 2011) o la hidrocefalia de inicio fetal, donde se producen activaciones gliales que se relacionan con numerosos desórdenes neurológicos (Rolaes-Bujan *et al.*, 2012). También se ha sugerido que podrían estar implicados en enfermedades neuropsiquiátricas, cuya etiología no ha sido bien definida, tales como la epilepsia, el autismo o la esquizofrenia (Molofsky *et al.*, 2012). Por lo tanto, un preciso entendimiento del desarrollo glial es crucial para entender la heterogeneidad funcional y anatómica de los astrocitos. Sin embargo, se ha convertido en un objetivo complicado, debido al escaso conocimiento acerca de la astrocitogénesis en la corteza cerebral. La ausencia de biomarcadores de progenitores astrocíticos dificulta distinguir entre los distintos linajes gliales en el desarrollo cortical (Molofsky *et al.*, 2012). Por otro lado, AQP4 es utilizada como marcador glial específicamente de fibroastrocitos en el adulto, además se ha vinculado con la migración neuronal en el hipocampo de ratones (Cavazzin *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2010). Sin embargo, su función en el desarrollo fetal es prácticamente desconocida, ya que en modelos animales su expresión es inexistente en periodos gestacionales, y en el humano solo hay un estudio que no especifica los tipos celulares que está marcando esta proteína (Gomori *et al.*, 2006). Por todo ello se propone profundizar en el conocimiento de este canal acuoso en el desarrollo cortical y sus posibles implicaciones como marcador de gliogénesis.

4. Se ha descrito que AQP4 está implicada en el mantenimiento de la integridad de la zona ventricular (Li *et al.*, 2009) y que el ratón *knock out* para esta proteína presenta disrupciones en la zona ventricular. Además, un porcentaje significativo de ellos desarrolla hidrocefalia (Feng *et al.*, 2009). También se ha vinculado con la activación glial (Rolaes-bujan *et al.*, 2012; Jukkola *et al.*, 2013) e incluso con la migración neuronal (Cavazzin *et al.*, 2006). Todos ellos son fenómenos de primera magnitud en la etiología de la hidrocefalia congénita, pero

solo se le ha dado importancia a la sobreexpresión de AQP4 como un mecanismo para compensar los efectos producidos por esta patología (Bloch *et al.*, 2006; Brian *et al.*, 2010). Por lo tanto, parece plausible pensar que podría estar desempeñando un rol más importante en la propia etiología de la enfermedad.

**5.** La naturaleza multifactorial de la hidrocefalia es un obstáculo importante en el avance del conocimiento de este trastorno, debido a que diferentes etiologías pueden desembocar en su desarrollo. Además, la hidrocefalia está vinculada a diversos fenómenos tales como la destrucción de la corteza periventricular, a la fibrosis o esclerosis, al deterioro del plexo coroideo y del epéndimo/neuroepitelio (milhorat, 1972; Weller & Wisniewski 1969, Guerra *et al.*, 2015), así como a la pérdida de la sustancia blanca y células madre periventriculares (Mccallister, 2012; Guerra *et al.*, 2015). En el LCR se reflejan estos cambios fisiopatológicos (Kahle *et al.*, 2000) que resultan de la variabilidad de las condiciones etiológicas. Así se propone al LCR como la fuente más fiable para extraer biomarcadores que nos puedan informar de la etiología de la hidrocefalia.

La utilidad de AQP1 y AQP4 como biomarcadores de enfermedades inflamatorias, puede deducirse de los trabajos de Blocher *et al.* (2011) donde se describe un incremento de estas proteínas en el LCR de pacientes con meningitis. Además, uno de los moduladores inflamatorios más importantes es el factor TNF-alfa, una citoquina con acciones pleiotrópicas que se relaciona con problemas neurológicos mediante su acción proinflamatoria y su papel en la apoptosis (Koblach *et al.*, 1999, Venters *et al.*, 2000a,b). Tomando en consideración todos estos aspectos, proponemos el estudio de AQP1, AQP4 y TNF-alfa como biomarcadores de esta enfermedad.

Por otro lado, recientemente, se ha descrito un incremento en la producción de microvesículas en el LCR de pacientes con esclerosis múltiple, otra enfermedad con un importante componente inflamatorio. Estas microvesículas provenían de la activación glial producida por dicha enfermedad (Verderio *et al.*, 2012). También se sabe que la AQP4 está sobreexpresada en los astrocitos en hidrocefalia (Roales-bujan *et al.*, 2012). Así, la AQP4 presente en el LCR puede provenir de las microvesículas que están en dicho medio.

Para abordar estos planteamientos, se presentan las siguientes hipótesis:

- Existen diferencias en los fenómenos etiológicos de la hidrocefalia descritos a partir de modelos experimentales animales con respecto a la patología en humanos.
- Existen biomarcadores de hidrocefalia congénita en el líquido cefalorraquídeo.
- Las AQPs no solo están implicadas en un fenómeno compensatorio de la hidrocefalia sino que se relacionan con la propia etiología de la enfermedad.

Los objetivos generales y específicos planteados para la comprobación de estas hipótesis se enumeran a continuación:

- a. Definir la expresión de la AQP1 en el desarrollo gestacional del SNC humano y sus implicaciones en la Hidrocefalia**
  - i) Definir el programa temporoespacial de expresión de AQP1 en el desarrollo normal humano entre las 8 y las 40 semanas de gestación.
  - ii) Validar en humanos los mecanismos de AQP1 descritos previamente en modelos experimentales animales.
- b. Caracterizar la expresión de la AQP4 en el desarrollo cortical humano.**
  - i) Testar la utilidad de AQP4 como posible marcador de linajes astrocitogénicos en humanos.
  - ii) Testar la utilidad de AQP4 como posible marcador de linajes ependimarios en humanos.
- c. Definir las implicaciones de la AQP4 en la etiología de la hidrocefalia congénita humana.**
  - i) Comprobar la implicación de la AQP4 en la disrupción ependimaria de los casos hidrocefálicos humanos.
  - ii) Comprobar la implicación de la AQP4 en la reactividad glial característica de la hidrocefalia.
  - iii) Comprobar la implicación de la AQP4 en la migración celular cortical de la hidrocefalia.

d. **Determinar biomarcadores en la hidrocefalia congénita humana.**

- i) Determinar los niveles de AQP1 en el líquido cefalorraquídeo de pacientes con diferentes tipos de hidrocefalia, en aras de obtener información sobre el estatus del plexo coroideo.
- ii) Determinar la concentración de AQP4 y TNF-alfa en el líquido cefalorraquídeo para obtener información acerca de la activación glial y la respuesta inflamatoria de los distintos tipos de hidrocefalia.
- iii) Caracterizar las microvesículas del LCR humano, y comprobar la expresión de AQP4 y otros marcadores gliales en los diferentes tipos de hidrocefalia.



## ***Material y métodos***



## C. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Telencéfalos:

Nuestro grupo de investigación cuenta con una colección de más de 40 cerebros humanos, fetales y adultos. Los cerebros fetales provinieron de la colección de cerebros que fueron obtenidos a partir de abortos espontáneos ocurridos en el Hospital Universitario de Canarias, cumpliendo los requisitos legales dispuestos en la Ley 42/1988, de 28 de diciembre (BOE del 31/12/1988). Los cerebros de individuos adultos, proceden de donaciones al Departamento de Anatomía.

Todas las muestras humanas utilizadas en el presente estudio han estado supervisadas por el comité de Ética de la Universidad de La Laguna, cumpliendo los requisitos expresados en la declaración de Helsinki de 2004. En este trabajo se analizaron cerebros fetales (de 8 a 40 semanas de gestación) y adultos (Tabla X1). La edad de los fetos se obtuvo a partir de la historia gestacional, indicada por el obstetra, y las características patológicas de los mismos, fueron determinadas por el servicio de anatomía patológica del Hospital Universitario de Canarias.

No cursan con hidrocefalia		Cursan con hidrocefalia		
Cerebro	Edad SG	Cerebro	Edad SG	Patología
1	8	20	20	4V des
2	9	21	20	4V des
3	12	22	20	4V des
4	13	23	21	4V des
5	13-14	24	21	4V des
6 (3)	15	25	21	4V des
9	15-16	26	21	4V des
10 (2)	16	27	21	Lisencefalia
12	18	28	21	Lisencefalia
13	20	29	21	Mielomeningocele
14	20-21	30	21	Dandy Walker
15	21	31	21	Arnold Chiari
16	21	32	25	Arnold Chiari
17	25	-	-	-
18	27	-	-	-
19	RN	-	-	-
20	Adulto			

**Tabla 3: Relación de cerebros utilizados para este trabajo.** 4V des: Hidrocefalia tetraventricular de origen desconocido o comunicante.

## 2. Líquidos cefalorraquídeos:

Los LCRs se obtuvieron a través del servicio de cirugía pediátrica y del servicio de microbiología del Hospital Universitario de Canarias. Las muestras en condiciones patológicas se extrajeron del ventrículo lateral durante los cinco primeros días de vida, mientras que en condiciones no patológicas, Las muestras se obtuvieron por punción lumbar en pacientes con sospecha de meningitis o encefalitis (Tabla 2).

Los padres dieron su consentimiento y el comité de ética médica de la Universidad de La Laguna y el Hospital Universitario de Canarias aprobaron el estudio. Los LCR se extrajeron por motivos de diagnóstico o terapéuticos. El diagnóstico de la hidrocefalia se llevó a cabo mediante métodos de ultrasonido durante el embarazo. En los casos no controlados por pelvi-cefalometría justo antes del nacimiento. El tipo de la hidrocefalia fue establecido por métodos de ultrasonido, clasificándose en; hidrocefalia tetraventricular de origen desconocido (Hidrocefalia comunicante), El síndrome de Dandy-Walker, obstrucción del acueducto de Silvio, las cuales se consideraron hidrocefalias obstructivas y finalmente las hidrocefalias post-hemorrágicas (Tabla 4).

## 3. Procesamiento del tejido.

El material fue procesado siguiendo tres pasos: fijación, inclusión y montaje.

a) La *fijación* de los tejidos nos permite conservar sus propiedades estructurales en el momento de la fijación, previniendo los fenómenos de degradación. El fijador más utilizado en este estudio fue el formol al 10%, seguido de una postfijación en Bouin, aunque también se fijaron con Carnoy. La fijación se llevó a cabo por inmersión del tejido en el fijador con un tiempo variable en función del tamaño del tejido (entre 16 y 48 horas)

b) El proceso de *inclusión* permite manipular las muestras para realizar cortes histológicos sin que se rompan o se deformen. En el desarrollo de este trabajo se utilizó la parafina como medio de inclusión.

LCR	Patología	Edad
1	OAS	1-5 Días
2	OAS	1-5 Días
3	OAS	27 SG
4	OAS	1-5 Días
5	Dandy Walker	1-5 Días
6	Post H	1-5 Días
7	Post H	1-5 Días
8	Post H	1-5 Días
9	Post H	1-5 Días
10	4V des	1-5 Días
11	4V des	1-5 Días
12	4V des	1-5 Días
13	4V des	38 SG
14	4V des	1-5 Días
15	4V des	1-5 Días
16	Mal Función Valvular	8 Años
17	Cont	9 Años
18	Cont	3 Días
19	Cont	1 Días
20	Cont	34 SG
21	Cont	38 SG
22	Cont	1 Mes
23	Cont	1 Mes
24	Cont	2 Años

**Tabla 4: Relación de LCRs utilizados en este trabajo.** OAS:obstrcción del acueducto de Silvio, Post H: hidrocefalia posthemorrágica, 4V des: Hidrocefalia tetraventricular de origen desconocido o comunicante, Cont: Control

Antes de incluir las piezas es necesario hacerlas permeables a la parafina. Teniendo en cuenta que la parafina no es miscible en agua, es necesario deshidratar las muestras. Para ello se pasan por concentraciones crecientes de Etanol, de la siguiente manera.

1º Alcohol de 70 grados: Se realizaron dos pases en 24 horas. Además, con el fin de conseguir una mejor coloración del líquido Bouin, se le añadió al primer pase una gota de amoniaco por cada 100ml.de solución.

2º Alcohol de 80 grados: Pase de 24 horas.

3º Alcohol de 90 grados: Pase de 24 horas.

4º Alcohol de 96 grados: Pase de 24 horas.

5º Alcohol de 100 grados: Pase de 24 horas.

Una vez deshidratada es necesario el uso de disolventes orgánicos también llamados disolventes intermediarios, que son miscibles tanto en alcoholes como en parafina, el disolvente utilizado fue el Benzoato de metilo, donde se dejan las piezas hasta que se hundan.

6º Benzoato de metilo + alcohol de 100 grados a partes iguales.

7º Benzoato de metilo

8º Mezcla de Benzol-Parafina a partes iguales, donde permaneció durante 30 minutos a 60 °C.

9º Se incluye en parafina líquida a una temperatura de 60°C durante 24 horas.

10º Segundo pase por parafina de 24 horas para que desaparezca el benzol. A continuación el tejido fue depositado en moldes de plomo, y fueron embebidos en parafina limpia, dejándolas enfriar a temperatura ambiente hasta conseguir un bloque sólido.

Los bloques fueron seccionados con un microtomo (Minot Leitz 1212) en cortes seriados de 8 micras de espesor, recogiendo los cortes en series alternas A, B, C Y D.

c) El último paso de la preparación de la muestra, es el *montaje* de los cortes. Para ello, los portas se tratan con APS (3-aminopropyl triethoxysilane) y antes de colocar el corte se barniza el portaobjetos con albúmina de clara de huevo. Esto hace las veces de pegamento para adherir los cortes al porta, con el fin de que soporten los diferentes procesos de la inmunohistoquímica y no se desprendan.

### 3.1 Tinciones convencionales

#### 3.1.1 Hematoxilina-Eosina

La hematoxilina es un colorante catiónico mientras que la eosina es un colorante aniónico perteneciente a los xantenos. Se teñirán los núcleos de azul y los citoplasmas en rosa. Nos va a ayudar a ver la morfología celular. Desparafinamos los cortes en estufa durante 30 min a 60°C. Después los sumergimos en xilol durante 10 o 15 min. A continuación procedemos a la hidratación pasando por concentraciones decrecientes de alcohol; absoluto-5min, alcohol 96º-5min y alcohol 70º-5 min. Lavar en H2O destilada. Se pasa por Hematoxilina de Harris (Panreac) 5 min. Lavar en H2O durante 2 min. Eosina alcohólica (Panreac) 1 min.

Luego deshidratamos con pases de 5 min de alcohol de 70°, alcohol de 96°, alcohol absoluto, xilol y finalmente montamos los portas con Eukitt.

### 3.1.2 Violeta cresilo

El violeta de cresilo es un colorante acidófilo, que tiñe el núcleo celular y el retículo endoplasmático rugoso (sustancia de Nissl), se emplea para las tinciones generales del sistema nervioso. La tinción se realiza con los cortes pegados al portaobjetos y el protocolo básico es el siguiente: 1. Lavado de los cortes en agua destilada (1-3 minutos) 2. Tinción con violeta de cresilo al 1% (5-10 minutos) 3. Lavado en agua destilada (aprox. 1 minuto) 4. Diferenciación en alcohol-acético (etanol 70% con ácido acético durante 15 segundos) 5. Deshidratación (etanol 96%, etanol 100%), aclarado y montaje con Eukitt.

## 3.2 Inmunohistoquímica

### 3.2.1 Inmunohistoquímica, complejo avidina biotina (ABC)

La inmunohistoquímica (IHQ) es el abordaje más preciso y comúnmente utilizado para la detección y localización de proteínas en tejidos. Esta técnica consiste en una reacción antígeno anticuerpo mediante la utilización de anticuerpos específicos hechos por inmunización de animales huésped, a su vez estos anticuerpos pueden ser detectados con anticuerpos secundarios. De tal manera que es posible detectar dónde se está expresando una proteína de manera específica.

Se desparafinaron los cortes, sometiéndolos a una temperatura de 65°C durante 30 minutos y sumergiéndolos en xilol durante 30 minutos. Posteriormente, se hidratan, pasándolos por una serie de alcoholes de gradación decreciente (etanol de 100°, 96°, 90°, 80° y 70°) hasta llevarlos a fosfato buffer salino (PBS) a pH 7.4, que es el tampón en el que tendrá lugar la inmunorreacción. Para el caso de algunos anticuerpos es necesario hervir las muestras en tampón de citrato sódico (pH6) durante 20 minutos, con lo que se desnaturalizan las proteínas y favorecen el desenmascaramiento del epítipo. A continuación se realizan varios lavados en PBS y se incuban con los anticuerpos primarios durante toda la noche en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Los anticuerpos utilizados y las concentraciones de trabajo están detallados en la **tabla 5**.

Para evitar el marcaje de la peroxidasa endógena se trataron los cortes con una solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,3% durante 20 min. Como anticuerpo secundario se utilizó el kit RTU Vectastain Universal Elite ABC (Vector Laboratories). Para visualizar los resultados se reveló con DAB (3,3-*diaminobencidina* tetraclorhidrato, Sigma-Aldrich) y peróxido de hidrógeno 0,003% a esta mezcla se le añadió níquel para incrementar el contraste dándole una coloración más oscura. Después los portas se deshidrataron en una concentración creciente de alcoholes (70°, 96°, 98° y 100°) se pasaron por xilol y se montaron con Eukitt.

### 3.3. Inmunofluorescencia

Los cortes de cerebro se desparafinaron e hidrataron y fueron incubados con el primer anticuerpo durante toda la noche (13 horas). Las secciones se lavaron en PBS pH 7,4 y se incubaron durante una hora en el anticuerpo secundario 1:500 (Invitrogen) correspondiente, conjugado con un fluoroforo, Alexa Fluor 488 Anti-ratón o Cy3 Anti-conejo (Invitrogen). Para la inmunofluorescencia doble se incubó con una mezcla de anticuerpos primarios en las diluciones requeridas para cada anticuerpo y se incubó con la mezcla de anticuerpo secundario 1:500 (Invitrogen) ambos conjugado con su fluoroforo correspondiente. También se hicieron inmunofluorescencias seriadas donde se incubó con un anticuerpo primario, a continuación se incubó secundario- biotinilado, posteriormente se incubó con otro anticuerpo primario durante 13 horas y finalmente se incubó con una estreptavidina asociada a Cy3 y un Alexa fluor 488 anti-conejo (invitrogen). Para resaltar los núcleos, las muestras fueron incubadas durante cinco minutos con DAPI (1:5000). Los cortes fueron montados en medio PBS+ Glicerol a partes iguales.

#### 3.3.1 Controles de las técnicas inmunohistoquímicas

Como control negativo de la técnica, en cada experimento se procesaron simultáneamente secciones en las que se omitió el paso de incubación en el anticuerpo primario correspondientes, sustituyendo este paso por una incubación en el tampón de dilución. En todos los casos, los controles negativos no presentaron inmunotinción, demostrando la especificidad de la técnica.

### **3.4. Visualización y cuantificación**

#### **3.4.1 Visualización, adquisición y cuantificación de la tinción inmunohistoquímica**

(ABC) Las muestras fueron visualizadas en un microscopio LEICA DMRB con cámara CCD LEICA DC 300F y obtenidas con el programa iPhoto Plus versión 4 para su posterior tratamiento. Una vez adquiridas las imágenes se utilizó el programa Image J (Java) para la obtención de los valores de la tinción inmunohistoquímica.

#### **3.4.2 Visualización de la inmunofluorescencia**

Las muestras fueron visualizadas en un Microscopio Confocal Espectral Olympus Fluoview 1000.

### **3.5 Análisis estadístico.**

El tratamiento estadístico de los resultados se realizó con el paquete estadístico SPSS Statistics versión 19, del cual se empleó una U de Mann-Whitney.

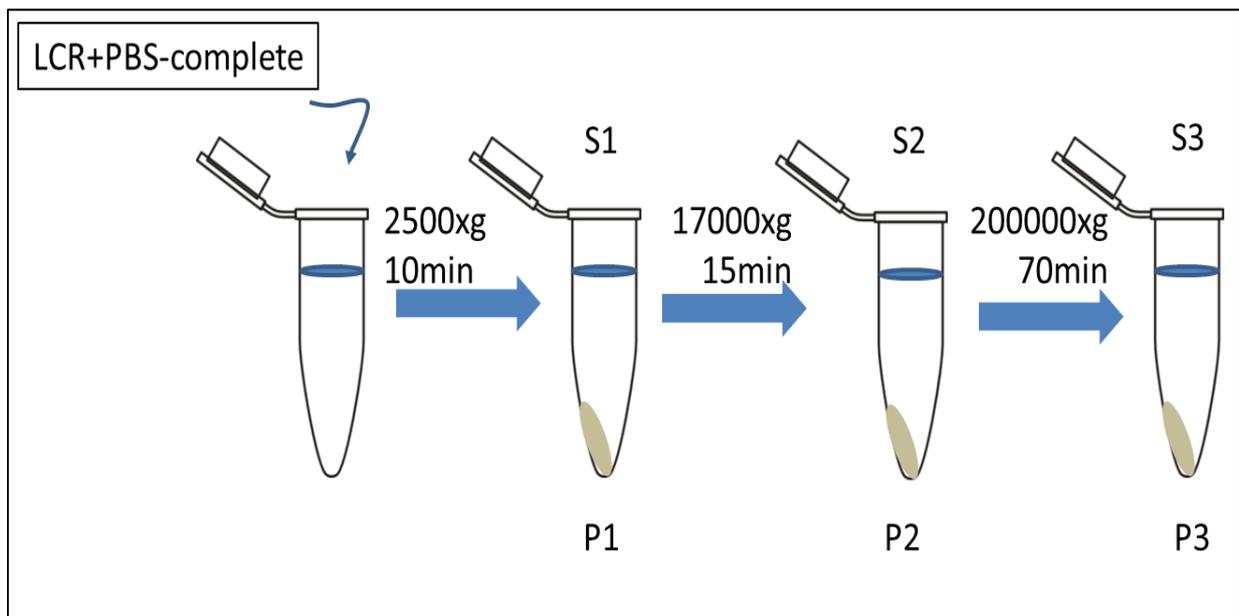
## **4. Extracción de Vesículas del LCR.**

EL Líquido cefalorraquídeo que estaba almacenado a menos 80°C fue descongelado en frío, se introdujo 1ml de la muestra en un tubo eppendorf de dos mililitros y se le añadió 1ml de PBS+complete al 2X, posteriormente se centrifugó de manera secuencial, 10 minutos a 2500g, de esta manera discriminamos células y debris obteniéndose el pellet 1 (P1), el sobrenadante, (S1), se centrifugó a 17000g durante 15 minutos obteniéndose el pellet 2 (P2) así mismo el sobrenadante 2 (S2) se introdujo en tubos de Polypropileno de 5 ml, (Polypropylene, Thinwall, 5.0 mL, 13 x 51 mm Beckman coulter), y se le añadió 3,8 ml de PBS+complete al 1X, posteriormente se ultracentrifugó durante 70 minutos a 200000g obteniéndose el pellet 3 (P3) y el sobrenadante 3 (S3). **Figura 9.** Este método permite aislar de manera fraccionada diferentes pules de vesículas. (método modificado de Bianco et al.2009).

También se realizaron extracciones de manera directa donde se llevó a cabo una centrifugación de 10 minutos a 2500g y una ultracentrifugación de 70 minutos a 200000g. Finalmente los pellets fueron resuspendidos en SDS buffer para realizar Western blott o fueron resuspendidos en 100 µl de PBS con formol al 0,01% para la fijación de las vesículas, del sobrenadante 3 se llevó a cabo una precipitación

de proteínas totales mediante la precipitación con acetona. Donde se le añadieron 4 partes de acetona (-20°C) por una de muestra, se agitó vigorosamente y se dejó durante 30 minutos a -20, luego se centrifugó a 15000g durante 10 minutos y se resuspendió en SDS buffer para la realización de WB. (todos los pasos de centrifugación se hicieron a 4°C)

Para la ultracentrifugación se utilizó una ultracentrífuga beckman coulter optima L-90K ultracentrifuge, con un rotor SW55 Ti de cubeta oscilante.



**Fig.9. Representación de las centrifugaciones secuenciales para la obtención de microvesículas.**

## 5 Técnica de inmunotransferencia (Western-Blot, WB)

El Western blot, es una técnica semicuantitativa usada para detectar proteínas específicas en una muestra. Primero se separan las proteínas en un gel de poliacrilamida según su tamaño y su carga, luego se transfieren a una membrana adsorbente y finalmente se identifica el antígeno deseado mediante una reacción antígeno anticuerpo. Las proteínas del LCR fueron desnaturalizadas en un tampón de muestra que contiene (100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% de SDS, 2% de azul de bromofenol (Sigma-Aldrich), 20% de glicerol (Sigma-Aldrich) y para la reducción de estas se añadió  $\beta$ -mercaptoetanol al 0,5% (Sigma-Aldrich). Luego las muestras se calentaron a 95 ° C durante 5 min.

Para realizar estas electroforesis se utilizó el sistema Miniprotean III (Bio-Rad). Se prepararon geles de poliacrilamida al 10% con SDS (Sigma-Aldrich), una vez polimerizados las proteínas fueron separadas electroforéticamente durante 50 minutos a 35 mA por gel. Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore) a 400 mA durante 90 minutos en tampón de transferencia (39 mM de glicina, 48 mM Tris-base a pH 8.3, SDS 0,037%, 10% de metanol) en un sistema Mini-Trans Blot (Bio-Rad). Después de 1 hora de bloqueo, con solución BLOTTO (Bovine Lacto Transfer Technique Optimizer) que contiene 5% de leche desnatada y deshidratada en tampón tris-salino, (TBS) las muestras fueron incubadas con anticuerpos primarios en BLOTTO a 4°C durante la noche. La detección se realiza por quimioluminiscencia (Amersham Biosciences) después de una hora de incubación con peroxidasa de rábano conjugada con anti-conejo o anti-ratón (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Los anticuerpos utilizados para la reacción antígeno anticuerpo están detallados en la **tabla 5**.

### 5.1 Visualización, adquisición y cuantificación

La señal de quimioluminiscencia emitida se detectó con el sistema de captura de imagen (ChemiDoc™ MP, Biorad) y se analizó usando el software provisto por el fabricante (ImageLab), fueron representados gráficamente con el programa Grphpad Prism 5. Los datos fueron considerados estadísticamente significativos a valores de  $p < 0,05$  que se llevó a cabo utilizando el software estadístico de IBM SPSS 19.

## 6 ELISA

La AQP4, el TNF $\alpha$  y La AQP1 se cuantificó en el LCR de pacientes con hidrocefalia y control, para ello se utilizó 3 Kit “*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*” (ELISA) Los kits utilizados para cuantificar la concentración de AQPs pertenecían a la casa USCN (USCN life Science Inc., Wuhan, China,) y el utilizado para la cuantificación de TNF $\alpha$  pertenecía a la casa comercial Invitrogen (Invitrogen Camarillo, CA, USA;) Todos ellos se utilizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las microplacas revestidas con el anticuerpo específico, fueron incubadas durante 2 horas a 37°C con los LCRs diluidos 1:2 y con concentraciones conocidas del antígeno en cuestión (estándar), con la finalidad de realizar un curva de calibrado. En el caso de las AQP's la curva de calibrado se llevó a cabo a las siguientes concentraciones; 40 ng / ml, 20 ng / ml, 10 ng / ml, 5 ng / mL, 2,5 ng/mL, 1,25 ng/mL, 0,625 ng/mL y en el caso del TNF $\alpha$  la curva se realizó a las siguientes concentraciones 32 pg/ml, 16 pg/ml, 8 pg/ml, 4 pg/ml, 2 pg/ml, 1 pg/ml, 0,5 pg/ml, las curvas se realizaron por triplicado. Posteriormente fueron lavados 5 veces y a continuación se añadió una preparación de anticuerpo policlonal conjugado con biotina específico para AQP's o para el TNF $\alpha$ . Después de los ciclos de lavado, las placas se incubaron con avidina conjugada con peroxidasa de rábano durante 1 h a 37 °C. Finalmente y tras los ciclos de lavado correspondientes, se añadió 3.3'5.5'-tetrametilbenzidina (TMB) y se incubó a 37 °C durante 20 min. La reacción enzima-sustrato se terminó con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La densidad óptica se midió inmediatamente a 450 nm.

### **6.1 Análisis de Datos**

Para el análisis de datos se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney (Mann-Whitney-Wilcoxon). Los datos fueron considerados estadísticamente significativos a valores de  $p < 0,05$  que se llevó a cabo utilizando el software estadístico de IBM SPSS 19, y fueron representados gráficamente con el programa Grphpad Prism 5.

## **7 Citometría de Flujo**

La citometría de flujo es una técnica destinada a la cuantificación de componentes y/o características estructurales de las células, mediante métodos ópticos. Esta técnica puede utilizarse para el análisis de diferentes tipos celulares o productos celulares en una mezcla o suspensión, mediante la cuantificación de las características estructurales (tamaño y complejidad).

Por inmunofluorescencia, utilizando anticuerpos específicos, el citómetro permite cuantificar la expresión de proteínas en las vesículas de forma individual. En este trabajo se usó citometría de flujo para determinar la expresión de AQP4 y GFAP.

Las vesículas previamente extraídas (*ver apartado 4*) se incubaron con anticuerpo primario durante una hora (**tabla 5**), a continuación se hizo un lavado añadiendo 1ml de PBS. Se centrifugó, se resuspendió en 100 µl y se incubó con los anticuerpos secundarios unidos a un fluorocromo (antirata-alexa 488 y anticonejo-alexa 647 Invitrogen)

Anticuerpo	Especie	Dilución IH	Dilución WB	Dilución CF	Procedencia
AQP4	Conejo	1:1500	1:1000	1:100	Abnova
AQP1	Conejo	1:1000	-	-	Abnova
Vimentina	Conejo	1:200	-	-	Abcam
Vimentina	Ratón	1:200	-	-	Abcam
GFAP	Conejo	1:400	1:1000	-	Abcam
GFAP	Rata	1:100	-	1:100	Abcam
PCNA	Ratón	1:200	-	-	Abcam
TTR	Conejo	-	1:1000	-	DAKO
S100	Conejo	1:200	-	-	DAKO

**Tabla 5: Relación de anticuerpos utilizados y sus diluciones en las diferentes técnicas**

### **7.1 Análisis.**

Se analizaron 1600 eventos (vesículas) por cada una de las muestras, en un citómetro de flujo MacsQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec, Alemania) y los datos se representaron en una escala logarítmica. El análisis de los datos se realizó con el programa MacsQuantify. La fluorescencia producida por los anticuerpos secundarios en ausencia de anticuerpos primarios se consideraron como fondo.

### **7.2 Visualización**

Las vesículas fueron visualizadas con un Microscopio Confocal Espectral Olympus Fluoview 1000, a modo de confirmación



## ***Resultados***



## D. RESULTADOS

### 1. AQP1 Inmunohistoquímica

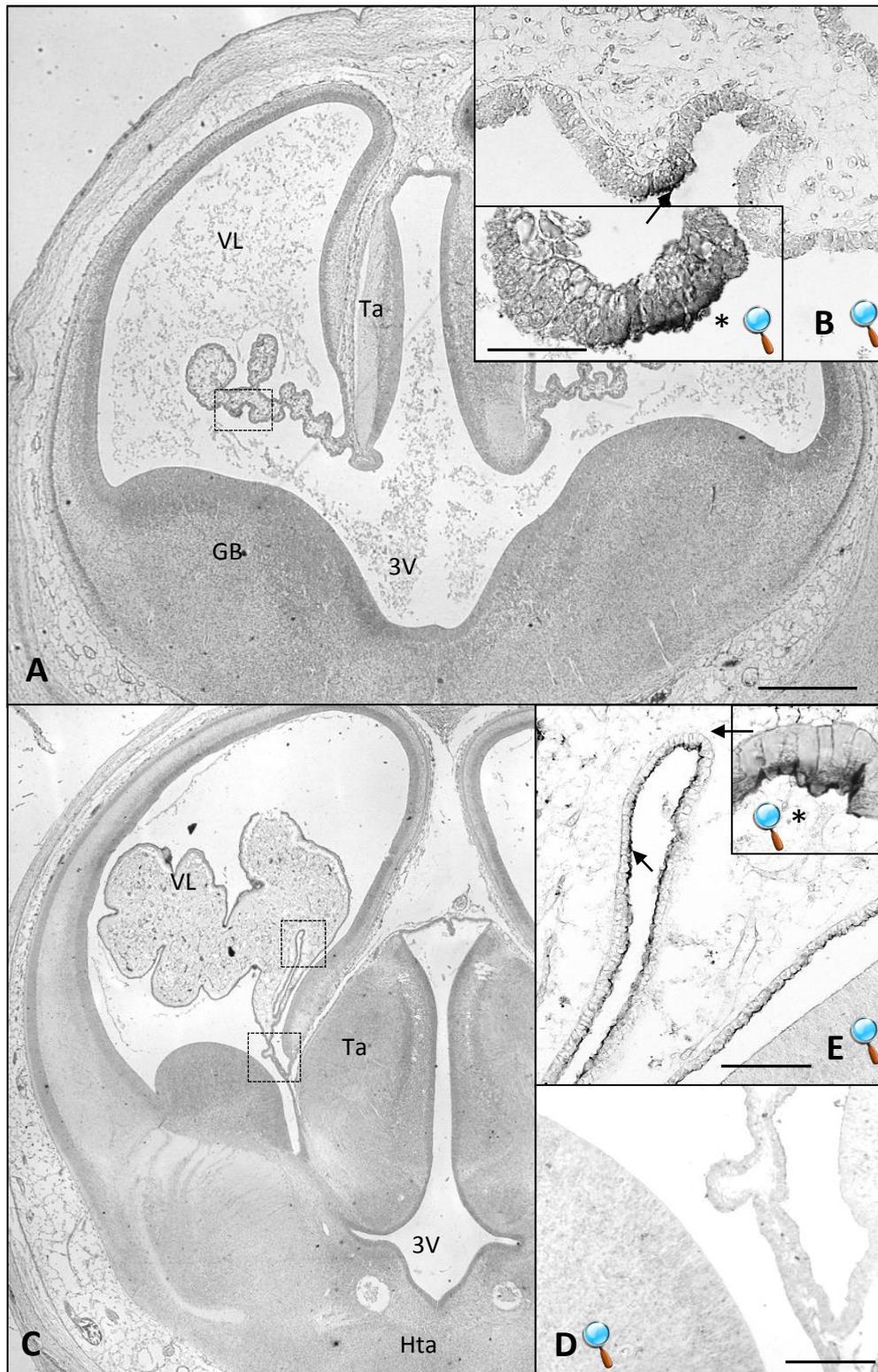
#### 1.1 Expresión de la AQP1 en el desarrollo de los Plexos Coroideos

La expresión de AQP1 se observa por primera vez en los plexos coroideos telencefálicos a las 8-9 semanas de gestación, **(Figura 10 A,B,\*)** dicha expresión empieza en las zonas distales del tallo coroidal, en pequeños focos inmunoreactivos, en este periodo el epitelio es pseudoestratificado correspondiente a la fase 1 del desarrollo de los plexos coroideos y la AQP1 se expresa únicamente en el polo apical de las células que están en contacto con el ventrículo. A las 10-11 semanas de gestación se observa un gran incremento en el tamaño de los plexos coroideos, ocupando gran parte de la cavidad ventricular. Además se destaca la presencia de un enorme tejido conectivo y la ausencia de repliegues coroidales. La AQP1 es inmunoreactiva en el polo apical de las células coroidales distales, **(Figura 10 C,D,E,\*)** no existiendo inmunoreactividad en el tallo coroidal, ni en las zonas adyacentes.

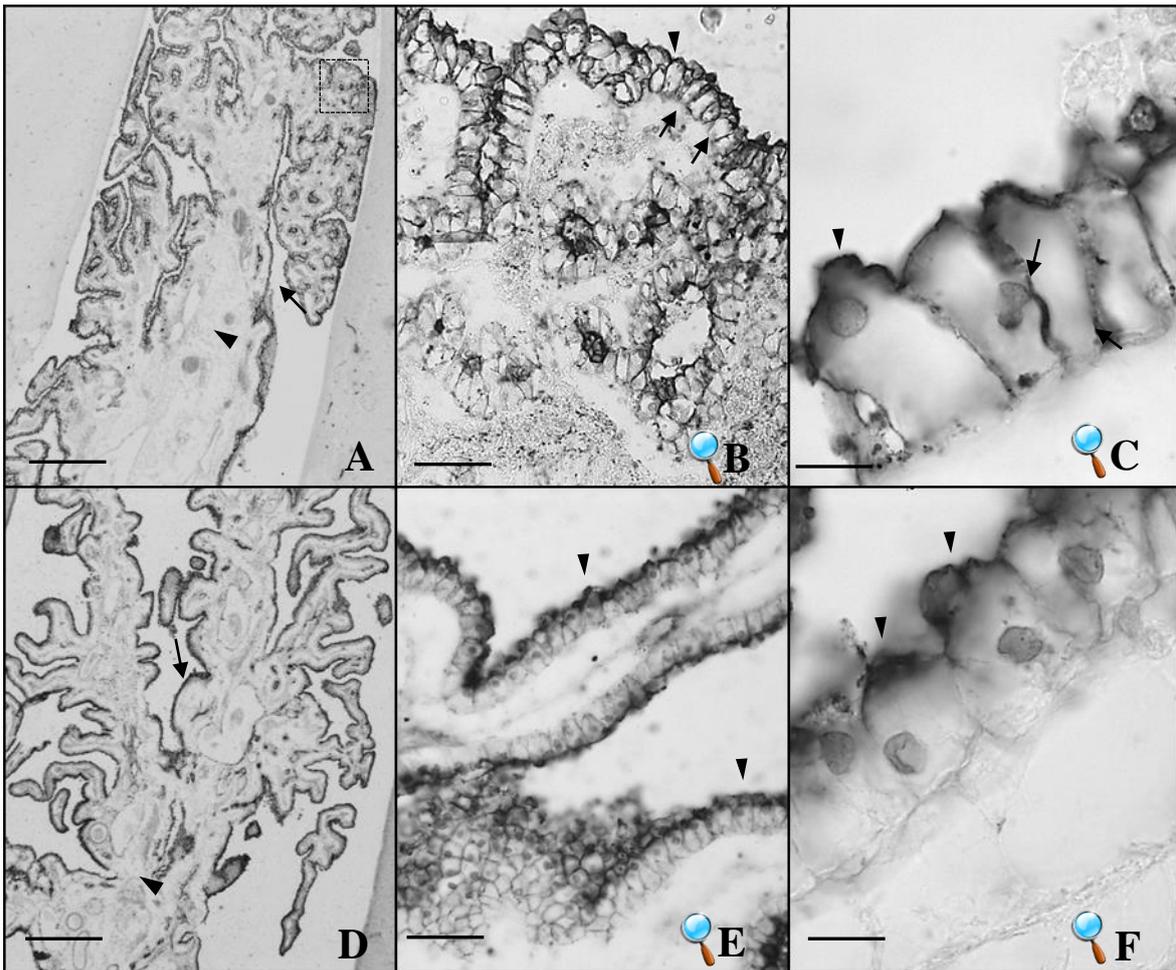
En la semana 20-21 del periodo gestacional **(Figura 11 A,B,C)**, se observa como la expresión de AQP1 es detectable no solo en la membrana apical de los plexos coroideos, sino también en la membrana basolateral alcanzando incluso, la zona basal. A esta edad gestacional las células son cilíndricas y se corresponden a la fase 2 del desarrollo de los plexos coroideos. Finalmente, sobre la 24-25 semana de gestación **(Figura 11 D,E,F)** la inmunoreactividad se polariza nuevamente hacia la zona apical, en unas células que son ahora escuamiformes correspondiendo con la fase 3 del desarrollo de los plexos. A su vez se destaca el incremento de repliegues coroidales, a lo largo de la gestación **(Figura 10,11)**

## **1.2 Expresión de AQP1 en condiciones patológicas (Hidrocefalia y Lisencefalia)**

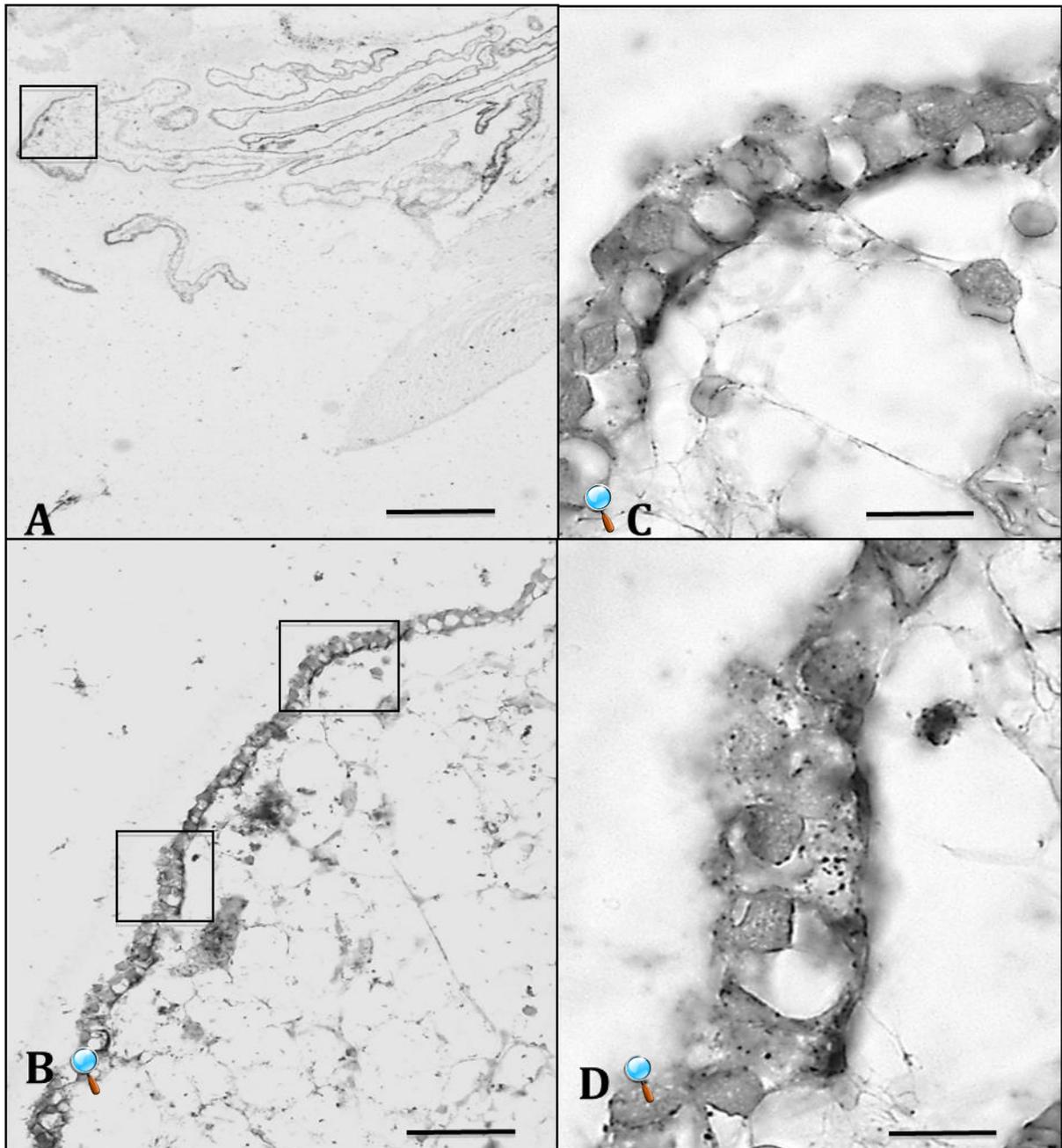
En la semana 24-25 del periodo gestacional en la hidrocefalia obstructiva, (**Figura 12 A,B,C,D**), se observa como la expresión de AQP1 ha cambiado su polaridad expresándose principalmente en la membrana basal de los plexos coroideos, además se observa, que este canal acuoso está marcando las células con un patrón típicamente vesicular (**Figura 12,C,D**). La lisencefalia tipo I presenta una ventriculomegalia comunicante y se observa el marcaje con AQP1 principalmente en el polo apical de las células del PC (**Figura 13 A,B,C,D**)



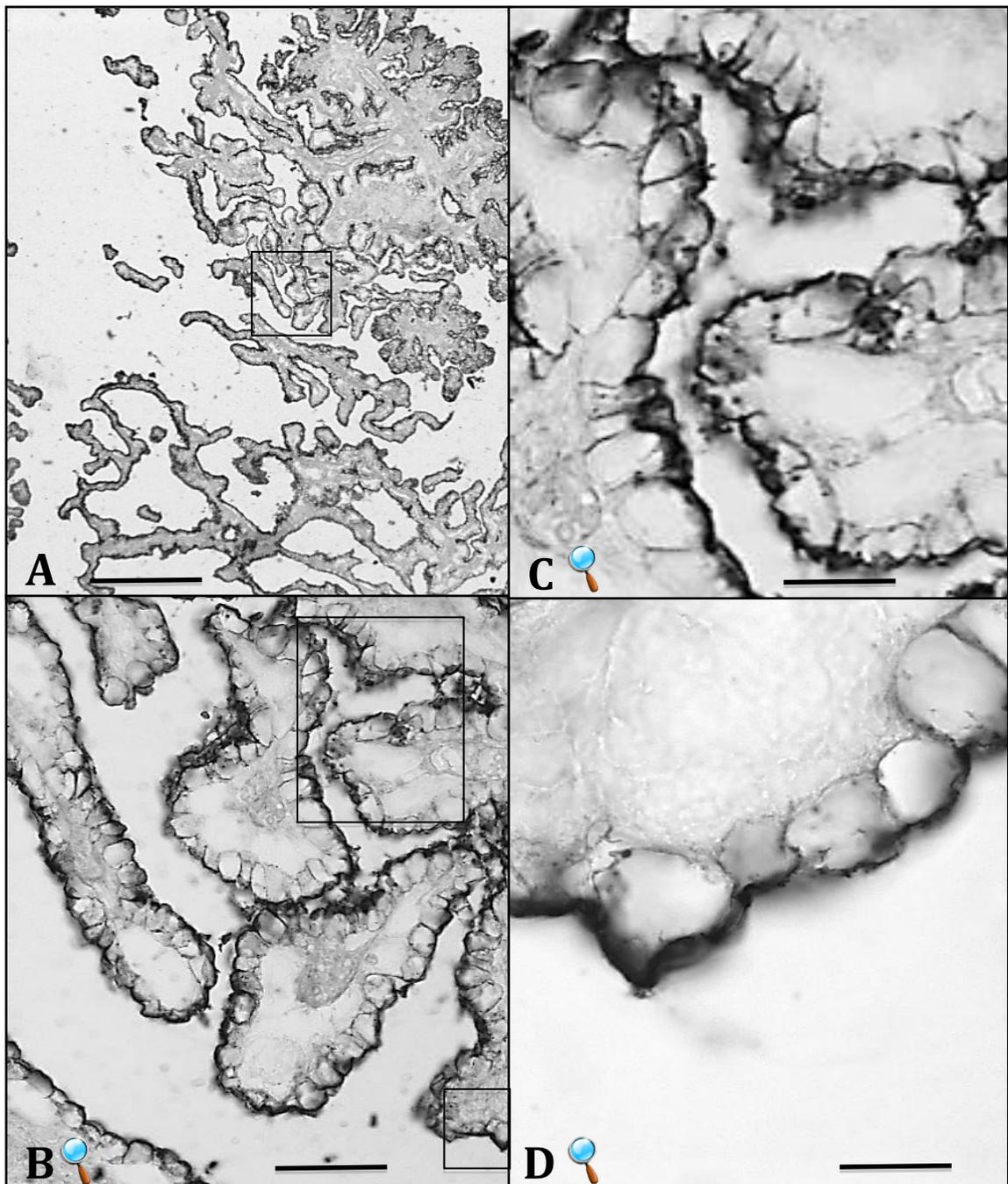
**Fig. 10 Inmunoreactividad anti-AQP1 a.** A; imagen panorámica de un corte coronal del inicio de la etapa fetal (8-9 semanas de gestación).B; ampliación del plexo coroideo en el foco inmunoreactivo (la flecha indica el foco), (\*,detalle del epitelio pseudoestratificado inmunoreactivo). C; imagen panorámica de un corte coronal a 10-11 semanas de gestación. E; Ampliación de los plexos coroideos inmunoreactivos, (las flechas indican la inmunoreactividad exclusivamente en el polo apical), (\*,detalle del epitelio monoestratificado de los plexos coroideos).D; Ampliación del tallo coroidal, donde la inmunoreactividad es negativa. GB= eminencia ganglionar, Hta= hipotálamo, Ta= eminencia talámica, VL= ventrículo lateral. 3V= tercer ventrículo. Barra: en A=800  $\mu$ m, en B=80  $\mu$ m , en B \*= 40  $\mu$ m en C=800  $\mu$ m, en D=160  $\mu$ m, E= 100  $\mu$ m, E\*= 50  $\mu$ m.



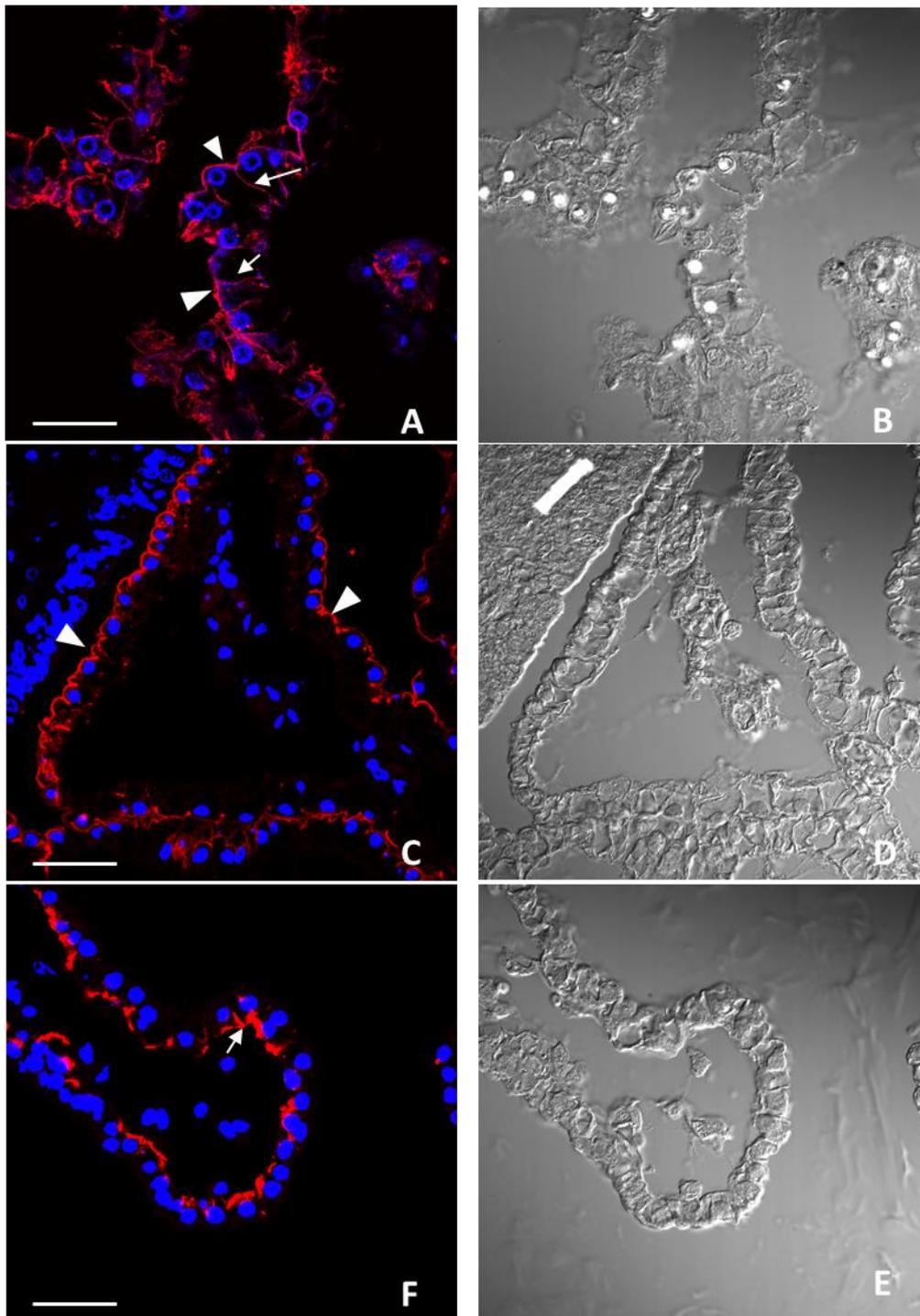
**Fig. 11 Inmunoreactividad anti-AQP1 b.** A; Imagen panorámica de la expresión de AQP1 a las 21 SG, se denota la alta especificidad del anticuerpo, marcando únicamente, el tejido coroidal. B y C; imágenes de los plexos coroides con mayor detalle a las 21 semanas de gestación. D; Imagen panorámica de la expresión de AQP1 a las 25 SG. E y F; imágenes de los plexos coroides con mayor detalle a las 25 semanas de gestación. (A y D las flechas indican los repliegues coroidales y las cabezas de flecha el tejido conectivo), (B,C,E y F las cabezas de flecha indican la expresión apical de la AQP1 y las flechas, la expresión basolateral o basal). Barra: en A=320  $\mu\text{m}$ , en B=60  $\mu\text{m}$ , en C= 20  $\mu\text{m}$  en D=320  $\mu\text{m}$ , en E=60  $\mu\text{m}$ , F= 20  $\mu\text{m}$ .



**Fig.12** Inmunoreactividad anti-AQP1 a las 24-25 SG en hidrocefalia obstructiva; A; imagen panorámica de la expresión de AQP1. B, detalle de A (recuadro) donde se observa el anticuerpo, marcando en citoplasma y polo basal; C y D; detalles de B donde se aprecia el marcaje con AQP1 en el en microvesículas en citoplasma polo basal. Barra: en A=400  $\mu$ m, en B=150  $\mu$ m , en C y D= 30  $\mu$ m.



**Fig.13** Inmunoreactividad anti-AQP1 a las 20-21 SG en Lisencefalia; A; imagen panorámica de la expresión de AQP1. B, detalle de A (recuadro) donde se observa el anticuerpo marcando polo apical; C y D; detalles de B donde se aprecia el marcaje con AQP1 en el alguna microveciculas en citoplasma y en el polo apical. Barra: en A=400  $\mu\text{m}$ , en B=150  $\mu\text{m}$ , en C y D= 30  $\mu\text{m}$ .



**Fig:14 Inmunofluorescencia de AQP1 en los plexos coroideos del ventrículo lateral.** A; expresión de la AQP1 en un caso control de 21 SG. B; contraste de fase de la imagen A. C; expresión de la AQP1 en un caso de Lisencefalia tipo 1. D; contraste de fase de la imagen C. E; expresión de la AQP1 en un caso de malformación de Arnold Chiari. F; contraste de fase de la imagen E. Las cabezas de flechas indican la expresión de AQP1 en la membrana apical, y las flechas en las membranas basales o baso-laterales, del epitelio de los PC. Barra: en A=30  $\mu\text{m}$ , en C y E=50  $\mu\text{m}$

### 1.2.1 AQP1 Inmunofluorescencia

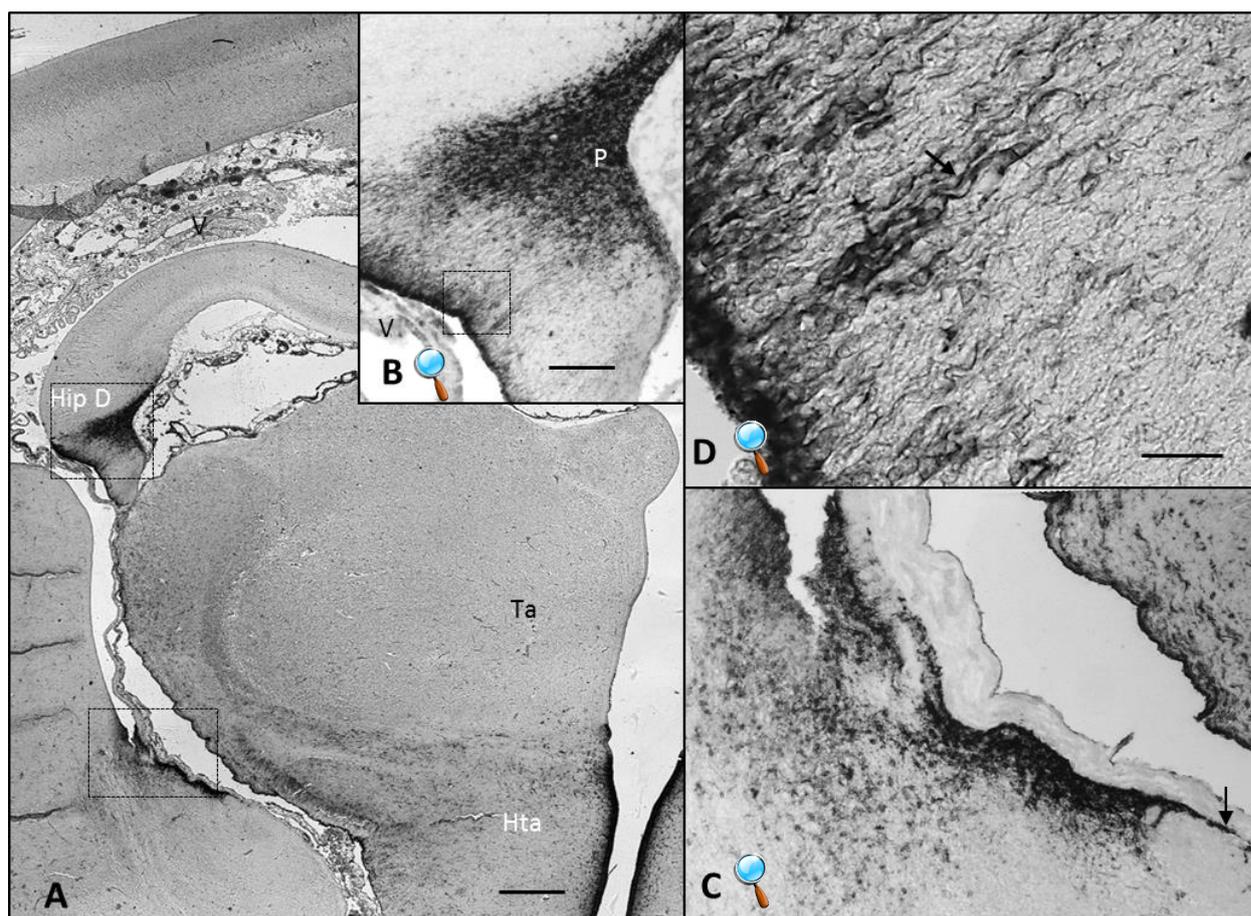
A las 21-22 semanas de gestación se observa en los casos controles (**Figura 14**), como la expresión de la AQP1 en los plexos coroideos de los ventrículos laterales, se encuentra tanto apicalmente, como en las membranas basolaterales, sin embargo en los casos de la lisencefalia tipo 1, se observa que la expresión de la AQP1 se encuentra específicamente en el polo apical del epitelio coroidal, contrariamente, cuando estudiamos su expresión en la malformación de Arnold Chiari, que presenta una hidrocefalia de tipo obstructivo, se observa como la expresión de la AQP1 cambió diametralmente su polaridad, invirtiéndose su expresión, y observándose en el polo basal del epitelio coroidal (**Figura 14**)

## 2. Expresión de la Acuaporina-4 en el desarrollo fetal Humano

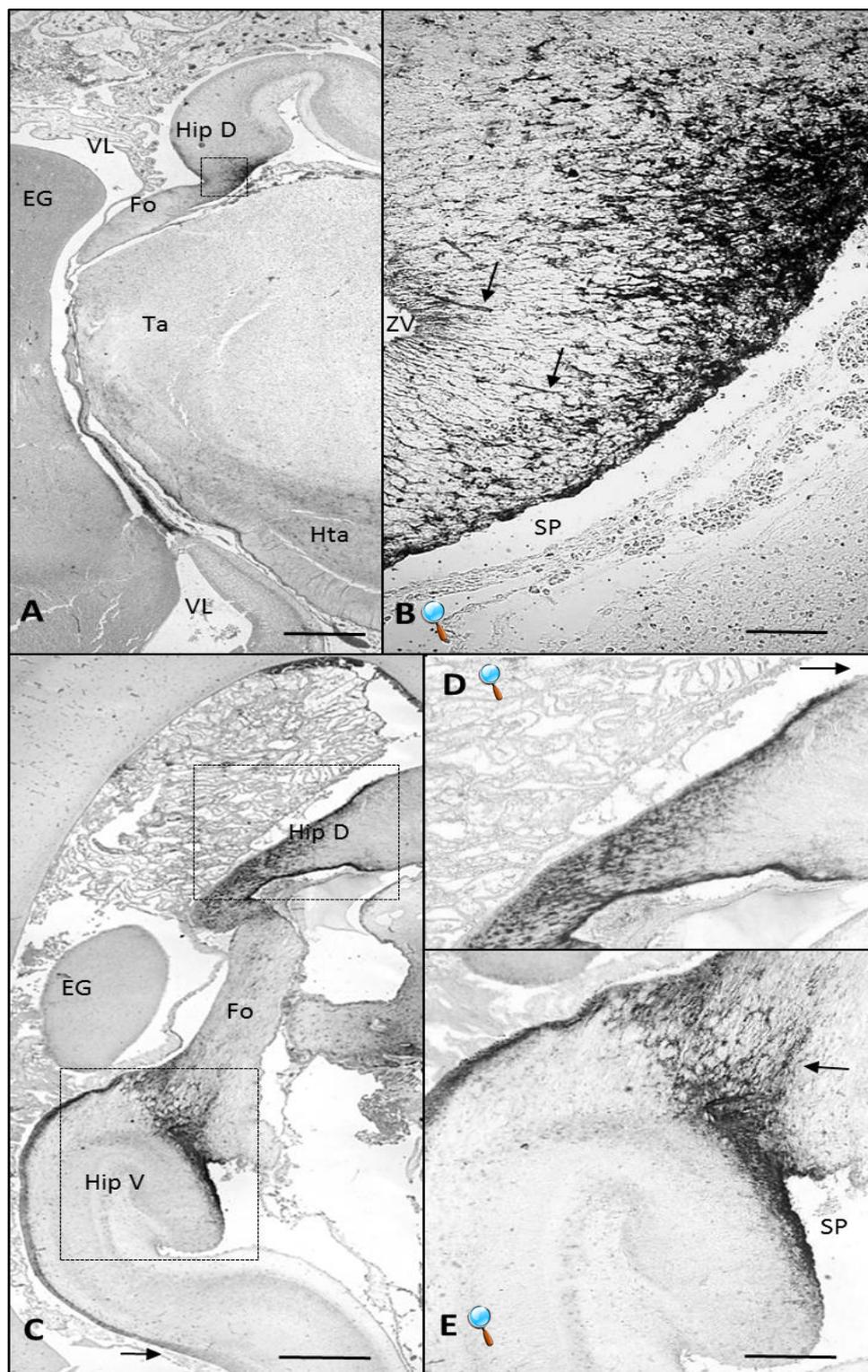
La expresión de la APQ4 se detecta por primera vez a las 12-13 semanas de gestación, observándose principalmente en el gliopitelio de la fimbria del hipocampo dorsal (**Figura 15**). En la superficie pial el marcaje es mucho más fuerte mientras que en la superficie ventricular no es tan intenso, cabe destacar la presencia de procesos radiales inmuno-teñidos que conectan la superficie apical (ventrículo) con la basal (Pía). A las 17 semanas de gestación, (**Figura 16. A,B,C**) se observa como el hipocampo dorsal (Hip D) ha comenzado su degeneración en aras de ser sustituido por las proyecciones nerviosas que darán lugar al cuerpo calloso, se observa un intenso marcaje en la totalidad del hipocampo dorsal. En la superficie apical se observa una propagación de la inmuno-tinción ocupando en este momento gestacional casi la totalidad de la cara medial del ventrículo lateral (ZV). En el hipocampo ventral (**Fig. 16 C,D,E**) (Hip V) también se observa un intenso marcaje tanto en la superficie apical como basal sin embargo los procesos radiales que se habían observado en el hipocampo dorsal, se presentan, en el hip V siguiendo longitudinalmente las fibras del fornix (Fo).

A las 20-21 semanas de gestación (**Figura 17**), se observa como la expresión de la AQP4 ha alcanzado todo el fórnix (Fo). (**Figura 17 A**) El cuerpo calloso es intensamente inmunorreactivo en la zona ventricular, progresando hacia el techo del ventrículo lateral por la zona subventricular. También se aprecian procesos que penetran dentro de las fibras del cuerpo calloso (CC) , sin atravesarlo. La

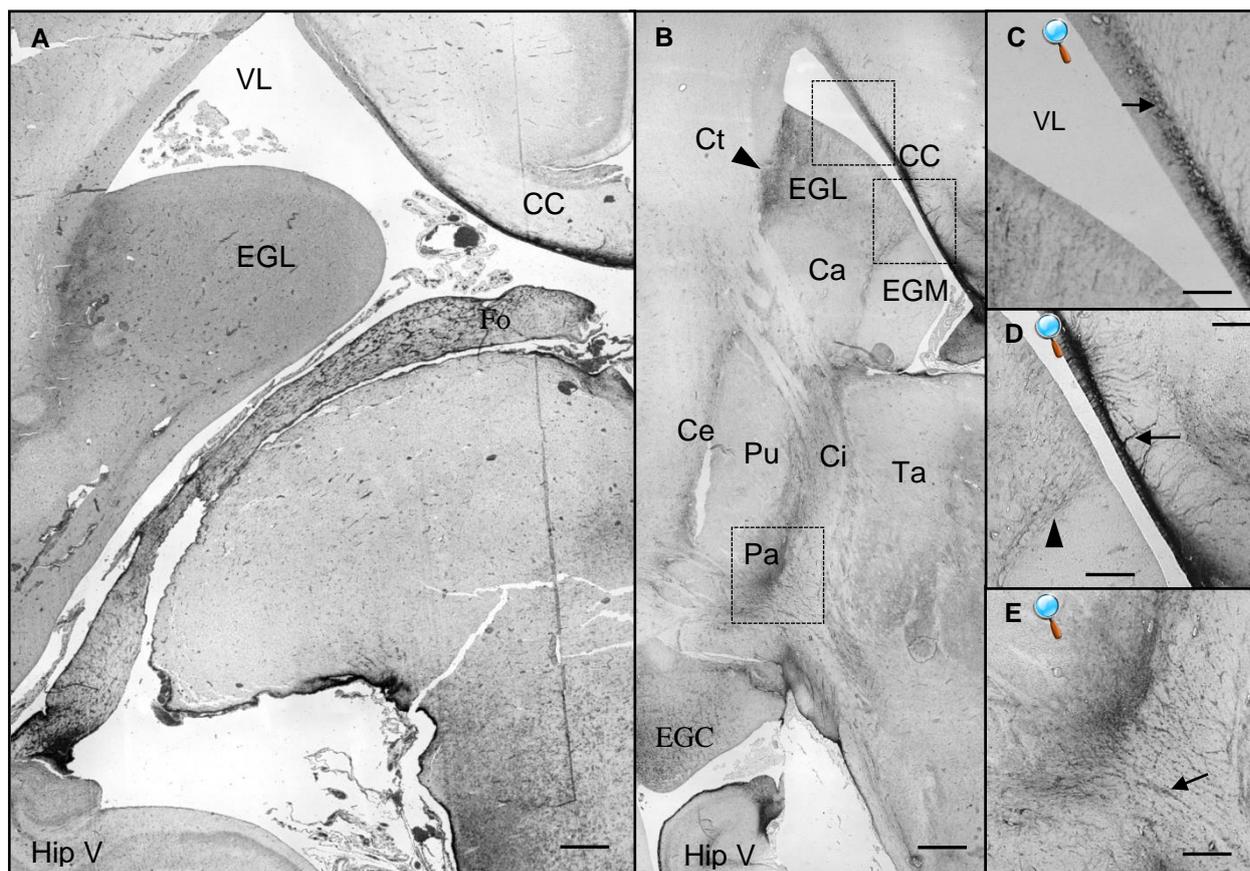
inmunoreactividad es muy selectiva para las eminencias ganglionares laterales y caudales (EGL, EGM) definiéndose, en este periodo gestacional, un límite anatómico entre estas eminencias y las estructuras telencefálicas que los circundan; eminencia ganglionar medial (EGM), la corteza telencefálica (Ct) y el caudado (Ca). El Putamen (Pu), es también inmunoreactivo en las zonas adyacentes a la capsula externa (Ce), el pálido se define marcadamente, observándose procesos celulares proyectados hacia las fibras nerviosas capsulares.



**Figura 15: la inmunoreactividad anti-AQP4 en la arquicorteza a las 12-13 SG.** A; imagen panorámica de un corte coronal de un cerebro a las 12-13 SG. B; ampliación del hipocampo dorsal. C; Ampliación de la zona donde se desarrollará el hipocampo ventral (la flecha señala el límite neuroepitelial ventral inmunoreactivo). D; segunda ampliación del hipocampo dorsal (las flechas indican los procesos radiales inmunoreactivos). HipD= hipocampo dorsal; Hta= hipotálamo; P= pia; Ta= talamo; V= ventrículo. Barra: en A=500  $\mu$ m, en B=250  $\mu$ m, en C=60  $\mu$ m y en D=30  $\mu$ m

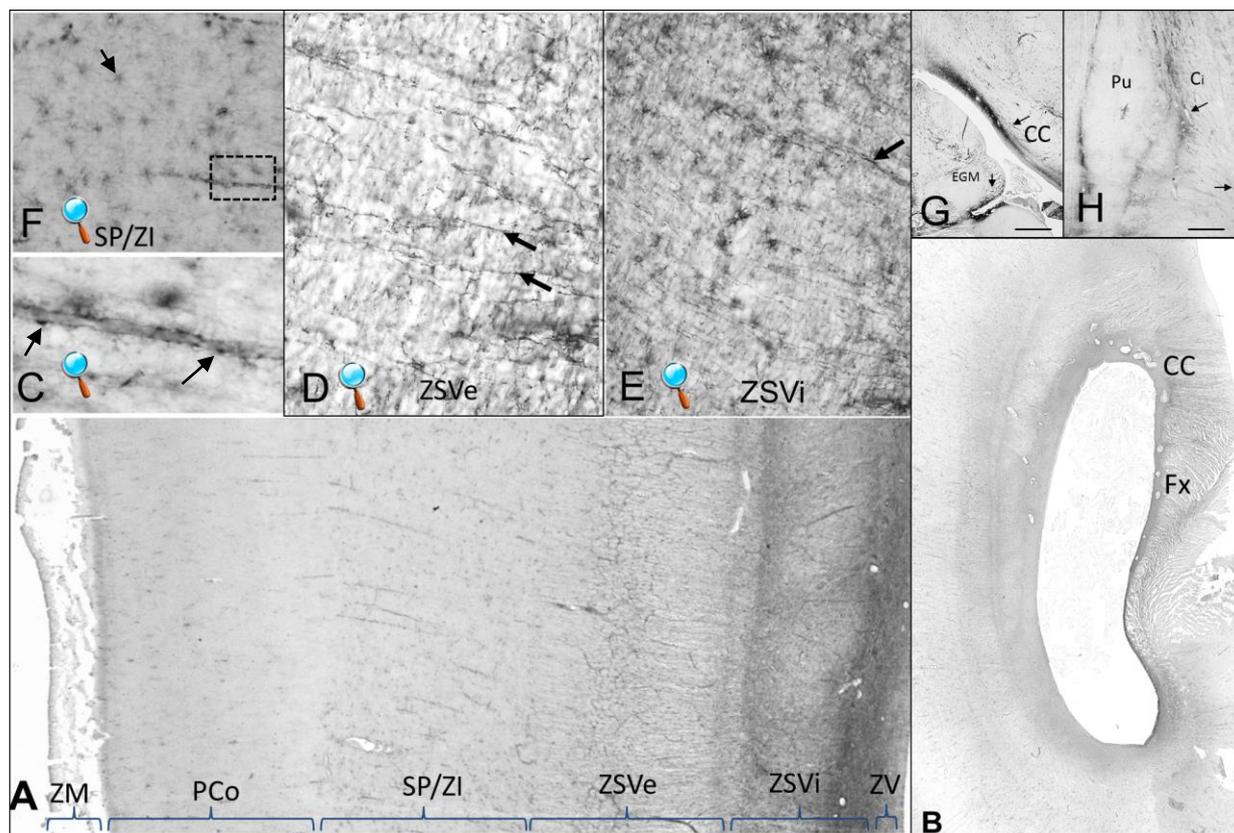


**Fig 16: la inmunorreactividad anti-AQP4 en la arquicorteza a las 15 y 17 SG.** A; imagen panorámica de un corte coronal de un cerebro a las 15 SG. B; ampliación del hipocampo dorsal. (las flechas indican los procesos radiales inmunorreactivos). C; imagen panorámica de un corte coronal de un cerebro fetal a las 17 SG (la flecha señala el límite neuroepitelial ventral inmunorreactivo). D; ampliación del hipocampo dorsal (la flecha indica el límite neuroepitelial dorsal inmunorreactivo). E; ampliación del hipocampo ventral (la flecha indica los procesos longitudinales inmunorreactivos) EG= eminencia ganglionar; Fo= fornix; HipD= hipocampo dorsal; HipV= hipocampo ventral; Hta= hipotálamo; SP= superficie pial; Ta= talamo; VL= ventrículo lateral; ZV= zona ventricular. Barra: en A=600  $\mu$ m, en B=70  $\mu$ m, en C=600  $\mu$ m y en D y E=300  $\mu$ m .



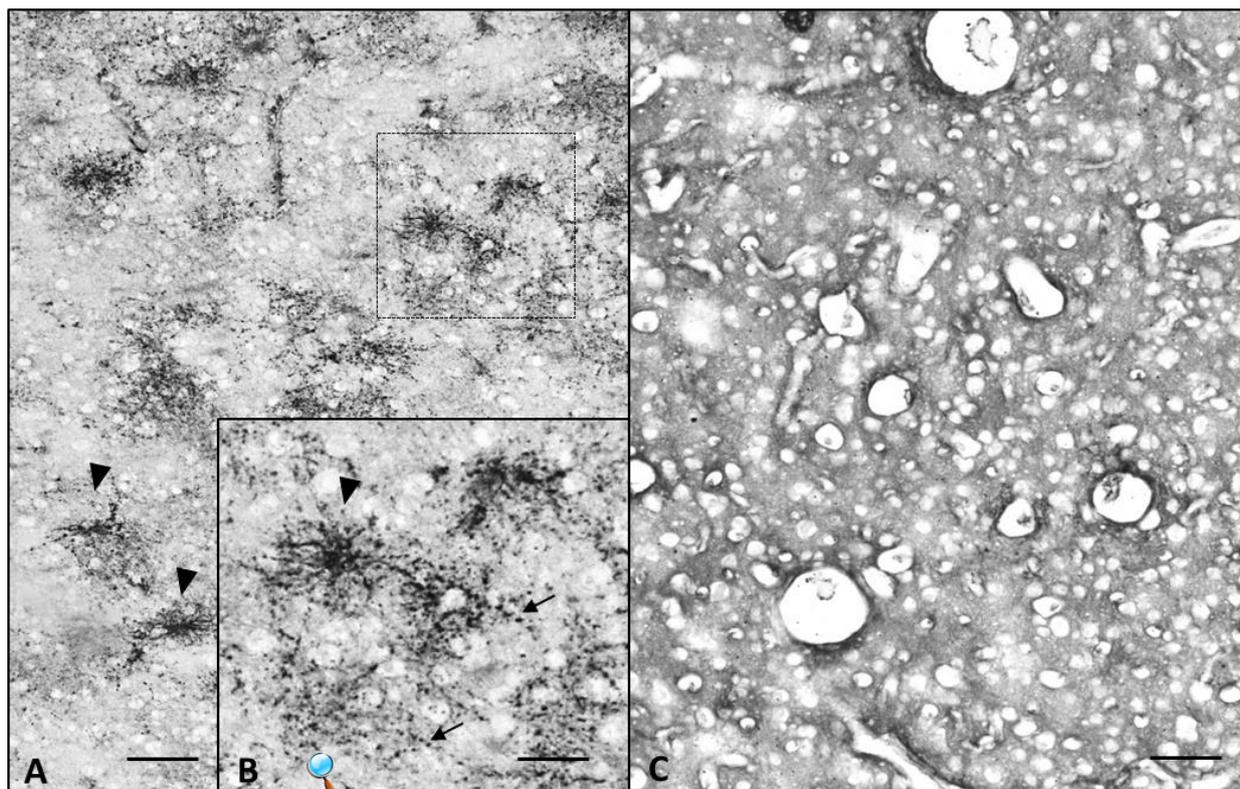
**Fig. 17: Inmunoreactividad anti-AQP4 a las 20-21 semanas de gestación.** A; Panorámica de un corte coronal de 20 SG. B; Panorámica de un corte coronal de 21 SG. (La cabeza de flecha indica el límite entre el ganglio basal lateral y la corteza). C; Ampliación del cuerpo calloso. (La flecha indica un marcaje específico de la zona subventricular que va disminuyendo de dorsomedial a dorsolateral). D; Ampliación del cuerpo calloso y ganglios basales. (La flecha indica los procesos celulares que penetran dentro del cuerpo calloso, la cabeza de flecha indica el límite definido por la expresión de AQP4 entre el ganglio basal lateral y medial). E; Ampliación de la zona ventromedial del globus pallidus y la cápsula interna. (La flecha señala un proceso penetrando hacia las fibras capsulares). Ca= caudado; CC= cuerpo calloso; Ce= capsula externa; Ci= capsula interna; Ct= corteza telencefálica; EGC= eminencia ganglionar caudal; EGL= eminencia ganglionar lateral; EGM= eminencia ganglionar medial; Fo= fornix; HipD= hipocampo dorsal; HipV= hipocampo ventral; Pa= palido; Pu=putamen; SP= superficie pial; Ta= talamo; VL= ventrículo lateral; ZV= zona ventricular. Barra: en A=250, en B= 250, en C,D y E =90  $\mu$ m.

A las 25 semanas de gestación (**Figura 18**) se observa como la eminencia ganglionar medial (EGM) es ahora inmunorreactiva, y tanto en el cuerpo calloso (CC) como en la capsula interna (CI) se continúan observando los procesos celulares inmunorreactivos, Por otro lado es, en este momento gestacional donde los procesos no son solo observables en los principales tractos nerviosos, sino que son detectables por primera vez, en la neocorteza tanto en forma de procesos radiales, como marcando fibroastrocitos. **Figura 18**



**Fig. 18: Inmunoreactividad anti-AQP4 a las 25 semanas de gestación.** A; Imagen de un corte coronal de la neocorteza parieto-occipital lateral de 25 SG. B; imagen panorámica de un corte coronal de la zona parietooccipital de un cerebro de 25 SG, C y F; Ampliación de la zona intermedia, donde se observa que los astrocitos son en este momento, inmunoreactivos para AQP4, aunque presentan un marcaje difuso. (Las flechas señalan los astrocitos) también se observa un detalle de un vaso de la ZI circundado por pies de astrocitos inmunoreactivos para AQP4 (Las flechas señalan los pies de los astrocitos) D y E; Ampliación de la zona subventricular interna y externa de la neocorteza parietooccipital lateral, (las flechas indican los procesos radiales inmunoreactivos). G; imagen de un corte coronal donde se observan las eminencias ganglionares y el cuerpo calloso (las flechas indican procesos inmunoreactivos). H imagen del núcleo lenticular (putamen más globus pallidus) (Las flechas indican los procesos celulares dirigiéndose hacia la capsula interna) Ca= caudado; CC= cuerpo calloso; Ci= capsula interna; EGL= eminencia ganglionar lateral; EGM= eminencia ganglionar medial; Pa= palido; PCo= placa cortical; Pu=putamen; VL= ventrículo lateral; Zi= zona intermedia (subplaca); ZSVe= zona subventricular externa; ZSVi= zona subventricular interna; ZV= zona ventricular. Barra: en A y B= 320  $\mu$ m, en C=80  $\mu$ m, en D= 40  $\mu$ m, F=500  $\mu$ m, en E=160  $\mu$ m.

En el adulto (34 años) **Figura 19**, se observa la inmunorreactividad principalmente en los pies de los astrocitos de la sustancia blanca, existiendo una inmunorreactividad difusa, a modo de punteado (**Figura 19 A,B**). Por otro lado es prácticamente indetectable en la sustancia gris (**Figura 19 C**).



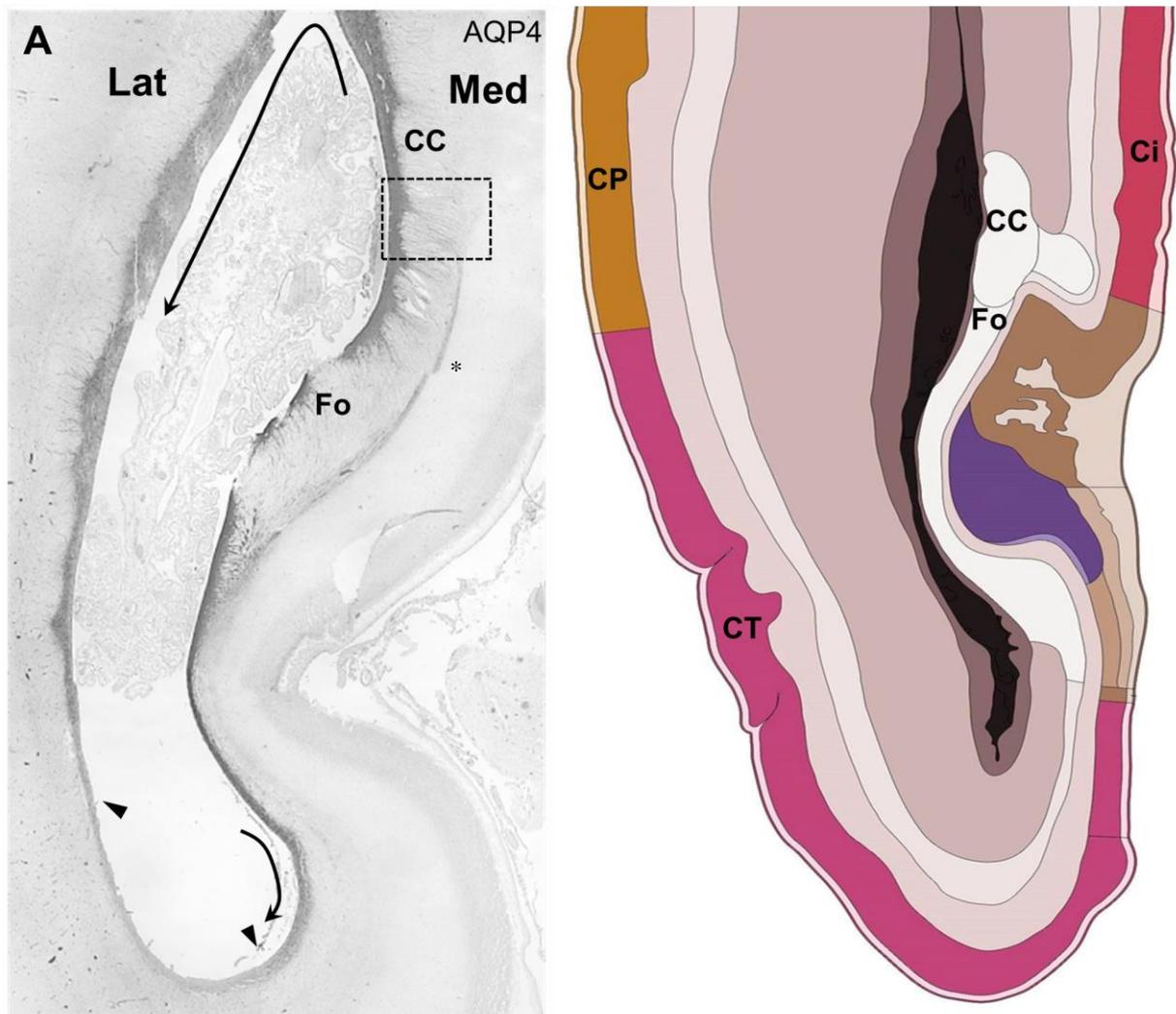
**Fig. 18: Inmunoreactividad anti-AQP4 en el adulto 34 años.** A; Imagen de un corte coronal de la sustancia blanca de la neocorteza parieto-occipital. B; Ampliación donde se observan los astrocitos a mayor detalle. C; Imagen de la sustancia gris de la neocorteza parieto-occipital. (Las cabezas de flecha señalan los astrocitos mientras que las flechas los pies de los mismos) Barra: en A=80  $\mu$ m, en B= 40  $\mu$ m, en C=40  $\mu$ m.

### 3 AQP4 y su vinculación glial

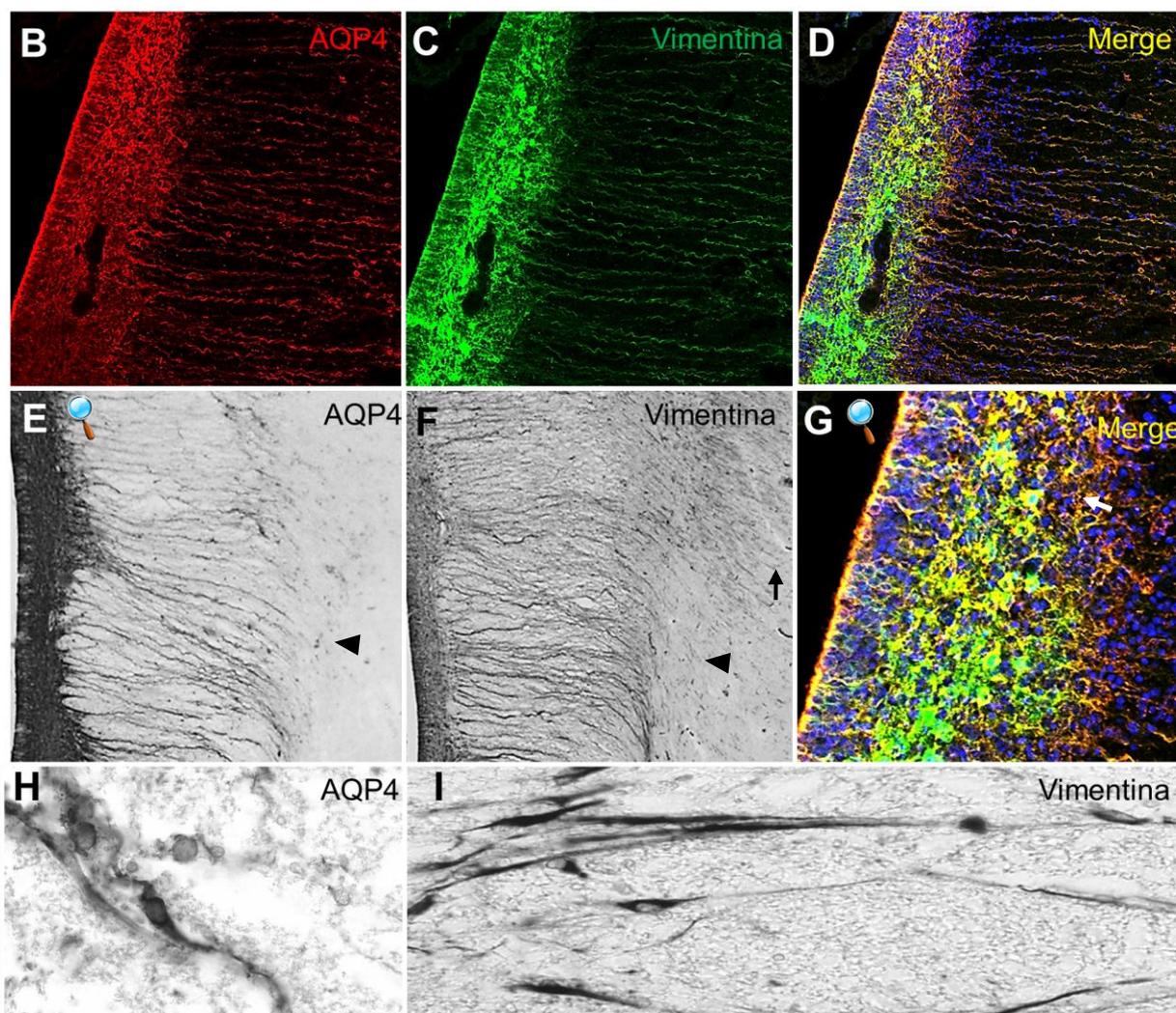
#### 3.1 AQP4 y vimentina

A las 21 semanas de gestación, La AQP4 se expresa asociada a los grandes tractos nerviosos y en la zona ventricular y subventricular, **Figura 20 a y b**. En estos tractos, el fórnix y el cuerpo calloso las células que expresan AQP4 presentan un gran proceso radial, el cual, en el fórnix se incurva siguiendo las fibras nerviosas de este tracto. En las zonas ventriculares y subventriculares, de las regiones próximas a los grandes tractos, observamos que existe colocalización entre AQP4 y vimentina donde el 100% de la AQP4 colocaliza con la Vimentina en los procesos celulares (**Figura 20 b. B,C y D**). Sin embargo en la zona subventricular existen numerosas células que son vimentina positiva y no presentan inmunorreactividad para AQP4, en cuanto al neuroepitelio, pasa lo

contrario está completamente marcado con AQP4 y existen zonas que no son vimentina positiva.



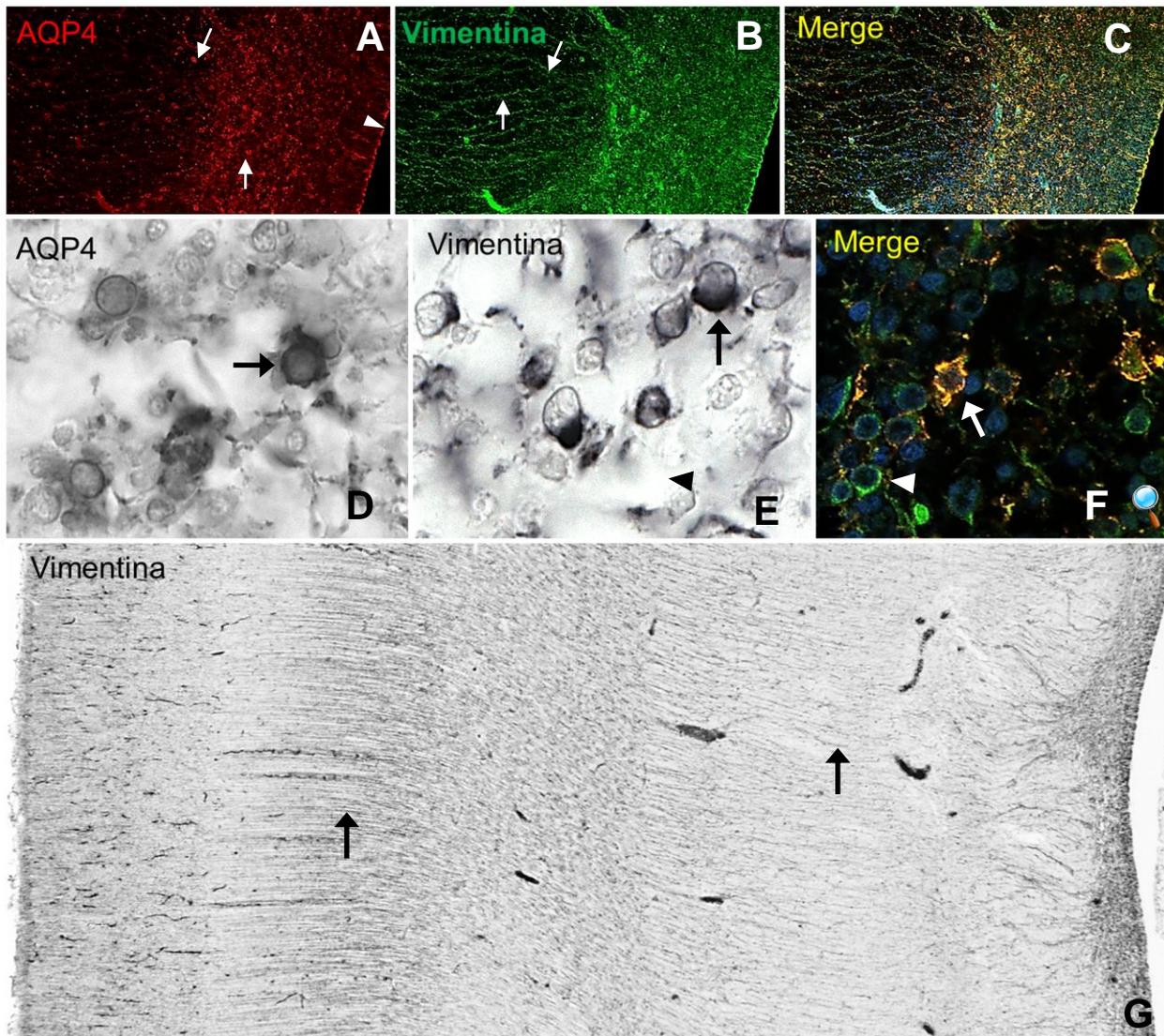
**Fig 20a A;** Imagen panorámica de la expresión de AQP4 en un corte coronal de un cerebro a las 21SG comparado con el atlas. (las flechas indican la dirección de avance de la expresión de AQP4, mientras que la cabeza de flecha representa el frente de dicha expresión, el asterizco indica el límite fórnico-cortical donde los procesos celulares se incurvan siguiendo las fibras del fornix). cc= cuerpo calloso, Fo= fórnix, VL= ventrículo lateral. Barra: en A=500  $\mu$ m



**Fig 20b: AQP4 y vimentina.** B; Inmunofluorescencia anti-AQP4. C; Inmunofluorescencia anti-Vimentina D; Merge entre B y C. E ampliación de A (Fig 20 a) F; Amplificación de la misma zona rectangular marcada en A pero inmunoteñida con vimentina. (cabeza de flecha indica el límite fórnico-cortical, la flecha indica procesos celulares marcados con vimentina en zonas extraforneales). G; ampliación de D ( La flecha indica la ecolocalización entre AQP4 y vimentina en una célula específica) H e I son detalles que están marcando células con morfología de glía radial basal tanto con AQP4 como con vimentina, en B,C,D,E,F = 160  $\mu$ m y en G= 80  $\mu$ m.

En la zona parietooccipital lateral **Figura 21 A,D.** encontramos que, hay células positivas para AQP4, pero todavía no se observan los procesos radiales asociados, sin embargo la vimentina si es inmunodetectada, marcando dichos procesos radiales. Se observa también que la vimentina marca la totalidad del neuroepitelio mientras que la AQP4 no es reactiva de manera continuada a lo largo del mismo (**Figura 21 A,B.**) En la zona subventricular se observa la colocalización de numerosas células indiferenciadas, con morfología de progenitores intermedios que son vimentina y AQP4 positivas **Figura 21 C,F,**

donde prácticamente el 100 por ciento de la AQP4, colocaliza con vimentina, sin embargo se observan células vimentina positiva que no son para AQP4)



**Fig 21: AQP4 y vimentina en la corteza parietooccipital lateral 21 SG.** A; Inmunofluorescencia anti-AQP4 (la flecha indica la inmunodetección de AQP4 en células de la zona subventricular, mientras que la cabeza de flecha indica la discontinuidad del neuroepitelio) B; Inmunofluorescencia anti-Viementina, las flechas indican los procesos radiales vimentina positiva). C; Merge entre A y B. D; Detalle de la expresión de AQP4 en células con morfología de progenitor intermedio. E; detalle de células vimentina positiva, (las flechas indican una célula indiferenciada de carácter progenitor) F; ampliación de C (La flecha indica una célula AQP4 positiva que colocaliza con viementina y la cabeza de flecha una célula solo viementina positiva) G visión global de la inmunoreactividad anti-viementina de la corteza parietooccipital lateral. (las flechas señalan los procesos celulares radiales, la glia radial). Barra: en A,B,C y F = 100 μm y en E y D= 40 μm.

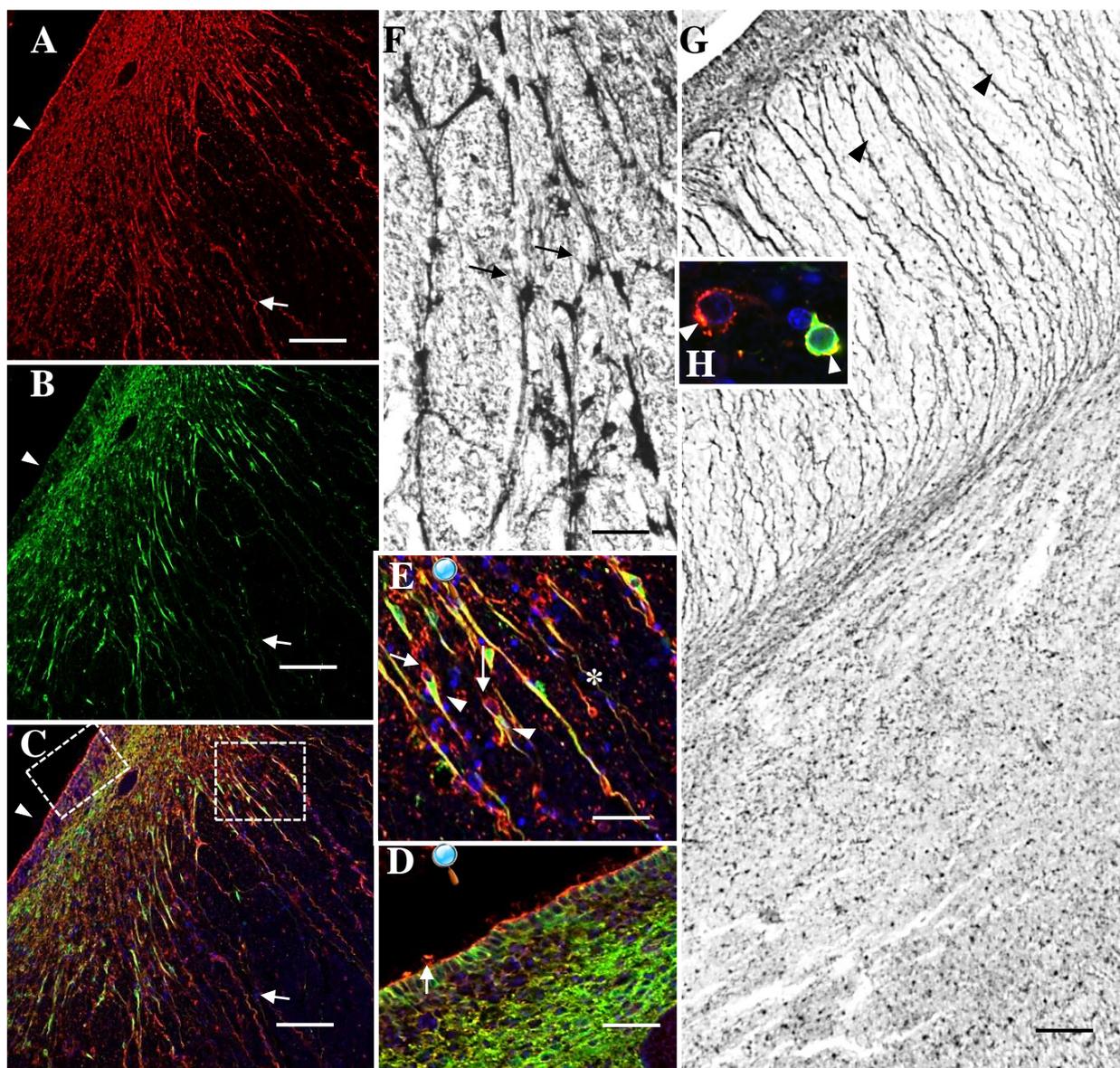
### 3.2. AQP4 y GFAP

La expresión de GFAP (**Figura 22**) en la zona parietooccipital medial es muy similar a la de vimentina, salvo que inmunodetecta también células diferenciadas de carácter glial (**Figura 22 F**). Tanto AQP4 como GFAP están marcando células correspondientes a progenitores intermedios y como a glía radial basal. Mediante microscopía confocal se observa la existencia de colocación entre AQP4 y GFAP en los procesos radiales (**Figura 22 A,B**) sin embargo, si nos centramos en el neuroepitelio se distingue claramente la ausencia de GFAP en el polo apical de estas células, expresándose únicamente AQP4 (**Figura 22 C,D**). En las membranas basolaterales domina la presencia de GFAP aunque también se observa colocándose con AQP4.

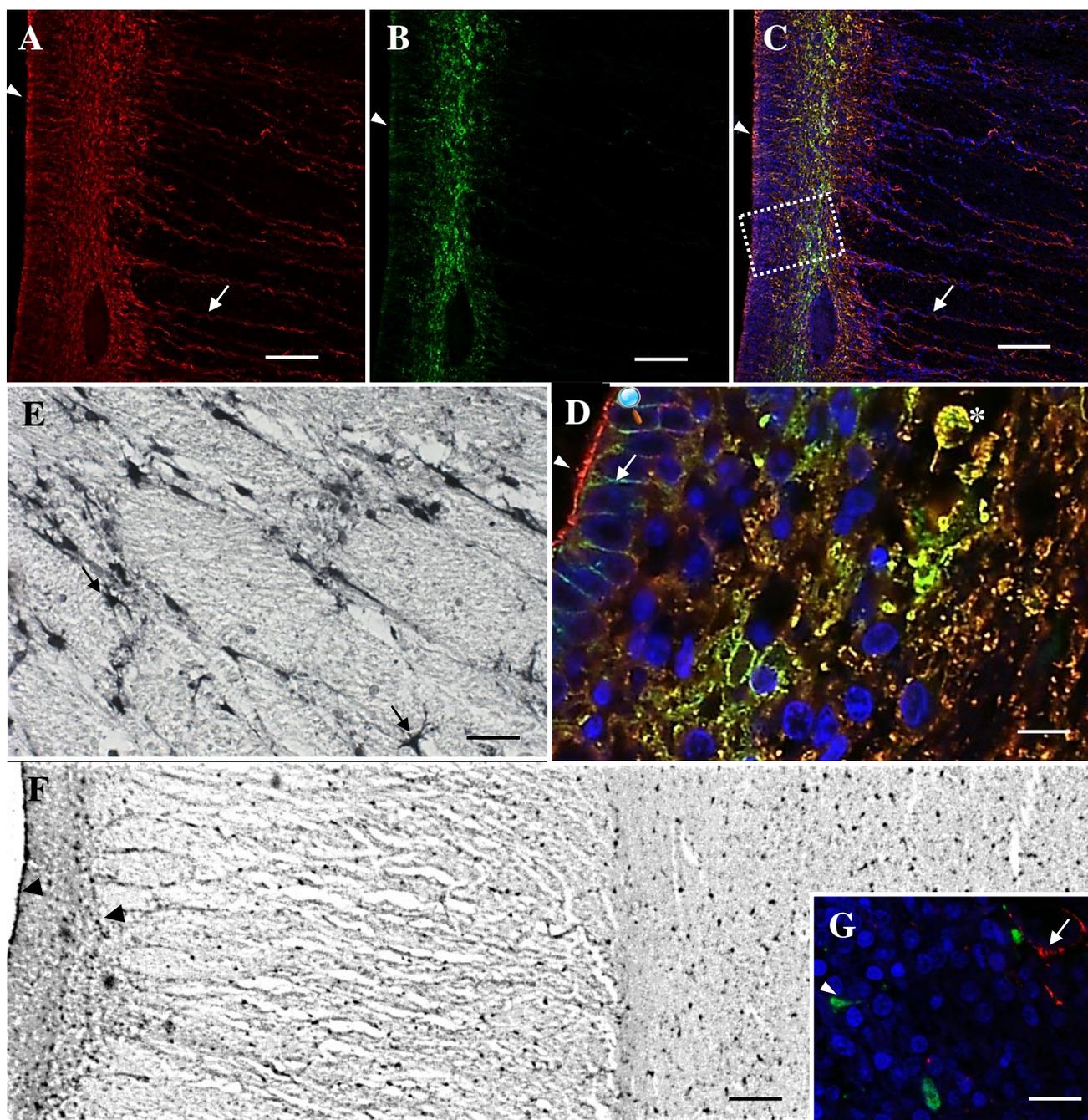
En la zona subventricular cerca del fornix (**Figura 22 F**) encontramos células AQP4 positivas, frente a otras donde están colocándose tanto AQP4 y GFAP (**Figura 22 E,F**), además se distinguen células que son AQP4 positivas y presentan un polo donde existe colocación con GFAP (**Figura 22 E,H**), principalmente hacia donde se está desarrollando el proceso celular, que no solo es proyectado basalmente sino que se observa también apicalmente.

### 3.3 AQP4 y S100

La expresión de S100 (**Figura 23 B,C,F,G**) es observable por casi toda la corteza. En la zona del fornix se observan células bien diferenciadas como astrocitos, mientras que en las zonas corticales periféricas no se observan tan bien diferenciados, vemos que las células que son S100 positivo no presentan procesos radiales. No presenta colocación ni en el neuroepitelio, ni en la corteza periférica, donde la AQP4 (**Figura 23 A,C,D**) marca algunas células y vasos, aunque si lo hace en la zona subventricular interna.



**Fig 22: AQP4 y GFAP en la corteza parietooccipital medial 21 SG.** A; Inmunofluorescencia anti-AQP4 (la flecha indica la inmunodetección de AQP4 en los procesos celulares, mientras que la cabeza de flecha indica la inmunodetección de AQP4 en el polo apical del neuroepitelio) B; Inmunofluorescencia anti-GFAP, la flecha indica un proceso radial GFAP positivo, la cabeza de flecha indica la ausencia de GFAP en el polo apical del neuroepitelio). C; Merge entre A y B (la flecha indica la ecolocalización en los procesos celulares, mientras que la cabeza de flecha indica la inmunodetección de AQP4 en el polo apical del neuroepitelio). D; ampliación del neuroepitelio de C (La flecha indica la inmunotinción GFAP positiva de las paredes basolaterales del neuroepitelio) E; ampliación de C, se observan numerosas células con morfología de glia radial basal, (las flechas indican cuerpos celulares AQP4 positivos, que sin colocalizar con GFAP presentan procesos celulares que si lo hacen. Las cabezas de flecha indican los procesos celulares que colocalizan. El asterizco indica una célula con morfología de glia radial basal emitiendo un proceso celular hacia la zona apical). F Detalle de la zona subventricular cerca del fornix inmunoteñida con anti-GFAP (las flechas indica células diferenciadas como astrocitos) visión global de la inmunoreactividad anti-GFAP de la corteza parietooccipital medial. (las cabezas de flecha señalan los procesos celulares radiales, y las flechas células gliales diferenciadas) H; Detalle de inmunofluorescencia doble (Las cabezas de flecha indica colocalización entre AQP4 y GFAP). Barra: en A, B y C = 200  $\mu$ m, en D, E y F = 40  $\mu$ m y en G = 100  $\mu$ m



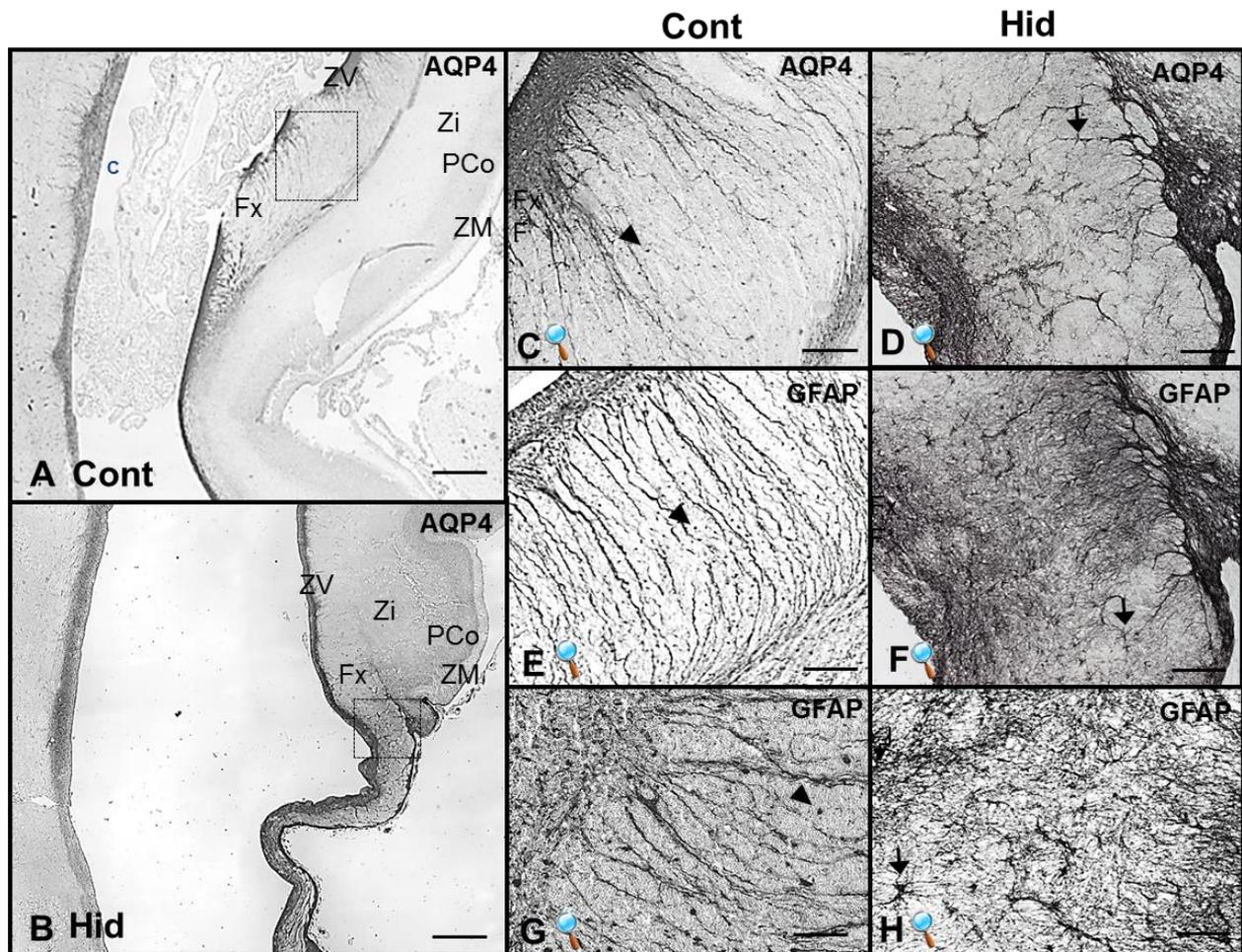
**Fig 23: AQP4 y S-100B en la corteza parietooccipital medial 21 SG.** A; Inmunofluorescencia anti-AQP4 (la flecha indica la inmunodetección de AQP4 en los procesos celulares, mientras que la cabeza de flecha indica la inmunodetección de AQP4 en el polo apical del neuroepitelio) B; Inmunofluorescencia anti-S100, la cabeza de flecha indica la ausencia de S100 en el polo apical del neuroepitelio). C; Merge entre A y B (la flecha indica la localización en los procesos celulares, mientras que la cabeza de flecha indica la inmunodetección de AQP4 en el polo apical del neuroepitelio). D; ampliación del neuroepitelio de C (La flecha indica la inmunotinción S100 positiva en las membranas basolaterales del neuroepitelio, el asterisco indica una de las pocas células donde AQP4 y S100 colocalizan) F; visión panorámica de la corteza parietooccipital medial, donde se observa la ausencia de procesos radiales. G; ampliación de F, con inmunotinción S100. Corregir Barra: en A,B y C = 80  $\mu$ m, en D= 20  $\mu$ m E= 40  $\mu$ m, F = 100  $\mu$ m y en G = 40  $\mu$ m

## **4. AQP4 Hidrocefalia**

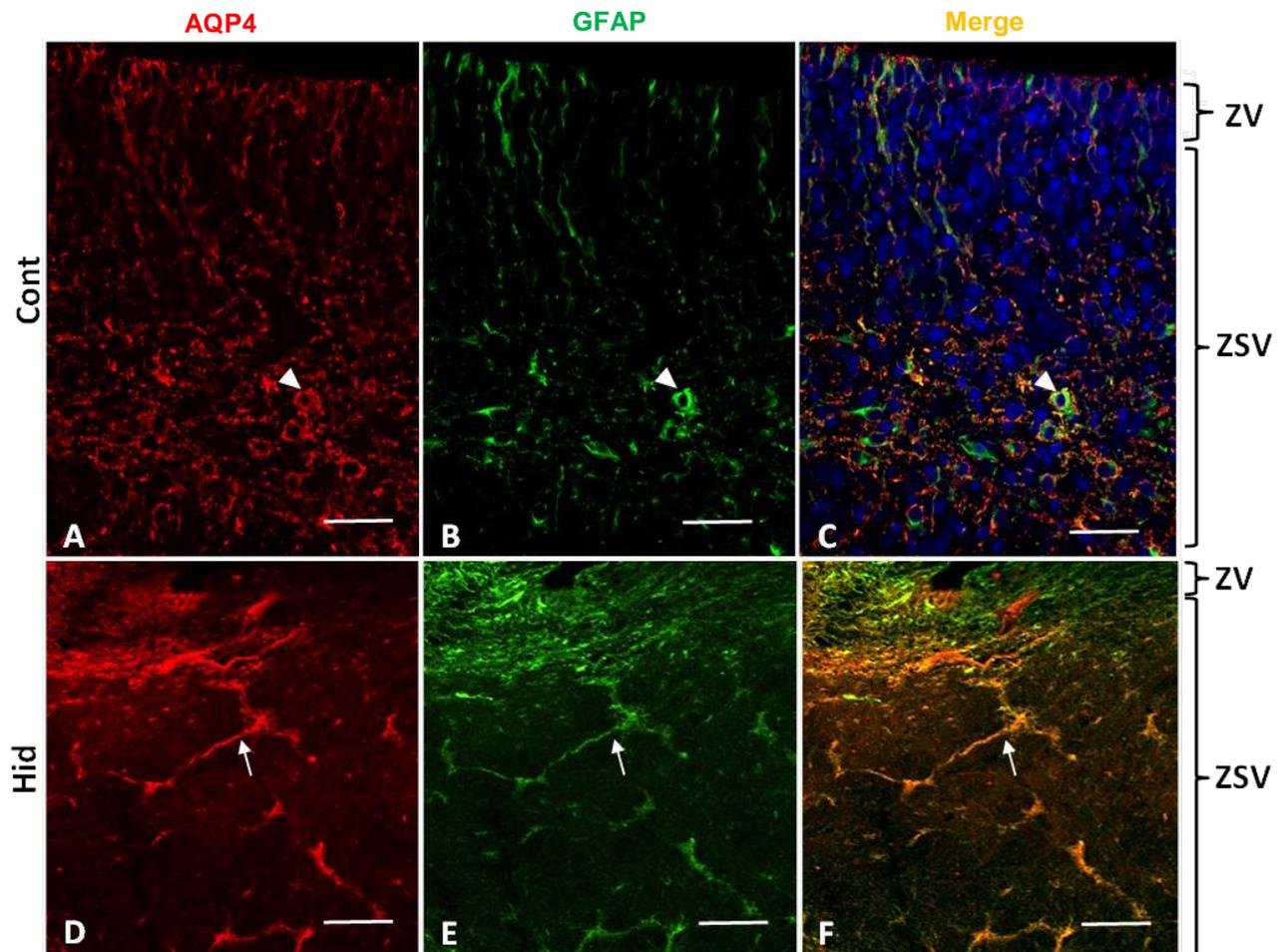
### **4.1 Activación glial y disrupción endimaria**

En los sujetos hidrocefálicos, a las 21 semanas de gestación, en la zona parieto-occipital, adyacente al Fórnix, encontramos una alta actividad astrocitaria, que morfológicamente recuerda a la glía activada, comparando la misma zona en el mismo momento gestacional en casos no patológicos se observa que dicha actividad astrocitaria no está presente. Por otro lado se ha de resaltar la gran reducción de la corteza que circunda al fornix en los fetos hidrocefálicos (**Figura 24**).

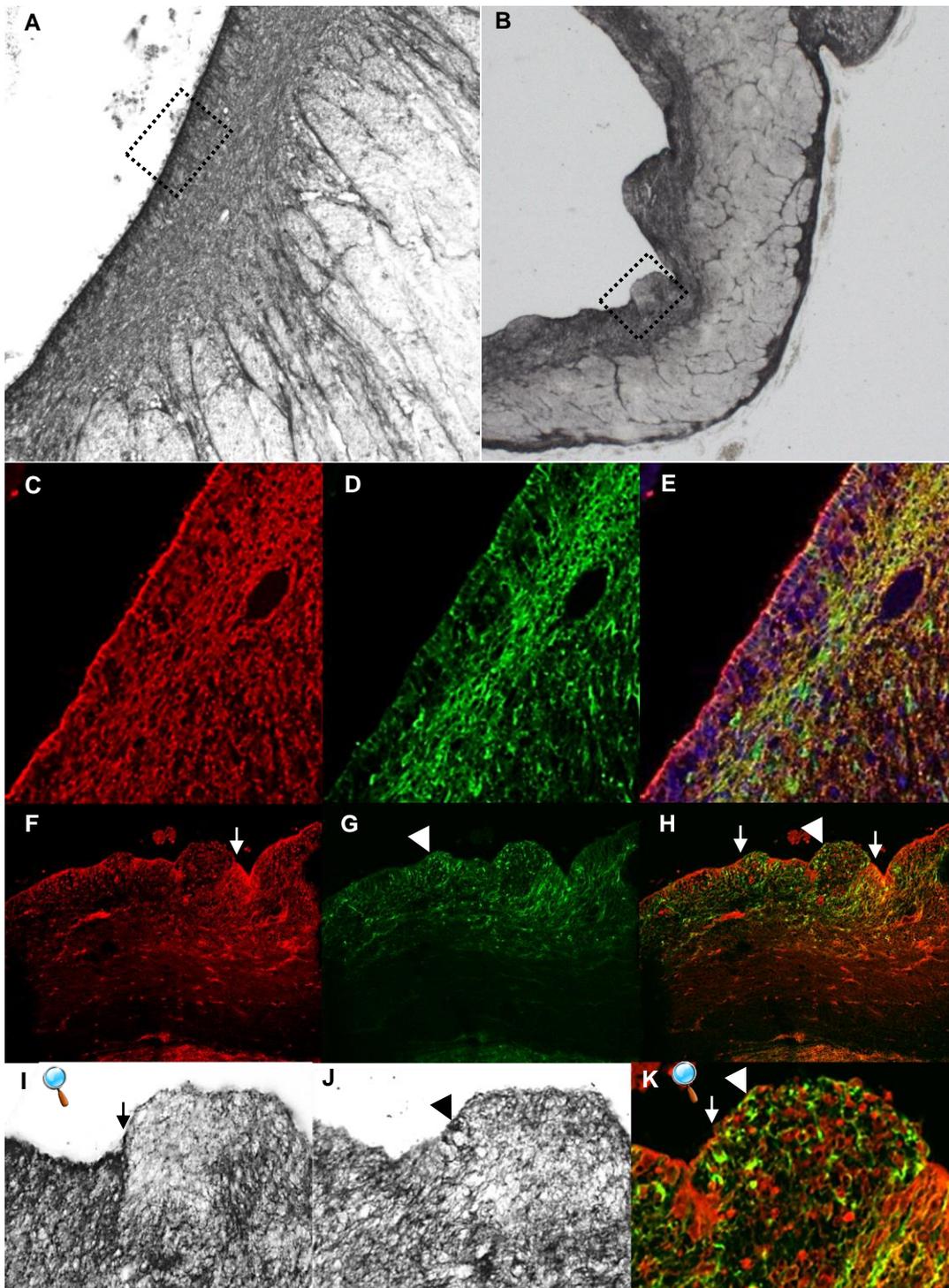
La glía activada expresa tanto GFAP como AQP4. En determinadas regiones de la zona subventricular (ZSV) se hace patente, la astrocitogénesis, como consecuencia de la activación glial en los casos hidrocefálicos. En los casos control observamos, en esta zona, células con morfología de progenitores intermedios positivos tanto para AQP4 como para GFAP, o células sólo positivas para GFAP. **Figura 24 y 25**. A esta edad gestacional en la pared medial de la corteza, la AQP4 se expresa en el polo apical del epitelio ventricular (neuroepitelio/epéndimo), sin embargo cuando observamos el epitelio ventricular en la misma zona y edad gestacional en condiciones de hidrocefalia, encontramos la presencia de interrupciones epiteliales, que no expresan AQP4. Dichas interrupciones están acompañadas de protrusiones hacia en la cavidad ventricular, y contienen células con morfología de progenitores intermedios que expresan GFAP y AQP4. Dichas interrupciones aparecen muy próximas a las zonas de Glía activada **Figura 26**. Además en condiciones normales las células que expresan GFAP se encuentran casi exclusivamente en la zona subventricular interna, sin embargo parece existir una traslocación de las mismas, desde la zona subventricular a la zona ventricular en las áreas donde la disrupción está sucediendo.



**Fig 24:** Expresión de AQP4 y GFAP en fetos controles y con hidrocefalia. **A;** imagen panorámica de un corte coronal de un cerebro control a las 21 SG. **B;** imagen panorámica de un corte coronal de un cerebro con mielomeningocele a las 21 SG. **C;** Ampliación de la zona ventricular adyacente al fornix de un caso control. **D;** Ampliación de la zona ventricular adyacente al fornix de un caso con hidrocefalia por mielomeningocele. **E;** misma zona ampliada del caso control pero inmunoteñida con anti-GFAP. **F;** misma zona ampliada del caso con mielomeningocele pero inmunoteñida con anti-GFAP. **G;** mayor ampliación del caso control con anti-GFAP donde se observan células marcadas e indiferenciadas. **H;** misma zona inmunoteñida con anti GFAP en condiciones de Hidrocefalia, donde se observa una gran diferenciación celular como astrocitos. (Las cabezas de flecha indican células indiferenciadas, mientras que las flechas indican astrocitos activados) Barra= 500 $\mu$ m en A,B; 140 $\mu$ m en C,D,E,F; 70 $\mu$ m en G,H.

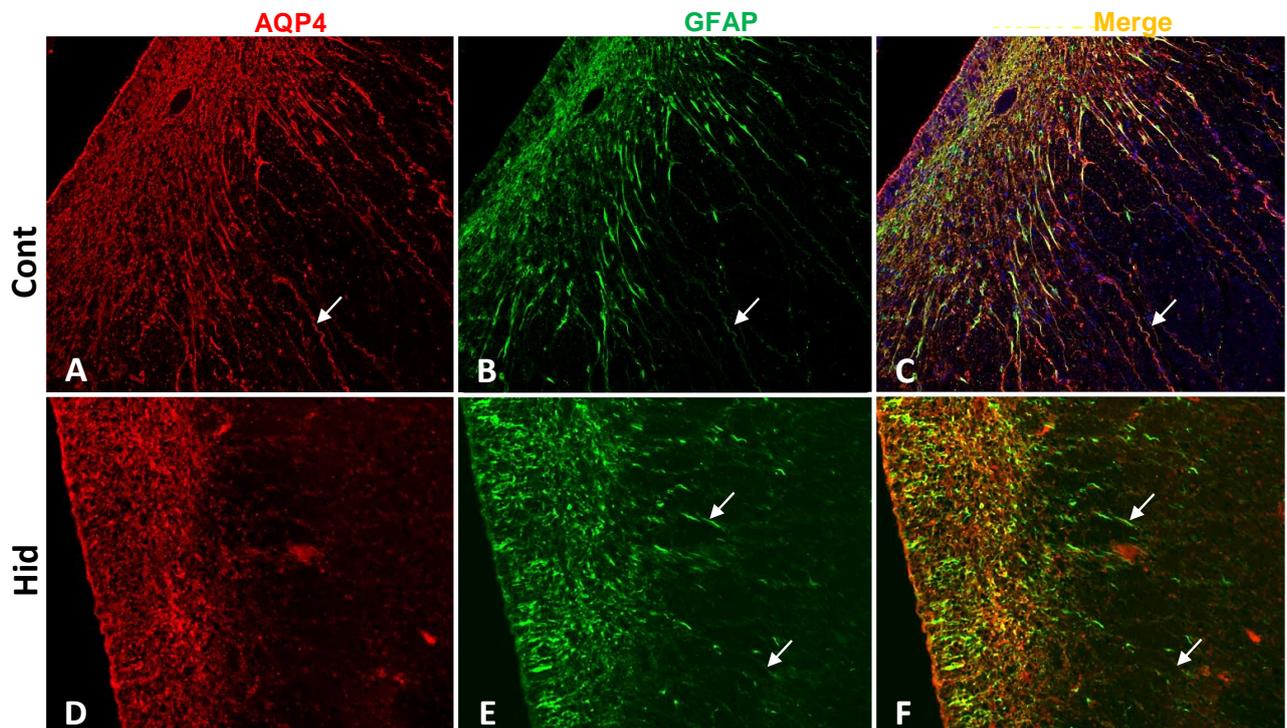


**Fig 25: Imágenes de microscopía confocal donde se observa la colocalización de AQP4 y GFAP en la glía activada frente a se expresión en controles . A;** imagen de la zona ventricular y subventricular expresando AQP4 en cun caso control . **B;** Misma imagen expresando ahora GFAP **C;** Merge de A y B donde se observa la colocalización de AQP4 y GFAP en células con morfología de progenitores intermedios aunque también aparacen marcadas células con morfología de neuroblastos, que solo expresan GFAP. **D;** imagen de la zona ventricular y subventricular expresando AQP4 en caso con mielomeningocele, **E;** misma imagen que D, pero expresando GFAP. **F;** Merge de D y E donde se observa la colocalización de AQP4 y GFAP pricipalmente en los astrocitos activados. Barra: 60 $\mu$ m en A,B,C; 100 $\mu$ m en D,E,F.



**Fig 26: Expresión de AQP4 y GFAP en el neuroepitelio, en condiciones de control e hidrocefalia.** A; imagen de la zona ventricular y subventricular expresando AQP4 en un caso control. B; Imagen de la misma zona expresando AQP4 en un caso de hidrocefalia C; Imagen de microscopía confocal de un caso control donde se observa la expresión de AQP4 a lo largo del polo apical del neuroepitelio. D; misma imagen de A pero expresando GFAP, donde se observa su expresión principalmente en la zona subventricular, E; Merge entre C y D. F; Expresión de AQP4 de la misma región pero en un caso de hidrocefalia. G; Misma imagen pero ahora se observa la expresión de GFAP, H; Merge de F y G donde se observan interrupciones en la expresión de AQP4. I; Detalle de la interrupción de la expresión de AQP4. J; Corte paralelo de I donde se observa la expresión de GFAP. K; microscopía confocal de la zona de interrupción donde se observan la mayor expresión de GFAP en la zona. (Las flechas indican las zonas de interrupción mientras que las cabezas de flecha señalan la ocupación de estas zonas por células GFAP positivas)

La expresión de la AQP4 en las células con morfología de Glia radial, (características de esta zona), se encuentran disminuidas en condiciones de Hidrocefalia, sobre todo cuando cuando tenemos en cuenta la expresión de la AQP4, donde las células que expresan este canal de agua parecen estar aglutinadas en la zona ventricular y subventricular expresándose principalmente en las células epiteliales y en células con morfología de Progenitores intermedios (Figura 27).



**Fig 27:** Expresión de AQP4 y GFAP en la zona ventricular y subventricular en regiones más alejadas a la zona de disrupción A; Imagen confocal de la zona ventricular y subventricular expresando AQP4 en un caso control . B; Misma imagen que A pero expresando ahora GFAP C; Merge de A yB donde se observa colocalización en los procesos radiales de AQP4 y GFAP D; Imagen confocal de la zona ventricular y subventricular expresando AQP4 en un caso hidrocefálico, E Misma imagen que D pero expresando ahora GFAP F; Merge entre D y E donde se observa que en casos patológicos la glía radial no parece ser tan positiva para AQP4.

## 5. Bioquímica

### 5.1 Cuantificación de Acuaporinas, TNF $\alpha$ y proteínas totales del LCR:

Los líquidos cefalorraquídeos provenientes de hidrocefalias post-hemorrágicas, presentan mayor concentración de proteínas totales, existiendo diferencias significativas con respecto al LCR del resto de tipos de hidrocefalia. **(Figura 28, A)**. La AQP1 se encontraba incrementada significativamente en los casos de hidrocefalia obstructiva **(Figura 28, B)**. mientras que la AQP4, lo estaba, en los casos de Hidrocefalia comunicante **(Figura 28,C)**. Finalmente se observó que no existían diferencias significativas en cuanto a la concentración de TNF $\alpha$ . **(Figura 28, D)**. En la tabla 5 se representan todos los resultados obtenidos.

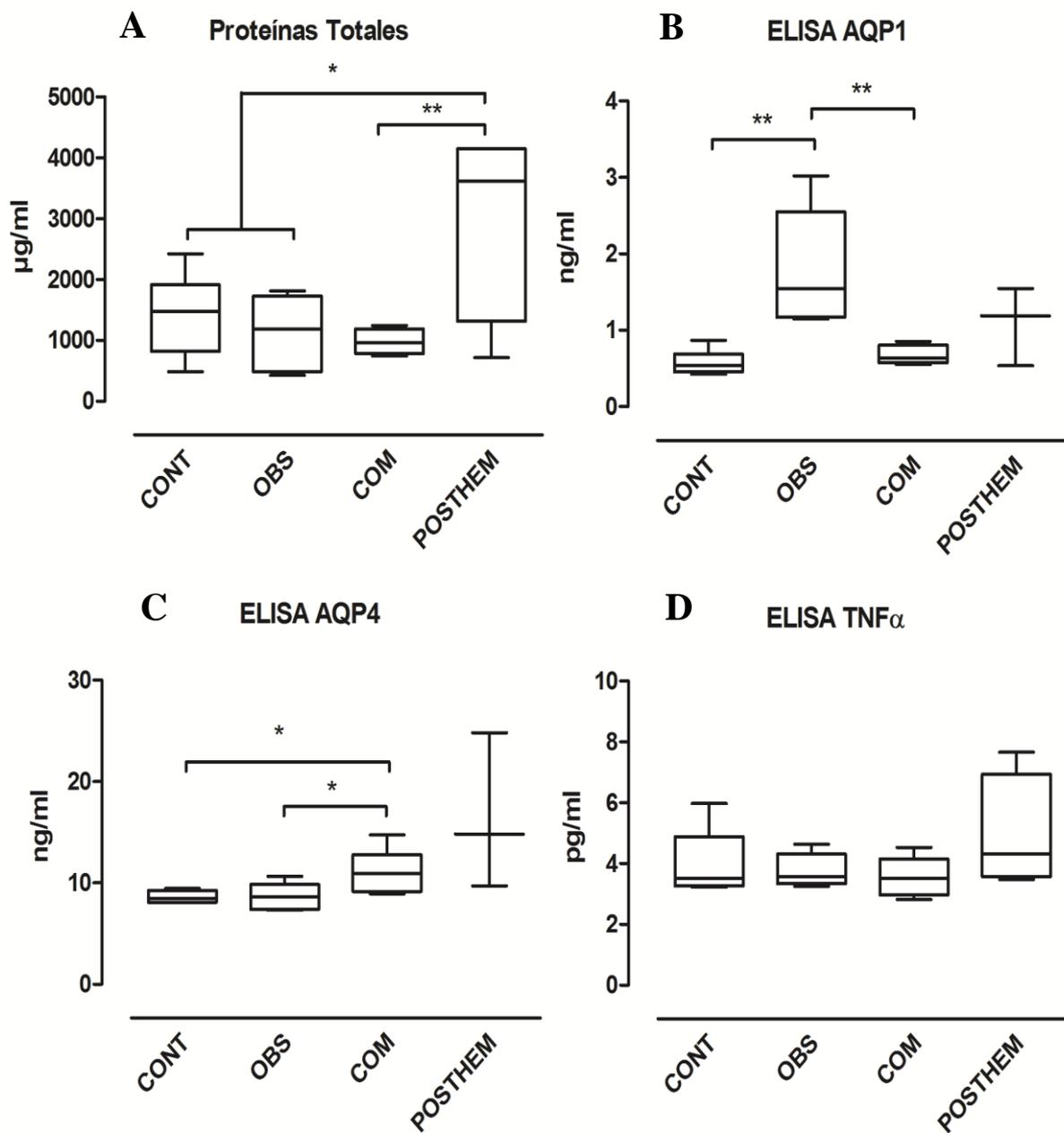


Fig 28: Representación de los resultados de los ELISAs y la Cuantificación de proteínas totales, A. Acuaporinas, B y C. TNFα, D. (\*= Z <0,05; \*\*= Z <0,01)

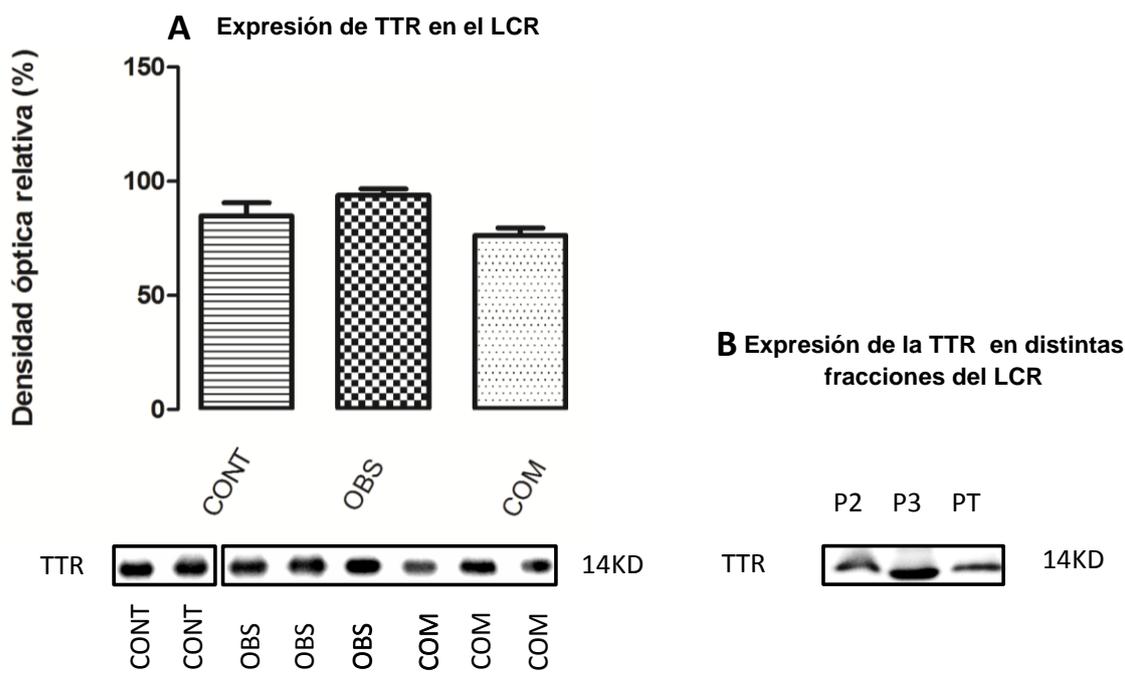
ID	TNF pg/ml	AQP1 ng/ml	AQP4 ng/ml	Prot µg/ml	Observaciones	EDAD
1	3,26	1,14	9,07	1650,38	OAS	1-5 DÍAS
2	3,99	3,02	8,66	425,60	OAS	1-5 DÍAS
3	4,63	1,19	10,65	1180,64	OAS	27 SG
4	3,56	1,55	7,32	1811,16	OAS	1-5 DÍAS
5	-	-	-	1325,54	OAS	1 AÑO
6	3,42	2,08	7,47	539,09	DW	1-5 DÍAS
7	3,85	-	24,81	3105,30	Post H	1-5 DÍAS
8	4,78	1,55	14,83	4131,46	Post H	1-5 DÍAS
9	3,48	0,53	9,71	717,21	Post H	1-5 DÍAS
10	7,66	1,19	-	4156,68	Post H	1-5 DÍAS
11	11,71	0,76	12,16	1075,03	4V DES	1-5 DÍAS
12	4,53	0,85	9,23	796,03	4V DES	1-5 DÍAS
13	3,78	0,64	10,67	1245,27	4V DES	1-5 DÍAS
14	3,51	8,88	8,92	841,74	4V DES	38 SG
15	2,82	0,55	11,25	1168,03	4V DES	1-5 DÍAS
16	3,11	0,59	14,74	742,43	4V DES	1-5 DÍAS
17	9,47	0,76	-	1227,93	Mal Función Valvular	8 AÑOS
18	4,48	0,50	-	723,52	CONT	9 AÑOS
19	4,52	0,87	8,66	1746,53	CONT	3 DÍAS
20	3,22	0,42	-	2422,76	CONT	1 DÍAS
21	5,97	0,63	9,46	1481,72	CONT	34 SG
22	3,71	0,58	8,06	482,35	CONT	38 SG
23	3,28	0,46	8,26	930,01	CONT	1 MES
24	3,32	0,50	-	1469,10	CONT	1 MES

**Tabla 5: Resultados de los ELISAs para TNF $\alpha$  , AQP1, AQP4, y concentración de proteínas totales**

## 5.2 TTR en el LCR de los casos controles e hidrocefálicos

Validación de la tratirretina (TTR) como “house keeping” para la cuantificación de proteínas en el LCR y en las distintas fracciones provenientes del LCR.

En los WB se observó que no existían diferencias significativas en la expresión de TTR (14KD) en el LCR de los distintos casos. (Existiendo una inmunodetección de la misma que se correlaciona con el volumen de CSF de la muestra independientemente de la concentración de proteínas presente o de la patología de la muestra. Además observamos que la fracción usada para la detección de TTR 14KD (P2, P3 o PT) del LCR, no era un factor discriminativo en cuanto a la expresión de esta proteína (**Figura 29**).



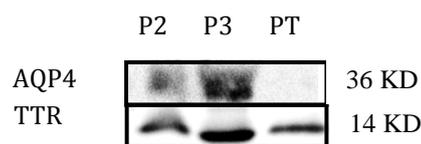
**Fig. 29: Expresión de la TTR en el LCR;** A; Expresión de TTR (14 KD) en el LCR de distintos tipos casos, controles e hidrocefálicos. B; Expresión de TTR (14KD) en las distintas fracciones extraídas

### 5.3 Expresión de AQP4 en las fracciones microvesiculares.

Observamos mediante WB que la expresión de AQP4 estaba vinculada al “Pellet” 2 y al “Pellet” 3 correspondientes con fracciones vesiculares, sin embargo no estaba presente en la fracción de proteína libre, además observamos que la mayor expresión de AQP4 se encontraba en la fracción 3 (**Figura 30**)

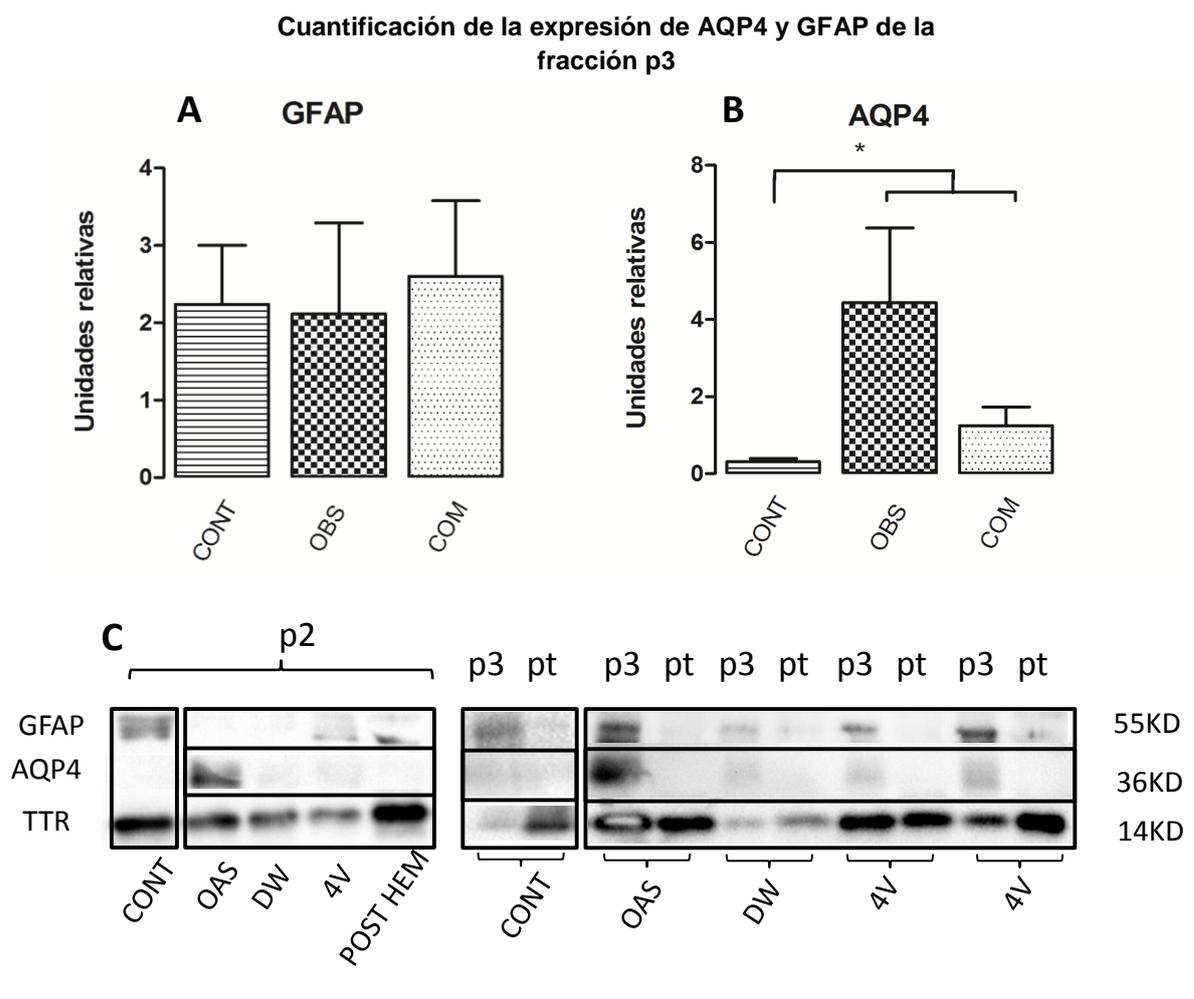
#### Especificidad de la expresión de AQP4 en los “Pellet” 2 y 3

**Fig 30 :** La Expresión de AQP4 se encuentra específicamente en las fracciones P2 y P3 y está ausente en la fracción proteína libre.



### 5.4 Expresión de AQP4 y GFAP en las fracciones vesiculares

Se observa que GFAP al igual que la AQP4 está vinculada a las fracciones vesiculares, no existiendo expresión en la fracción de proteínas libres **Figura 31, C**. Sin embargo cuando cuantificamos la expresión relativa de GFAP de la fracción P3 de los distintos grupos, observamos que no existían diferencias significativas entre sus niveles de expresión **Figura 31, A**. Cuando cuantificamos la expresión de AQP4 en la fracción P3 de los distintos grupos estudiados encontramos que se encontraba incrementada significativamente tanto para la hidrocefalia comunicante como para la obstructiva, con respecto al control.



**Fig 31: Expresión de GFAP y AQP4 en las fracciones P2 y P3.** A; Representación gráfica de la expresión de GFAP de la Fracción P3 en función a la cantidad de TTR de la propia muestra. B; Representación gráfica de la expresión de AQP4 de la fracción P3 (\*= Z <0,05;)

### 5.5 Expresión de AQP4 y GFAP de la fracción microvesicular mediante citometría de flujo.

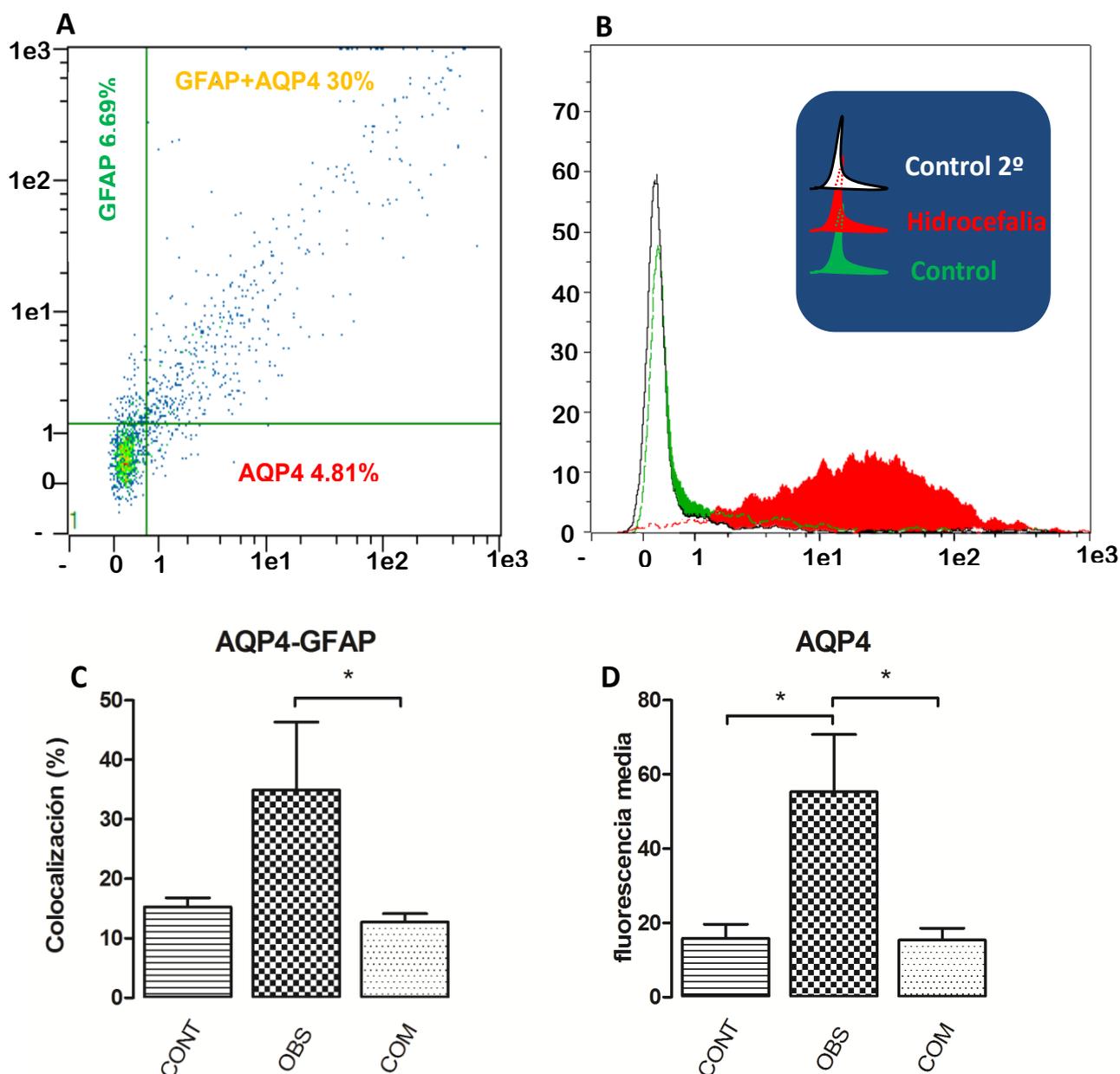
Mediante citometría de flujo detectamos que un altísimo porcentaje de las vesículas que expresaban GFAP, expresaban también AQP4. **Figura 32, A** sin embargo el número total de eventos que expresaban tanto AQP4 como GFAP era significativamente mayor en los casos de Hidrocefalia obstructiva con respecto a los casos de hidrocefalia comunicante. **Figura 32, C**. Finalmente cuando tuvimos en cuenta la intensidad de fluorescencia del APC (inmunológicamente unido a la AQP4) encontramos que era significativamente mayor en la hidrocefalia obstructiva frente a los controles o la hidrocefalia comunicante. **Figura 32, B y D**. En la **Tabla 6** se incluyen los datos más relevantes obtenidos a través de la Citometría de flujo.

### 5.6 Microvesículas mediante microscopía confocal

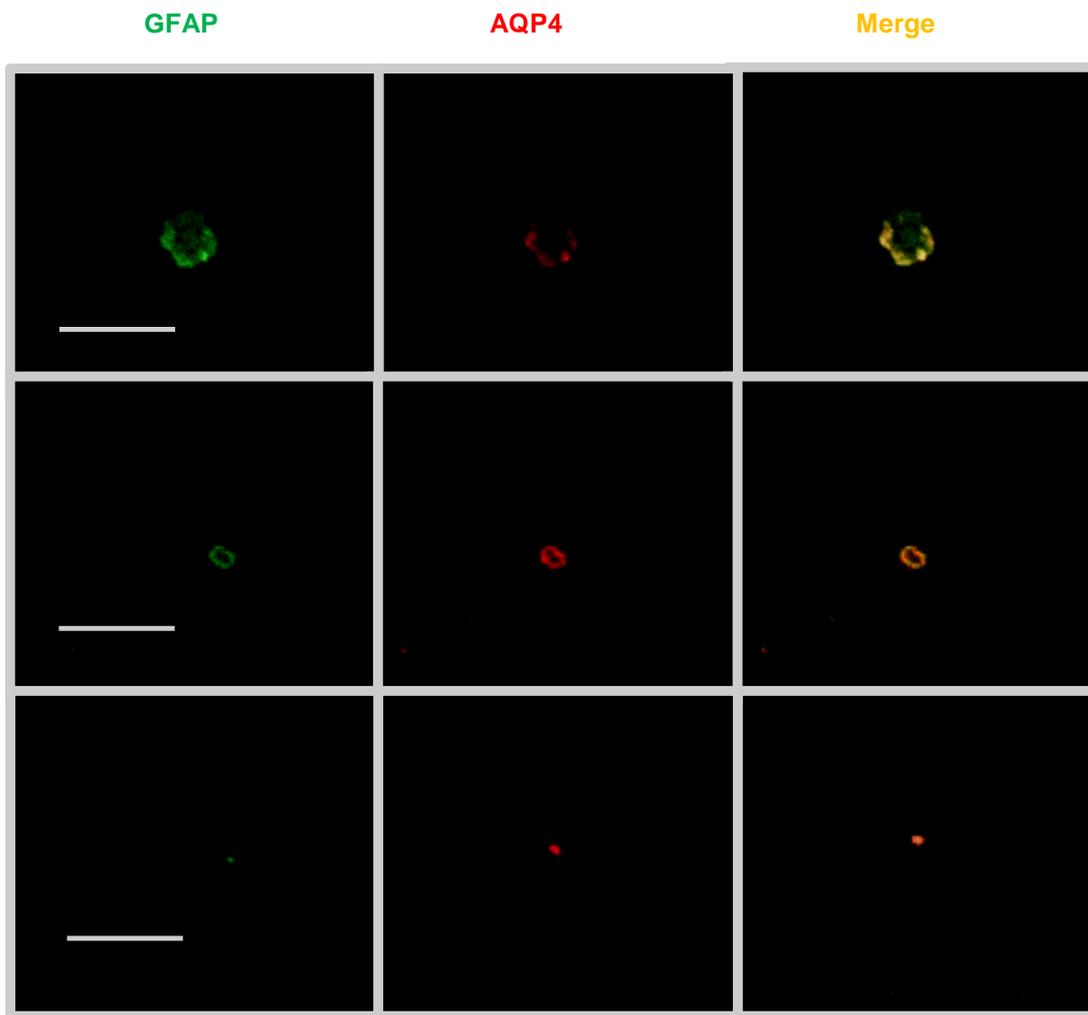
Las muestras que fueron procesadas para el citómetro de Flujo fueron también observadas mediante microscopía confocal, para consolidar la presencia de microvesículas mediante pruebas de imagen, de esta manera se pudieron visualizar microvesículas de distintos tamaños; inferiores a una micra, de entre una y dos micras y de entre dos y 4 micras, donde la mayoría presentaban doble marcaje AQP4 y GFAP (**Figura 32**).

ID	GFAP	AQP4	Colocalización (%)	Observaciones
1	297,42	49,11	32,2	Obs
2	29,58	22,96	11,05	Obs
3	1008,82	118,7	87,81	Obs
4	45,27	33,15	11,6	Obs
5	344,21	82,06	57,58	Obs
6	190,02	25,66	43,16	Obs
8	126,76	20,12	28,35	Posthem
9	283,12	15	56,08	Posthem
12	77,59	10,83	35,32	Com
13	43,25	10,01	16,78	Com
14	286,9	23,86	46,22	Com
15	223,76	16,73	26,2	Com
19	226,55	19,66	45,44	Cont
22	47,94	12,05	19,14	Cont

**Tabla 6: Tabla de los índices de fluorescencia media de GFAP AQP4 y sus porcentajes de colocalización.**



**Fig 32: Expresión de GFAP y AQP4 en las microvesículas mediante citometría de Flujo.** A; Representación gráfica de la co-localización entre AQP4 y GFAP donde se observa claramente que existen muy pocos eventos que presenten solo AQP4 o solo GFAP. B y D; representaciones gráficas de la intensidad de inmunofluorescencia correspondiente a la expresión de AQP4 (\*= Z <0,05) C; representación gráfica donde se pone de manifiesto que en los casos de hidrocefalia obstructiva existe un mayor porcentaje de eventos en donde AQP4 y GFAP están colocalizando. (\*= Z <0,05)



**Fig.33** Observación de las microvesículas mediante microscopía confocal. Barra: 5  $\mu\text{m}$

## ***Discusión***



## E. DISCUSIÓN

### 1. AQP1 en el desarrollo gestacional de los plexos coroideos.

En humanos, durante el desarrollo de los PC en los periodos embrionario y fetal, la localización de la AQP1 experimenta diferentes variaciones, (Johanson *et al.*, 2005), así tenemos que a los 46 días de gestación, las invaginaciones epiteliales de zonas más laterales del techo del rombencéfalo representan el primer signo de desarrollo del plexo coroideo del IV ventrículo donde células epiteliales dispersas muestran débil inmunotinción para AQP1 en su superficie apical. Más tarde a los 52-55 días de edad gestacional, en el neuroepitelio de la zona medio dorsal del diencefalo entre los primitivos forámenes de Monro, se diferencia una delgada lámina en lo que va a ser plexo coroideo del tercer ventrículo y ventrículos laterales. Inicialmente no muestra ninguna reactividad anti-AQP1, pero, hacia el final del período embrionario (8 semanas de gestación), la mayoría de las células que están formando el epitelio coroidal muestran una tinción positiva para la AQP1 en la membrana apical. A partir de entonces, durante el período fetal temprano a las 8-13 semanas, las células del plexo coroideo del IV, III y ventrículo lateral exhiben fuerte marcaje de AQP1 en su polo apical. Posteriormente, avanzando en el desarrollo fetal (14-23 semanas de gestación) El plexo coroideo de los ventrículos laterales, tercer y cuarto ventrículo presenta un aspecto similar y todas las células epiteliales muestran una fuerte tinción de AQP1 tanto en el polo apical como en la membrana basolateral (Johanson *et al.*, 2005). Asimismo estos resultados coinciden parcialmente con los hallazgos de Gomori *et al.* (2006) en fetos humanos, que describen la expresión de AQP1 en el PC a partir de las 14 semanas de gestación (SG), cuyo patrón de expresión varía con el tiempo. De tal manera que, entre las semanas 14 y 18, la inmunotinción se presentaba sólo en las membranas apicales del epitelio, mientras que a partir de la semana 18 y hasta la 22 la membrana tanto apical como basolateral de estas células era inmunopositiva. (Gomori *et al.*, 2006) En nuestros resultados describimos que AQP1 en el PC de los ventrículos laterales se empieza a detectar a las 8 semanas de gestación, hecho que está en concordancia con lo descrito por Johanson *et al.* (2005). Sin embargo en nuestros resultados solamente se expresa en algunos focos de expresión, en el polo apical de

un epitelio pseudoestratificado característico de esta edad y que se corresponde con la fase uno del desarrollo de los plexos coroideos, con lo que nosotros proponemos una expresión de la AQP1 en pequeños focos en las zonas distales de la raíz de los plexos coroideos. A las 10-11 SG aparece de manera continua en la cara apical de un epitelio que es ahora, monoestratificado con células cilíndricas correspondientes a la fase 2 del desarrollo de los plexos coroideos, sin embargo la expresión continúa siendo negativa en la raíz de los plexos coroideos. Así sugerimos que existe un programa de expresión de la AQP1 que va de distal a proximal, similar a lo propuesto para la maduración de los plexos, ya que la maduración histológica del PC coroideo se inicia en las partes más distales y progresa hacia las más proximales (el-Gammal, 1981,1983; Ek *et al.* 2003). Entre las semanas 18 y 23 de gestación la expresión de AQP1 es detectable en la membrana apical y la basolateral del epitelio coroideo. Sin embargo a las 25 SG, la AQP1 se expresa principalmente, en el polo apical del epitelio del PC. Estos cambios de la polaridad de la expresión de la AQP1 podrían deberse a que a en ciertas etapas de la edad fetal la función PC podría estar más vinculada a la producción de LCR (cuando se expresa apicalmente) frente a otras etapas donde dominan fenómenos de reabsorción del LCR (cuando se expresa basolateralmente) de acuerdo con el momento del desarrollo ventricular.

## **2. Expresión de la AQP1 en condiciones, control y de hidrocefalia.**

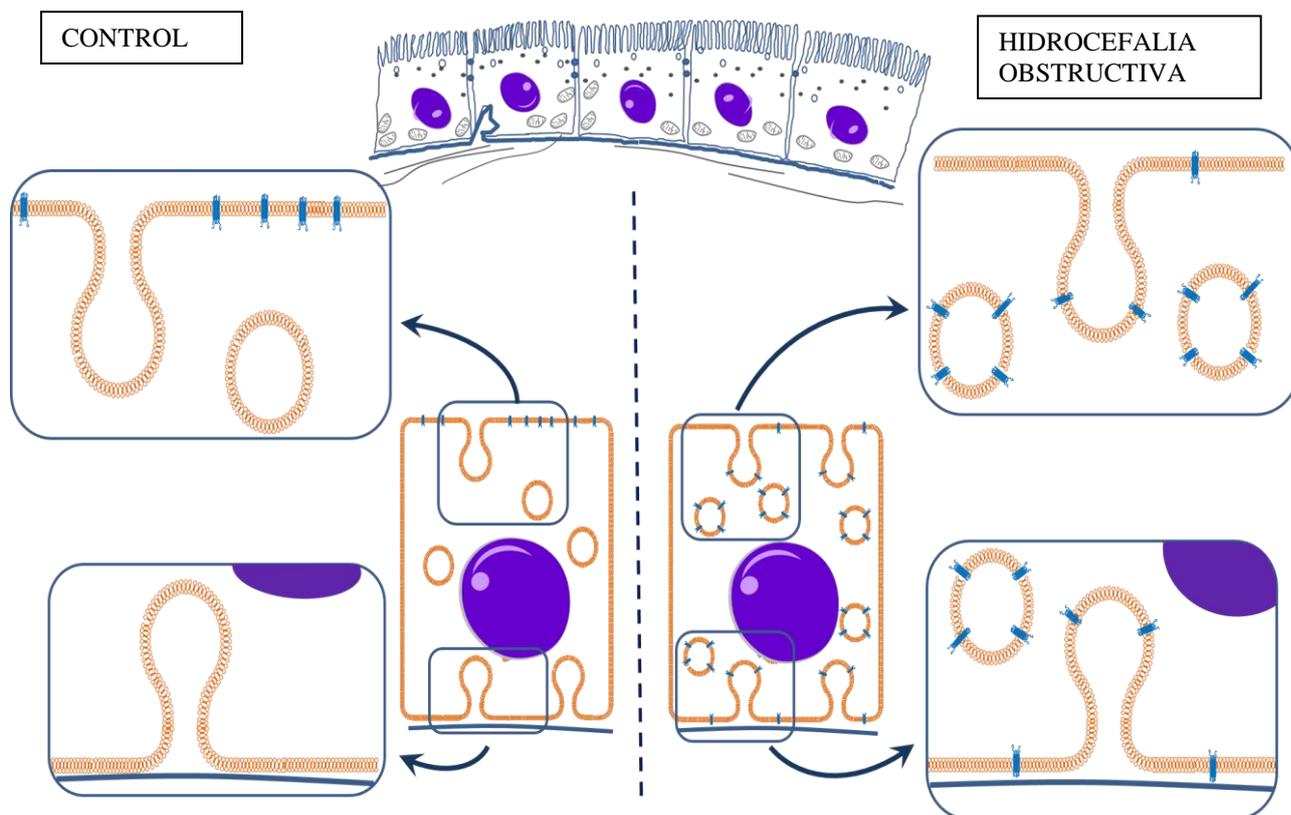
La AQP1 funciona como un canal de agua implicado principalmente en la producción del LCR. Se ha sugerido que su función podría estar regulada por cambios en su ubicación dentro de la célula (Praetorius 2007; Wang *et al.*, 2011; Carmona-Calero *et al.*, 2015). Sin embargo los estudios que relacionan la AQP1 con la hidrocefalia se basan en modelos animales, como la rata H-Tx o la hidrocefalia inducida mediante la inyección de caolín en la cisterna magna. (Kalani *et al.*, 2012) Estos estudios muestran una regulación a la baja de la expresión AQP1 en la hidrocefalia, sugiriendo una reducción de la producción de LCR para disminuir la presión intracraneal (Rash *et al.*, 1998). Estas sugerencias fueron reforzadas por lo descrito por Wang *et al.* (2011) que observaron que en ratones mutantes carentes de AQP1 se desarrollaban hidrocefalias menos severas, cuando se obstruía la cisterna magna con caolín, frente a la cepa salvaje (WT). Por otro lado estos mismos autores, encontraron que en los ratones WT que habían sido tratados con caolín, existía una

recolocalización de la AQP1, donde el 50% de esta proteína pasaba de la membrana apical a vesículas intracitoplasmáticas.

Actualmente, los patrones de expresión de AQP1 en la hidrocefalia no están claros en la literatura y menos en el humano ya que la expresión de esta proteína en la hidrocefalia congénita humana nunca se ha estudiado.

En nuestros resultados, en los casos de hidrocefalia obstructiva, se observa cómo, este canal de agua se expresa citoplasmáticamente con un marcaje típicamente vesicular (**Figura 12**), además de encontrarse en la membrana basal del epitelio del PC. Esta reorganización de la expresión de AQP1 en la hidrocefalia, podría estar relacionada no sólo con un fenómeno que permita la disminución de la producción de LCR, sino también con uno que permita la reabsorción del LCR a través del cambio de polaridad producido por esta proteína.

Este hecho no sucede el caso de la liencefalia, donde se observa una expresión apical de la AQP1. Así a resumidas cuentas podemos sugerir que AQP1 se expresa por primera vez en el desarrollo del cerebro fetal humano a las 8 semanas de gestación en el polo apical de las células de los plexos y puede cambiar su polaridad en epitelio del PC ajustándose al tamaño ventricular y la producción de LCR durante en cada etapa del desarrollo del cerebro fetal. Por otro lado AQP1 está ubicada en la membrana basal del epitelio del PC en el caso de la hidrocefalia obstructiva, pero se encuentra fundamentalmente en el polo apical en los casos liencefálicos, estas diferentes ubicaciones de la AQP1 probablemente se deban a que la ventriculomegalia en el caso A-Ch corresponde con una hidrocefalia no-comunicante donde la acumulación de LCR intraventricular, está causando un daño. Por lo tanto surge la necesidad de disminuir la producción de LCR. Mientras que la ventriculomegalia de la liencefalia se corresponde con hidrocefalia exvacuo, donde la acumulación de LCR no se debe a fenómenos obstructivos sino más bien a problemas por agenesia cortical, con lo cual la producción de LCR no causa daño y no existe necesidad de disminuir su producción. En la **figura 34** se representa el modelo de expresión de la AQP1 que podría estar teniendo lugar en los casos de hidrocefalia obstructiva.



**Fig.34** Esquema representativo de las variaciones de la expresión de la AQP1 en los plexos coroideos en casos de hidrocefalia frente a controles. En azul se representa la AQP1 donde se observa que s internalizada citoplasmáticamente en porcesos endosómicos.

### 3. Expresión de la AQP4 en el desarrollo de la corteza humana:

El transporte de agua a través de la barrera hematoencefálica, y de los espacios intra y extracelulares del parénquima estudiados. Con el descubrimiento de la AQP4, cuya expresión se localiza principalmente en los pies de los astrocitos, comenzaron a entenderse las bases moleculares del transporte de agua a través de las membranas parenquimatosas. Así, este canal acuoso, ha sido vinculado con el equilibrio de los fluidos del sistema nervioso central, ya sea interviniendo en el edema cerebral, o incrementando su expresión como mecanismo compensatorio de la hidrocefalia (Bloch *et al.*, 2006; Brian *et al.*, 2010). Se ha descrito que los astrocitos participan en la sinaptogénesis y en el mantenimiento de la actividad sináptica a través de la homeostasis del fluido intersticial sináptico. Los pies de los astrocitos rodean las sinapsis y los nódulos de Ranvier (Verkman *et al* 2006), manteniendo los niveles adecuados de pH, iones, neurotransmisores y fluidos. De esta manera la AQP4 situada en estos pies astrocitarios regula el flujo acuoso para el aclaramiento del K<sup>+</sup> producido durante la trasmisión nerviosa (Barres, 2008). El

exceso de protones en los espacios intersticiales sinápticos mantendrían estados de hiperpolarización que impedirían el paso de un nuevo impulso nervioso. En esta línea de pensamiento creemos que la expresión de la AQP4 en el desarrollo fetal humano puede estar vinculada a los fenómenos gliogénicos de los fibroastrocitos necesarios para la transmisión nerviosa que sucede después de la neurogénesis, tal es así, que en nuestros resultados observamos que la expresión de la AQP4 sigue un programa, temporoespacial, que va indicando el fin de la neurogénesis, y el inicio de la gliogénesis que le daría la funcionalidad a las neuronas. En primer lugar la AQP4 empieza a expresarse a las 12-13 semanas de gestación en el glioepitelio de la fimbria, del hipocampo dorsal, que es un lugar específicamente glial y no existe neurogénesis, posteriormente hasta las semanas 22- 23 de gestación la AQP4 va a estar ligada a procesos gliales o cuerpos celulares asociados a importantes tractos fibrosos, como son el cuerpo caloso o el fornix, donde obviamente no existirá neurogénesis, y está madurando la glia adyacente necesaria para la transmisión nerviosa y la formación de la unidad neurovascular. A partir de la semana 25 de la gestación, se observa como, la AQP4 no solo se vincula a los principales tractos fibrosos o las estructuras corticales transitorias, sino que se va a expresar en el resto de la corteza, principalmente en la zona intermedia o subplaca, zonas que posteriormente darán lugar a la sustancia blanca de la corteza cerebral. Es en esta zona, donde por primera vez, observamos la AQP4 marcando los pies de los astrocitos, rodeando vasos sanguíneos estableciéndose la unidad neurovascular. Curiosamente nosotros solo encontramos la expresión de este canal de agua en los astrocitos, o futuros astrocitos, asociados a los tractos fibrosos o la sustancia blanca, de hecho en el adulto observamos la expresión de este canal de agua principalmente en los fibroastrocitos. De esta manera sugerimos que siguiendo el patrón de expresión de la AQP4, podríamos definir el programa temporo-espacial de maduración de las fibras nerviosas corticales. Yendo de medial a lateral empezando por los hipocampos dorsales y ventrales, seguido de las eminencias ganglionares, y continuando con la neocorteza; inicialmente por las regiones perisilvianas, y en última instancia las zonas occipitales y prefrontales. Entendemos que tiene cierta lógica biológica y evolutiva, que estas áreas adquieran funcionalidad o madurez de manera tardía, ya que se encargan de la visión, lo cual innecesario intraútero, y de comportamientos cognitivamente complejos, como la expresión de la personalidad.

#### **4. Linajes celulares que expresan AQP4 en el desarrollo cortical.**

Hasta hace no mucho los astrocitos eran considerados una población homogénea de células del tejido nervioso, sin embargo, recientemente ha sido constatada su gran diversidad morfológica y funcional manteniendo roles fundamentales en el desarrollo cortical durante la sinaptogénesis (Slezak & Pfrieder, 2003). De esta manera se ha vinculado a desordenes en neurodesarrollo tales como el síndrome de Rett (Lioy *et al.*, 2011) o la hidrocefalia de inicio fetal donde se producen activaciones gliales (Rolaes *et al.*, 2012). Por lo tanto, un preciso entendimiento del desarrollo glial es crucial para entender la heterogenidad funcional y anatómica de los astrocitos. Sin embargo, definir el rol de los astrocitos en los desórdenes neurológicos se ha convertido en un objetivo complicado, debido al escaso conocimiento acerca de cómo se desarrollan en la corteza cerebral y debido a la ausencia de biomarcadores que nos permitan distinguir entre los potencialmente diferentes subtipos de astrocitos. (Molofsky *et al.*, 2012). En función a nuestros resultados, proponemos la AQP4 como un buen marcador de gliogénesis, ya que observamos que está marcando células con morfología de glía radial, células con morfología de progenitores intermedios y astrocitos.

##### **4.1 AQP4 y Glía radial.**

En nuestros resultados se puede observar un marcaje muy específico en un subgrupo de glía con morfología radial, vinculada a lugares donde ha finalizado la neurogénesis, como en el caso del gliopitelio de la fimbria. Además, vemos que ese marcaje radial progresa hacia los principales tractos nerviosos y a estructuras corticales transitorias, como son las eminencias ganglionares, finalmente sobre la semana 25 de gestación dicha glía, AQP4 positivas, es observable en toda la corteza, principalmente en la zona subventricular e intermedia que darán lugar a la sustancia blanca. Si reflexionamos sobre dicha progresión nos estaría indicando los lugares donde la glía pasa a ser astrogligénica. En primer lugar, durante el desarrollo temprano, la AQP4 se detecta en la arquicorteza que pertenece a estructuras de maduración filogénica más primitivas. A continuación, se expresa en

estructuras transitorias durante el desarrollo cortical, tales como las eminencias ganglionares. Estructuras que hacen su aportación al desarrollo, primero neurogénica, posteriormente gliogénica y finalmente degeneran. Por último, la AQP4 es observada en el resto de la neocorteza asociada principalmente a la sustancia blanca.

Para la confirmación de que AQP4 está efectivamente marcando la glía radial, realizamos estudios de doble marcaje con microscopía confocal, utilizando la vimentina como marcador de células madre. Tal y como se expuso en los resultados, observamos que ambas proteínas colocalizan, lo que confirma la utilidad de AQP4 como marcador de la glía radial.

Por otro lado, el marcador de fibroastrocitos más utilizado es GFAP (Molofsky *et al.*, 2012). Que, sin embargo, se trata de un marcador inespecífico en edades tempranas, dado que marca tanto astrocitos diferenciados como glia radial neurogénica. AQP4 colocaliza de manera muy específica con GFAP, solamente en zonas vinculadas a la glia fibrosa, lo que nos permite sugerir por vez primera, que este canal acuoso estaría marcando específicamente un tipo de glia radial que dará lugar a astrocitos. Este hecho es de elevada importancia ya que hasta donde nosotros conocemos no existen marcadores específicos de células progenitoras de astrocitos humanos.

Cuando colocalizamos con S100 $\beta$  que es un marcador glial que marca principalmente astrocitos protoplasmáticos, se puede observar que no existe ningún tipo de colocalización con AQP4, salvo algunas células de la región subventricular, de tal manera que se demuestra que la AQP4 en el desarrollo fetal está marcando un tipo específico de glía radial que está implicada en la gliogénesis de los fibroastrocitos, y no está vinculado con protoastrocitos.

### **4.2 AQP4 y progenitores intermedios**

La AQP4 además de marcar glía radial específica de fibroastrocitos está marcando también células con morfología de progenitores intermedios, si nos centramos en el programa de expresión de la AQP4, expuesta en nuestros resultados, se observa con bastante claridad, como esta expresión va de medial a lateral. De tal manera que, en un corte coronal de la zona parieto-occipital, tendremos zonas en un estado avanzado de expresión de la AQP4 en las zonas mediales, frente a zonas donde la

expresión de la AQP4 es incipiente o inexistente, además se observa que dicho programa de expresión avanza por la zona subventricular inicialmente y con retraso va expresándose también en el epéndimo. Este hecho nos permite en un mismo corte y con poco esfuerzo, observar distintos estadios en la diferenciación celular de los fibroastrocitos. En la cara medial se distinguen claramente células de la glía radial basal (discutida en el punto anterior) mientras que en las zonas de expresión incipiente de la AQP4 se observan células con morfología de progenitores intermedios que colocalizan con vimentina, y con GFAP con lo cual es bastante plausible que realmente sean progenitores intermedios, además en las zonas de avanzada expresión de AQP4 se observan algunos de estos progenitores intermedios AQP4 positivos, que están empezando a proyectar un proceso que puede ser basal o apical. Con lo cual sugerimos que dicha expresión de la AQP4 empezaría en estos progenitores intermedios y que posteriormente se diferenciarían como glía radial basal específica de fibroastrocitos.

### **4.3 AQP4 en el Neuroepitelio / Ependimo.**

En función a nuestros resultados observamos que la expresión de AQP4 en el epitelio ventricular se produce una vez que éste se vuelve multiciliado, lo cual es una condición ependimaria mientras que cuando solo posee un único cilio estaríamos hablando de células neuroepiteliales (glía radial apical). Por otro lado se observa que la expresión de la AQP4 es inicialmente apical, lo cual no ha sido descrito hasta ahora, y posteriormente, al final del periodo gestacional se concentra en las membranas basolaterales, tal y como ha sido descrito típicamente. Por lo tanto sugerimos que la AQP4 puede ser un buen marcador de revestimiento ventricular, de tal manera que si se está expresando, se trataría de epéndimo, aunque incluso se podría afinar más, ya que si la expresión de AQP4 encuentra en el polo apical estaríamos hablando de un epéndimo inmaduro correspondiente al periodo gestacional temprano, mientras que si está marcando las membranas basolaterales, estaríamos hablando de un epéndimo maduro del final de la gestación.

## 5. AQP4 e Hidrocefalia

### 5.1 Revestimiento ventricular.

La hidrocefalia es un desorden del sistema nervioso vinculado principalmente a los siguientes procesos: disrupción endotelial / neuroepitelial, unido a un proceso de activación glial, fallo en la neurogénesis por pérdida de células madre y en última instancia, a una descompensación en el circuito del LCR a través de las cavidades ventriculares y el espacio subaracnoideo (Guerra *et al.*, 2015). La AQP4 es el principal canal de agua presente en el sistema nervioso central, localizándose principalmente en la barrera hematoencefálica, (en los pies de los astrocitos perivasculares), en la interfaz LCR, parénquima cerebral, ya sea en las membranas endoteliales o en los pies de los astrocitos subpiales y en las zonas perisinápticas (Atkinson & Baum 2009). Este canal acuoso está asociado principalmente con la reabsorción del edema cerebral, a través de esas barreras, sin embargo muy pocos estudios se han centrado en estudiar las implicaciones de los canales de agua en la fisiopatología de la hidrocefalia congénita. Básicamente existen 7 publicaciones en las que se estudia la AQP4 en la hidrocefalia, 6 de ellos realizados en modelos animales, y sólo uno realizado en humanos. Fundamentalmente, en todos se llega a la conclusión de que existe una sobre expresión de la AQP4, proponiéndose como un mecanismo compensatorio de la hidrocefalia, en aras de reabsorber el exceso de LCR (Bloch *et al.*, 2006; Brian *et al.*, 2010; Roales *et al.*, 2012; Filippidis *et al.*, 2012). En nuestros resultados histológicos con respecto a la expresión de la AQP4, vemos que las implicaciones de este canal de agua en la fisiopatología de la hidrocefalia son mucho más importantes, a una mera sobre expresión de la misma, nosotros observamos como se ve afectada la AQP4 por el fenómeno de disrupción neuroepitelial, característicos de las fases iniciales, de la hidrocefalia congénita. Además la AQP4 está vinculada con la estabilidad y maduración del epéndimo (Li *et al.*, 2009), de hecho se ha demostrado que el 30% de los ratones KO para AQP4 presentan disrupción endotelial. A este 30 por ciento habría que sumarle un 9,6% más que no solo presentaba una disrupción endotelial sino además una hidrocefalia por estenosis del acueducto de Silvio. (Feng *et al.*, 2009). De esta manera la AQP4 parece tener unas implicaciones mucho más importantes que una mera visión mecanicista de la sobreexpresión de la misma para incrementar la reabsorción del LCR. De tal manera que en nuestros resultados la disrupción era

detectada principalmente mediante el marcaje con AQP4, así mismo se observaron acumulaciones de AQP4 en el citoplasma, justo en las zonas adyacentes a la disrupción del epéndimo de manera que la AQP4 parece estar también implicada en transporte ineficaz de las proteínas de unión a las membranas endoteliales. No en vano se dice que la Hidrocefalia comienza como una patología de las proteínas de unión.

### 5.2 Activación Glial y AQP4

La activación Glial producida por daños cerebrales se caracteriza por una hiperplasia y una hipertrofia de las células astrogiales. Se ha demostrado que las reacciones astrocitarias inhiben la regeneración axonal (Bovolenta *et al.*, 1991) sin embargo también se ha asociado con la liberación de factores de crecimiento y moléculas tróficas tales como el factor de crecimiento nervioso (NGF) o el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) que promueven el crecimiento neuronal. (Renault *et al.*, 2008) Por lo tanto los beneficios y consecuencias de la activación glial es un tema muy controvertido, donde algunos autores defienden que la reacción astrocitaria inicialmente protege el tejido cerebral y contribuye a su recuperación funcional. (Giaume *et al.*, 2007). Otros autores defienden que en el caso de la hidrocefalia, la activación glial se presenta como un fenómeno muy dañino con lo cual están trabajando con el uso de antiinflamatorios para tratar la hidrocefalia en modelos animales (McCallister & Miller 2010). En cuanto al hecho de que AQP4 se vincula a la reactividad glial, Roales-Bujan *et al.*, (2012) observaron, tanto en ratones como en humanos, un incremento en la expresión de la AQP4 en los astrocitos que se activan y van sustituyendo el revestimiento ventricular denudado. En nuestros resultados no llegamos a ver que existiera una sustitución del revestimiento ventricular perdido a causa de la fisiopatología de la hidrocefalia. Probablemente debido a que nuestros casos, fetos sobre las 21 semanas de gestación, presentaban todavía, hidrocefalias incipientes. Aunque si pudimos detectar zonas denudadas, con una altísima activación glial adyacente, que presentaba tanto la expresión de AQP4 como GFAP, en los cuales, al compararlo con sus correspondientes controles, se podría sugerir que existe una diferenciación anticipada hacia astrocitos como consecuencia de dicha activación glial, ya que en

los casos control estas células AQP4 y GFAP+ se mantienen en estados indiferenciados, además se observan estados desorganizados de la glía Radial astrogliogénica, la cual nos podría indicar que la hidrocefalia no sólo se trata de una enfermedad de neurogénesis anormal sino que podría estar relacionado con una gliogénesis anormal.

## 6. Hidrocefalia y LCR

En la tercera conferencia sobre hidrocefalia organizada en julio de 2012 por la “Hydrocephalus Association” patrocinada por los NIH (National Institutes for Health, EE.UU.), titulada “Opportunities in Hydrocephalus Research: Pathways to Better Outcomes”, se definieron las líneas de investigación prioritarias para el trienio 2013-2015. Allí se llegó a la conclusión de que la prioridad con respecto a la investigación en la hidrocefalia debía seguir las siguientes directrices; el uso de la técnica MRI (Magnetic Resonance Imaging), la búsqueda de biomarcadores de diagnóstico y evolución de la enfermedad, y la importancia de acercar el conocimiento de modelos animales a los casos humanos. El trabajo aquí expuesto intenta integrar al menos dos de las líneas de investigación estipuladas como más importantes. La búsqueda de biomarcadores y la aproximación del conocimiento desarrollado en animales a los casos humanos.

La naturaleza multifactorial de la hidrocefalia es un obstáculo importante en el avance del conocimiento de este trastorno, de tal manera, que diferentes etiologías pueden desembocar en una hidrocefalia. Además esta patología está vinculada a fenómenos variados tales como la destrucción de la corteza periventricular, la fibrosis o esclerosis, el deterioro del plexo coroideo y del epéndimo / neuroepitelio (Milhorat, 1972; Weller & Wisniewski, 1969; Guerra *et al.*, 2015), así como la pérdida de la sustancia blanca y células madre periventriculares (McAllister 2012; Guerra *et al.*, 2015). En el LCR se reflejan estos cambios fisiopatológicos (Kahle *et al.*, 2012) que resultan de la variabilidad de las condiciones etiológicas. Con lo cual se propone al LCR como la fuente más fiable para extraer biomarcadores que nos puedan informar de la etiología de la hidrocefalia. De tal manera que podríamos obtener información del estado de la reactividad glial, de la disrupción del neuroepitelio / epitelio, o incluso de la actividad de los plexos coroideos.

### 6.1 Cuantificación de Proteínas en el LCR

En nuestros resultados se expuso como se detectaba significativamente, más proteínas totales en los casos con hidrocefalia posthemorrágica, frente a todos los demás grupos, lo cual nos hizo sospechar de la posible contaminación con proteínas sanguíneas provenientes de la hemorragia, sin embargo no existieron diferencias entre los controles o el resto de hidrocefalias. Sorprendentemente tampoco encontramos diferencias en los niveles de TNF $\alpha$ , a pesar del importante carácter inflamatorio de esta enfermedad, lo cual no es un hecho sin precedentes ya que según Naureen *et al.*, (2014) la hidrocefalia no se asocia con elevados niveles de proteínas ni con un evidente perfil inflamatorio excepto en etapas posnatales donde el incremento de la presión intracraneal activa las vías inflamatorias.

Lo que sí es un hecho sin precedentes es la detección de niveles significativos de AQP1 en el LCR de los casos de hidrocefalias obstructivas frente a los controles o los casos de hidrocefalias comunicantes, lo cual es difícil de entender teniendo en cuenta que en los resultados histológicos observamos que existe una disminución a la baja en la expresión de AQP1 de los casos obstructivos, además no solo está disminuida sino que está internalizada en vesículas e incluso ha invertido su polaridad expresándose en la membrana basal del epitelio coroidal. Por lo tanto solo podemos atribuir dicha presencia de AQP1 en el LCR a un fenómeno acumulativo de dicha proteína proveniente de la pérdida de las microvellosidades epiteliales de los plexos coroideos, tal y como sugirió Blocher *et al* (2011), este autor demostró el incremento de AQP1 en el LCR de pacientes con meningitis. De todas formas tenemos que tener en cuenta que nuestras muestras de LCR provienen de pacientes en edades perinatales mientras, que los cortes histológicos donde se observa disminución de la AQP1 son de 25 semanas de gestación, con lo cual entre las 25 semanas de gestación y el nacimiento puede existir algún fenómeno etiológico que no estamos teniendo en cuenta a nivel histológico. De esta manera sugerimos que la AQP1 puede ser un buen indicador del tipo de hidrocefalia, teniendo especificidad por la obstructiva e indicándonos la actividad, o más bien, la pérdida de actividad de los plexos coroideos. Por una recolocalización de la AQP1 al LCR, o al citoplasma asociado a vesículas.

En cuanto a la AQP4 encontramos que existen niveles significativamente altos de AQP4 en los casos de hidrocefalia comunicante con respecto a los obstructivos o los

controles. Demostrándose por primera vez el incremento de estas proteínas en el LCR de esta patología aunque Blocher et al (2011) ya lo había encontrado en pacientes con meningitis. Como hemos mostrado en los resultados histológicos, este canal de agua está relacionado con el epéndimo y la integridad del mismo, con la activación glial, que es un factor fundamental en la etiología de la hidrocefalia de inicio fetal (Guerra *et al.*, 2015) y además está vinculado con un tipo específico de células madre gliogénicas que están afectadas en la hidrocefalia. De tal manera que la AQP4 estaría implicada en algunos de los principales factores etiopatológicos de la hidrocefalia, por lo cual se podría tener presente el uso de esta proteína como biomarcador de esta enfermedad.

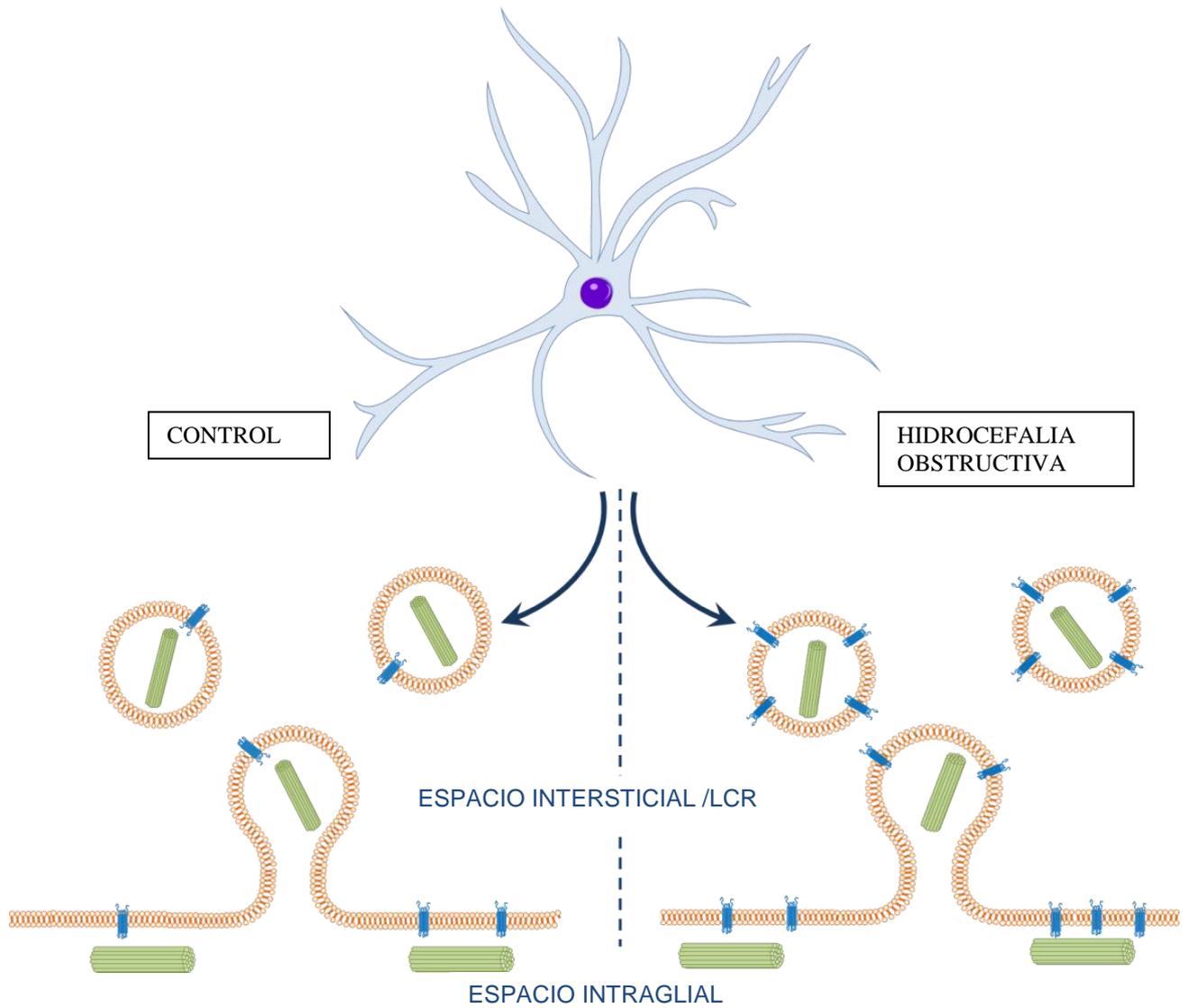
## **7. Microvesículas como biomarcador**

Recientemente se demostró un incremento en la producción de microvesículas en el LCR de pacientes con esclerosis múltiple, estas microvesículas provenían de la activación glial producida en dicha enfermedad. (Verderio *et al.*, 2012).

Teniendo en cuenta que la activación glial es un fenómeno característico en la Hidrocefalia, y que la AQP4 estaba sobreexpresada en los astrocitos de dicha enfermedad. Propusimos que la AQP4 presente en el LCR podía provenir de las microvesículas que estuvieran en dicho medio. Así es que, aislamos las microvesículas y cuantificamos por WB la presencia de GFAP y de AQP4, donde observamos que solo los niveles de AQP4 estaban incrementados en el LCR, tanto de los casos obstructivos como de los casos comunicantes, mientras que los niveles de GFAP se mantenían constantes, probablemente porque de manera natural existe presencia de GFAP en el LCR debido a una comunicación natural intracerebral de las células gliales. En nuestros resultados se puede apreciar que el GFAP y la AQP4 se presentan únicamente en las fracciones vesiculares (P2 y P3) y no en las fracciones con proteínas totales. De esta manera sugerimos que ambas proteínas están formadas parte de vesículas y no están libres en el LCR además las microvesículas provenientes de los casos con hidrocefalia presentarían niveles incrementados de AQP4

### **7.1 Citometría de flujo**

Mediante la citometría de flujo demostramos que efectivamente las vesículas GFAP+ provenientes de la actividad glial colocalizaban en su mayoría con AQP4 y que los niveles de AQP4 eran mayores en la hidrocefalia obstructiva, además se observaba que la colocalización de ambas proteínas era significativamente mayor en los casos obstructivos con respecto a los comunicantes. Esto en cierta manera contradecía lo que habíamos encontrado mediante ELISA, donde los niveles incrementados de AQP4 se encontraban en los casos comunicantes. La explicación es probablemente porque mediante ELISA medimos las concentraciones totales de AQP4, del LCR, no solo las de las microvesículas, con lo cual deducimos que debe haber otra fuente de AQP4 a parte de las microvesículas, que está presente en el LCR de los casos comunicantes frente a los casos obstructivos. Probablemente provengan de la disrupción del epéndimo ya que la cicatrización glial que frena este proceso no ha sido descrita en los casos comunicantes. Con lo cual sería muy interesante conocer las concentraciones de AQP4 y su procedencia para dilucidar que fenómenos etiopatológicos están ocurriendo en el paciente, de esta manera, a través de la cuantificación total de AQP4 en el LCR y de la proveniente de las microvesículas, podríamos obtener información acerca del estatus de la enfermedad, que permita hacer mejor pronóstico y diseñar tratamientos adecuados para los casos específicos de hidrocefalia. En la **Figura 35** representamos el posible modelo de expresión de AQP4 y GFAP en vesículas presentes en el LCR de casos con hidrocefalia y controles.



**Fig.35 modelo de expresión de la AQP4 y GFAP en las microvesículas del LCR.** En verde se representa los filamentos intermedios GFAP positivos y en azul se representa la expresión de AQP4.



## ***Conclusiones***



## **E. CONCLUSIONES**

- 1** La AQP1 inicia su expresión en los plexos coroideos telencefálicos humanos a la 7<sup>a</sup> semanas de la gestación, formando pequeños focos inmunoreactivos, que progresan de distal a proximal.
- 2** En los casos con hidrocefalia obstructiva, la AQP1 se internaliza e incluso cambia la polaridad de su expresión, marcando principalmente la membrana basal del epitelio coroidal.
- 3** La AQP4 sigue un programa de expresión que va de medial a lateral. Se propone como un marcador de gliogénesis específico en humanos, ya que marca: glía radial, progenitores intermedios, astrocitos inmaduros y astrocitos maduros.
- 4** Se propone la AQP4 como un marcador de linaje endimario humano, puesto que marca el epéndimo desde que se diferencia como tal, y permite además, discriminar entre el epéndimo embrionaria-fetal (que expresa la AQP4 en el polo apical) y el epéndimo maduro (que presenta la AQP4 en la membrana basolateral).
- 5** La AQP4 está implicada en la disrupción del endimio que acontece en la hidrocefalia humana a edades tempranas de la gestación.
- 6** La AQP4 se expresa claramente en la glía activada en pacientes con hidrocefalia congénita.
- 7** La glía radial específica de humanos que expresa AQP4, está desorganizada en los casos de hidrocefalia obstructiva.
- 8** La AQP1 está incrementada significativamente en el LCR de los casos de hidrocefalia obstructiva, frente a los casos controles y comunicantes. Por lo

que, se propone como biomarcador para el diagnóstico diferencial entre los diferentes tipos hidrocefalia congénita.

- 9** La AQP4 está incrementada significativamente en las vesículas del LCR provenientes de los casos con hidrocefalia obstructiva. Por lo tanto, se propone como biomarcador de diagnóstico precoz de la hidrocefalia congénita.

## ***Referencias***



## F. REFERENCIAS.

Atkinson, J. C., & Baum, B. (2009). *Aquaporins. Handbook of Experimental Pharmacology*. E. Beitz (Ed.). Springer.

Agre, P. E. T. E. R., Preston, G. M., Smith, B. L., Jung, J. S., Raina, S. U. R. A. B. H. I., Moon, C. H. U. L. S. O., ... & Nielsen, S. B. R. E. N. (1993). Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 265(4), F463-F476.

Attardo, A., Calegari, F., Haubensak, W., Wilsch-Brauninger, M., & Huttner, W. B. (2008). Live imaging at the onset of cortical neurogenesis reveals differential appearance of the neuronal phenotype in apical versus basal progenitor progeny. *PloS one*, 3(6), e2388-e2388.

Barres, B. A. (2008). The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron*, 60(3), 430-440.

Bianco, F., Perrotta, C., Novellino, L., Francolini, M., Riganti, L., Menna, E., ... & Verderio, C. (2009). Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells. *The EMBO journal*, 28(8), 1043-1054.

Bloch, O., Auguste, K. I., Manley, G. T., & Verkman, A. S. (2006). Accelerated progression of kaolin-induced hydrocephalus in aquaporin-4-deficient mice. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 26(12), 1527-1537.

Blocher, J., Eckert, I., Elster, J., Wiefek, J., Eiffert, H., & Schmidt, H. (2011). Aquaporins AQP1 and AQP4 in the cerebrospinal fluid of bacterial meningitis patients. *Neuroscience letters*, 504(1), 23-27.

Bovolenta, P., Wandosell, F., & Nieto-Sampedro, M. (1991). CNS glial scar tissue: a source of molecules which inhibit central neurite outgrowth. *Progress in brain research*, 94, 367-379.

- Brazel, C. Y., Romanko, M. J., Rothstein, R. P., & Levison, S. W. (2003). Roles of the mammalian subventricular zone in brain development. *Progress in neurobiology*, 69(1), 49-69.
- Brian, O. K., Tom, P., & Wang, D. (2010). Aquaporins: relevance to cerebrospinal fluid physiology and therapeutic potential in hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Res*, 7(15.10), 1186.
- Brightman MW. (1968). The intracerebral movement of proteins injected into blood and cerebrospinal fluid of mice. *Brain Barrier Systems*, 29, 19.
- Brightman, M. W., & Palay, S. L. (1963). The fine structure of ependyma in the brain of the rat. *The Journal of cell biology*, 19(2), 415-439.
- Buddensiek, J., Dressel, A., Kowalski, M., Runge, U., Schroeder, H., Hermann, A., ... & Sabolek, M. (2010). Cerebrospinal fluid promotes survival and astroglial differentiation of adult human neural progenitor cells but inhibits proliferation and neuronal differentiation. *BMC neuroscience*, 11(1), 48.
- Buddensiek, J., Dressel, A., Kowalski, M., Storch, A., & Sabolek, M. (2009). Adult cerebrospinal fluid inhibits neurogenesis but facilitates gliogenesis from fetal rat neural stem cells. *Journal of neuroscience research*, 87(14), 3054-3066.
- Carmona-Calero, E. M., Gonzalez-Toledo, J. M., Castañeyra-Ruiz, L., González-Marrero, I., Castañeyra-Ruiz, M., Rancel-Torres, N., ... & Castañeyra-Perdomo, A. (2015). Expression of aquaporin-1 in the choroid plexus in communicating and non-communicating hydrocephalic rats. *Eur. J. Anat*, 19(2), 125-129.
- Cavazzin, C., Ferrari, D., Facchetti, F., Russignan, A., Vescovi, A. L., La Porta, C. A., & Gritti, A. (2006). Unique expression and localization of aquaporin-4 and aquaporin-9 in murine and human neural stem cells and in their glial progeny. *Glia*, 53(2), 167-181.
- Chae, T. H., Kim, S., Marz, K. E., Hanson, P. I., & Walsh, C. A. (2004). The hsh mutation uncovers roles for  $\alpha$ Snap in apical protein localization and control of neural cell fate. *Nature genetics*, 36(3), 264-270.

- Dandy, W. E. (1919). Experimental hydrocephalus. *Annals of surgery*, 70(2), 129.
- Davet, J., Clavel, B., Datas, L., Mani-Ponset, L., Maurel, D., Herbuté, S., ... & Gabrion, J. (1998). Choroidal readaptation to gravity in rats after spaceflight and head-down tilt. *Journal of Applied Physiology*, 84(1), 19-29.
- Davson, H., & Segal, M. B. (1996). *Physiology of the CSF and blood-brain barriers* (pp. 489-523). Boca Raton: CRC press.
- De Juan Romero, C., & Borrell, V. (2015). Coevolution of radial glial cells and the cerebral cortex. *Glia*.
- Del Bigio, M. R. (1995). The ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia*, 14(1), 1-13.
- Deng, Y. Y., Lu, J., Ling, E. A., & Kaur, C. (2010). Microglia-Derived Macrophage Colony Stimulating Factor Promotes Generation of Proinflammatory Cytokines by Astrocytes in the Periventricular White Matter in the Hypoxic Neonatal Brain. *Brain Pathology*, 20(5), 909-925.
- Doetsch, F., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (1997). Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *The Journal of neuroscience*, 17(13), 5046-5061.
- Domínguez-Pinos, M. D., Páez, P., Jiménez, A. J., Weil, B., Arráez, M. A., & Rodríguez, E. M. (2005). Ependymal denudation and alterations of the subventricular zone occur in human fetuses with a moderate communicating hydrocephalus. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 64(7), 595-604.
- Ek, C. J., Habgood, M. D., Dziegielewska, K. M., & Saunders, N. R. (2003). Structural characteristics and barrier properties of the choroid plexuses in developing brain of the opossum (*Monodelphis domestica*). *Journal of Comparative Neurology*, 460(4), 451-464.

- El-Gammal, S. (1981). The development of the diencephalic choroid plexus in the chick. *Cell and tissue research*, 219(2), 297-311.
- El-Gammal, S. (1983). Regional surface changes during the development of the telencephalic choroid plexus in the chick. *Cell and tissue research*, 231(2), 251-263.
- Feng, X., Papadopoulos, M. C., Liu, J., Li, L., Zhang, D., Zhang, H., ... & Ma, T. (2009). Sporadic obstructive hydrocephalus in Aqp4 null mice. *Journal of neuroscience research*, 87(5), 1150-1155.
- Fietz, S. A., Kelava, I., Vogt, J., Wilsch-Bräuninger, M., Stenzel, D., Fish, J. L., ... & Huttner, W. B. (2010). OSVZ progenitors of human and ferret neocortex are epithelial-like and expand by integrin signaling. *Nature neuroscience*, 13(6), 690-699.
- Filippidis, A. S., Kalani, M. Y. S., & ReKate, H. L. (2012). *Hydrocephalus and aquaporins: the role of aquaporin-4* (pp. 55-58). Springer Vienna.
- Gato, Á., Moro, J. A., Alonso, M. I., Bueno, D., De La Mano, A., & Martin, C. (2005). Embryonic cerebrospinal fluid regulates neuroepithelial survival, proliferation, and neurogenesis in chick embryos. *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 284(1), 475-484.
- Giaume, C., Kirchhoff, F., Matute, C., Reichenbach, A., & Verkhratsky, A. (2007). Glia: the fulcrum of brain diseases. *Cell Death & Differentiation*, 14(7), 1324-1335.
- Gilbert, S. F. (2000). *Developmental Biology*. 6<sup>o</sup> edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts.
- Gomez, D. G., & Potts, D. G. (1981). The lateral, third, and fourth ventricle choroid plexus of the dog: a structural and ultrastructural study. *Annals of neurology*, 10(4), 333-340.

- Gömöri, É., Pál, J., Ábrahám, H., Vajda, Z., Sulyok, E., Seress, L., & Dóczi, T. (2006). Fetal development of membrane water channel proteins aquaporin-1 and aquaporin-4 in the human brain. *International journal of developmental neuroscience*, 24(5), 295-305.
- Götz, M., & Huttner, W. B. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(10), 777-788.
- Guerra, M. M., Henzi, R., Ortloff, A., Lichtin, N., Vío, K., Jiménez, A. J., ... & Rodríguez, E. M. (2015). Cell Junction Pathology of Neural Stem Cells Is Associated With Ventricular Zone Disruption, Hydrocephalus, and Abnormal Neurogenesis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 74(7), 653-671.
- Handler, M., Yurchenco, P. D., & Iozzo, R. V. (1997). Developmental expression of perlecan during murine embryogenesis. *Developmental dynamics*, 210(2), 130-145.
- Hansen, D. V., Lui, J. H., Parker, P. R., & Kriegstein, A. R. (2010). Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature*, 464(7288), 554-561.
- Jiménez, A. J., Rodríguez-Pérez, L. M., Domínguez-Pinos, M. D., Gómez-Roldán, M. C., García-Bonilla, M., Ho-Plagaro, A., ... & Pérez-Fígares, J. M. (2014). Increased levels of tumour necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) but not transforming growth factor-beta 1 (TGF $\beta$ 1) are associated with the severity of congenital hydrocephalus in the hyh mouse. *Neuropathology and applied neurobiology*, 40(7), 911-932.
- Jimenez, A. J., Tome, M., Paez, P., Wagner, C., Rodriguez, S., Fernandez-Llebrez, P., ... & Perez-Figares, J. M. (2001). A programmed ependymal denudation precedes congenital hydrocephalus in the hyh mutant mouse. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 60(11), 1105-1119.
- Johanson, C. (2008). Choroid plexus-CSF circulatory dynamics: Impact on brain growth, metabolism and repair. U: Conn P, Neuroscience in Medicine.

- Johansson, P. A., Dziegielewska, K. M., Ek, C. J., Habgood, M. D., Møllgård, K., Potter, A., ... & Saunders, N. R. (2005). Aquaporin-1 in the choroid plexuses of developing mammalian brain. *Cell and tissue research*, 322(3), 353-364.
- Jukkola, P., Guerrero, T., Gray, V., & Gu, C. (2013). Astrocytes differentially respond to inflammatory autoimmune insults and imbalances of neural activity. *Acta Neuropathol Commun*, 1(1), 70.
- Kahle, P. J., Jakowec, M., Teipel, S. J., Hampel, H., Petzinger, G. M., Di Monte, D. A., ... & Murphy, G. M. (2000). Combined assessment of tau and neuronal thread protein in Alzheimer's disease CSF. *Neurology*, 54(7), 1498-1504.
- Kalani, M. Y. S., Filippidis, A. S., & ReKate, H. L. (2012). *Hydrocephalus and aquaporins: the role of aquaporin-1* (pp. 51-54). Springer Vienna.
- Kim, J. H., Min, K. J., Seol, W., Jou, I., & Joe, E. H. (2010). Astrocytes in injury states rapidly produce anti-inflammatory factors and attenuate microglial inflammatory responses. *Journal of neurochemistry*, 115(5), 1161-1171.
- King, L. S., Nielsen, S., & Agre, P. (1996). Aquaporin-1 water channel protein in lung: ontogeny, steroid-induced expression, and distribution in rat. *Journal of Clinical Investigation*, 97(10), 2183.
- Knobloch, S. M., Fan, L., & Faden, A. I. (1999). Early neuronal expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  after experimental brain injury contributes to neurological impairment. *Journal of neuroimmunology*, 95(1), 115-125.
- Kriegstein, A., & Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual review of neuroscience*, 32, 149.
- Landoni, V. I., Schierloh, P., de Campos Nebel, M., Fernández, G. C., Calatayud, C., Laponi, M. J., & Isturiz, M. A. (2012). Shiga toxin 1 induces on lipopolysaccharide-treated astrocytes the release of tumor necrosis factor-alpha that alter brain-like endothelium integrity. *PLoS Pathog*, 8(3), e1002632.

- Li, X., Kong, H., Wu, W., Xiao, M., Sun, X., & Hu, G. (2009). Aquaporin-4 maintains ependymal integrity in adult mice. *Neuroscience*, 162(1), 67-77.
- Lioy, D. T., Garg, S. K., Monaghan, C. E., Raber, J., Foust, K. D., Kaspar, B. K., ... & Mandel, G. (2011). A role for glia in the progression of Rett's syndrome. *Nature*, 475(7357), 497-500.
- Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T. J., Eccles, J. D., Rouhani, S. J., Peske, J. D., ... & Kipnis, J. (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*.
- Lui, J. H., Hansen, D. V., & Kriegstein, A. R. (2011). Development and evolution of the human neocortex. *Cell*, 146(1), 18-36.
- Malagón-Valdez, J. (2006). Hidrocefalia congénita. *Rev Neurol*, s39-s44.
- Malatesta, P., Appolloni, I., & Calzolari, F. (2008). Radial glia and neural stem cells. *Cell and tissue research*, 331(1), 165-178.
- Malatesta, P., Hack, M. A., Hartfuss, E., Kettenmann, H., Klinkert, W., Kirchhoff, F., & Götz, M. (2003). Neuronal or glial progeny: regional differences in radial glia fate. *Neuron*, 37(5), 751-764.
- Mao, X., Enno, T. L., & Del Bigio, M. R. (2006). Aquaporin 4 changes in rat brain with severe hydrocephalus. *European Journal of Neuroscience*, 23(11), 2929-2936.
- Martin, C., Alonso, M. I., Santiago, C., Moro, J. A., De la Mano, A., Carretero, R., & Gato, A. (2009). Early embryonic brain development in rats requires the trophic influence of cerebrospinal fluid. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 27(7), 733-740.
- Mashayekhi, F., Draper, C. E., Bannister, C. M., Pourghasem, M., Owen-Lynch, P. J., & Miyan, J. A. (2002). Deficient cortical development in the hydrocephalic Texas (H-Tx) rat: a role for CSF. *Brain*, 125(8), 1859-1874.
- Masseguin, C., Mani-Ponset, L., Herbuté, S., Tixier-Vidal, A., & Gabrion, J. (2001). Persistence of tight junctions and changes in apical structures and protein

- expression in choroid plexus epithelium of rats after short-term head-down tilt. *Journal of neurocytology*, 30(5), 365-377.
- McAllister, J. P. (2012, October). Pathophysiology of congenital and neonatal hydrocephalus. In *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* (Vol. 17, No. 5, pp. 285-294). WB Saunders.
- McAllister, J. P., & Miller, J. M. (2010). Research Minocycline inhibits glial proliferation in the H-Tx rat model of congenital hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Research* (7)7
- Milhorat, T. H. (1972). *Hydrocephalus and the cerebrospinal fluid*. Williams and Wilkins.
- Miller, J. M., & McAllister, J. P. (2007). Reduction of astrogliosis and microgliosis by cerebrospinal fluid shunting in experimental hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Res*, 4(5), 8454-4.
- Misson, J. P., Edwards, M. A., Yamamoto, M., & Caviness, V. S. (1988). Mitotic cycling of radial glial cells of the fetal murine cerebral wall: a combined autoradiographic and immunohistochemical study. *Developmental Brain Research*, 38(2), 183-190.
- Miyan, J. A., Nabiyouni, M., & Zendah, M. (2003). Development of the brain: a vital role for cerebrospinal fluid. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 81(4), 317-328.
- Molofsky, A. V., Krenick, R., Ullian, E., Tsai, H. H., Deneen, B., Richardson, W. D., ... & Rowitch, D. H. (2012). Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes & development*, 26(9), 891-907.
- Naureen, I., Waheed, K. A. I., Rathore, A. W., Victor, S., Mallucci, C., Goodden, J. R., ... & Miyan, J. A. (2014). Fingerprint changes in CSF composition associated with different aetiologies in human neonatal hydrocephalus: inflammatory cytokines. *Child's Nervous System*, 30(7), 1155-1164.

- Nielsen, S., Nagelhus, E. A., Amiry-Moghaddam, M., Bourque, C., Agre, P., & Ottersen, O. P. (1997). Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *The Journal of neuroscience*, 17(1), 171-180.
- O’Rahilly R., Müller F., (1990). Ventricular system and choroid plexuses of the human brain during the embryonic period proper. *American Journal of Anatomy* (189) 285–302.
- Opportunities in Hydrocephalus Research: Pathways to Better Outcomes (2012) Seattle, WA | July 9-11.
- Oshio, K., Song, Y., Verkman, A. S., & Manley, G. T. (2003). Aquaporin-1 deletion reduces osmotic water permeability and cerebrospinal fluid production. In *Brain Edema XII* (pp. 525-528). Springer Vienna.
- Otani H., Tanaka O. (1988). Development of the choroid plexus anlage and supraependymal structures in the fourth ventricular roof plate of human embryos: scanning electron microscopic observations. *American Journal of Anatomy* (181) 53–66.
- Páez, P., Bátiz, L. F., Roales-Buján, R., Rodríguez-Perez, L. M., Rodríguez, S., Jiménez, A. J., ... & Pérez-Fígares, J. M. (2007). Patterned neuropathologic events occurring in hyh congenital hydrocephalic mutant mice. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 66(12), 1082-1092.
- Pattisapu, J. V. (2001). Etiology and clinical course of hydrocephalus. *Neurosurgery Clinics of North America*, 12(4), 651-9.
- Perez-Figares, J. M., Jimenez, A. J., Perez-Martin, M., Fernandez-Llebrez, P., Cifuentes, M., Riera, P., ... & Rodríguez, E. M. (1998). Spontaneous congenital hydrocephalus in the mutant mouse hyh. Changes in the ventricular system and the subcommissural organ. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 57(2), 201-202.

- Pino, R. M. (1985). Restriction to endogenous plasma proteins by a fenestrated capillary endothelium: an ultrastructural immunocytochemical study of the choriocapillary endothelium. *American journal of anatomy*, 172(4), 279-289.
- Pollay M., Fullenwider C., Roberts PA., Stevens FA. (1983). Effect of mannitol and furosemide on blood-brain osmotic gradient and intracranial pressure. *J Neurosurg.* 59 (6):945-50
- Praetorius, J., & Nielsen, S. (2006). Distribution of sodium transporters and aquaporin-1 in the human choroid plexus. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 291(1), C59-C67.
- Preston, G. M., & Agre, P. (1991). Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(24), 11110-11114.
- Pudenz, R. H. (1981). The surgical treatment of hydrocephalus—an historical review. *Surgical neurology*, 15(1), 15-26.
- Rakic, P. (2007). The radial edifice of cortical architecture: from neuronal silhouettes to genetic engineering. *Brain research reviews*, 55(2), 204-219.
- Raposo, G., & Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of cell biology*, 200(4), 373-383.
- Rash, J. E., Yasumura, T., Hudson, C. S., Agre, P., & Nielsen, S. (1998). Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(20), 11981-11986.
- Redzic, Z. B., Preston, J. E., Duncan, J. A., Chodobski, A., & Szymdynger-Chodobska, J. (2005). The Choroid Plexus-Cerebrospinal Fluid System: From Development to Aging. *Current topics in developmental biology*, 71, 1-52.

- Reillo, I., de Juan Romero, C., García-Cabezas, M. Á., & Borrell, V. (2011). A role for intermediate radial glia in the tangential expansion of the mammalian cerebral cortex. *Cerebral Cortex*, 21(7), 1674-1694.
- Rekate, H. L. (2008). The definition and classification of hydrocephalus: a personal recommendation to stimulate debate. *Cerebrospinal Fluid Res*, 5(2), 2.
- Rekate, H. L. (2009, March). A contemporary definition and classification of hydrocephalus. In *Seminars in pediatric neurology* (Vol. 16, No. 1, pp. 9-15). WB Saunders.
- Renault-Mihara, F., Okada, S., Shibata, S., Nakamura, M., Toyama, Y., & Okano, H. (2008). Spinal cord injury: emerging beneficial role of reactive astrocytes' migration. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 40(9), 1649-1653.
- Rizvi, R., & Anjum, Q. (2005). Hydrocephalus in children. *Journal Pakistan medical association*, 55:11, 502.
- Roales-Buján, R., Páez, P., Guerra, M., Rodríguez, S., Vío, K., Ho-Plagaro, A., ... & Jiménez, A. J. (2012). Astrocytes acquire morphological and functional characteristics of ependymal cells following disruption of ependyma in hydrocephalus. *Acta neuropathologica*, 124(4), 531-546.
- Rowitch, D. H., & Kriegstein, A. R. (2010). Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature*, 468(7321), 214-222.
- Russell, D. S. (1968). *Observations on the pathology of hydrocephalus* (No. 265). HM Stationery Office.
- Sánchez, J. C. (2003). Acuaporinas: proteínas mediadoras del transporte de agua. *Colombia Médica*, 34(4), 220-227.
- Segal, M. B. (1993). Extracellular and cerebrospinal fluids. *Journal of inherited metabolic disease*, 16(4), 617-638.

- Shen, L. (2012). Tight junctions on the move: molecular mechanisms for epithelial barrier regulation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1258(1), 9-18.
- Shen, X. Q., Miyajima, M., Ogino, I., & Arai, H. (2006). Expression of the water-channel protein aquaporin 4 in the H-Tx rat: possible compensatory role in spontaneously arrested hydrocephalus. *Journal of Neurosurgery: Pediatrics*, 105(6), 459-464.
- Silverberg, G. D., Heit, G., Huhn, S., Jaffe, R. A., Chang, S. D., Bronte-Stewart, H., ... & Saul, T. A. (2001). The cerebrospinal fluid production rate is reduced in dementia of the Alzheimer's type. *Neurology*, 57(10), 1763-1766.
- Slezak, M., & Pfrieder, F. W. (2003). New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. *Trends in neurosciences*, 26(10), 531-535.
- Spassky, N., Merkle, F. T., Flames, N., Tramontin, A. D., García-Verdugo, J. M., & Alvarez-Buylla, A. (2005). Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *The Journal of neuroscience*, 25(1), 10-18.
- Speake, T., Kibble, J. D., & Brown, P. D. (2004). Kv1. 1 and Kv1. 3 channels contribute to the delayed-rectifying K<sup>+</sup> conductance in rat choroid plexus epithelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 286(3), C611-C620.
- Sturrock RR. (1979). A morphological study of the development of the mouse choroid plexus. *Journal of Anatomy* (129), 777–793
- Sturrock RR. 1979. A morphological study of the development of the
- Sturrock RR. 1979. A morphological study of the development of the
- Tarkowski, E., Tullberg, M., Fredman, P., & Wikkelso, C. (2003). Normal pressure hydrocephalus triggers intrathecal production of TNF- $\alpha$ . *Neurobiology of aging*, 24(5), 707-714.

- Tarnaris, A., Watkins, L. D., & Kitchen, N. D. (2006). Biomarkers in chronic adult hydrocephalus. *Cerebrospinal Fluid Res*, 3(11), 8454-3.
- Tennyson VM., Pappas GD. (1964). Fine structure of the developing telencephalic and myelencephalic choroid plexus in the rabbit. *Journal of Compaparative Neurology* (123) 379–412.
- Tirapelli, D. P. D. C., Lopes, L. D. S., Lachat, J. J., Colli, B. O., & Tirapelli, L. F. (2007). Ultrastructural study of the lateral ventricle choroid plexus in experimental hydrocephalus in Wistar rats. *Arquivos de neuro-psiquiatria*,65(4A), 974-977.
- Tokuda, T., & Kida, S. (2015). New findings and concepts on production and absorption of cerebrospinal fluid: reconsiderations and revisions of an unquestioningly accepted dogma of 100 years]. *Brain and nerve= Shinkei kenkyu no shinpo*, 67(5), 617-626.
- Tramontin, A. D., García-Verdugo, J. M., Lim, D. A., & Alvarez-Buylla, A. (2003). Postnatal development of radial glia and the ventricular zone (VZ): a continuum of the neural stem cell compartment. *Cerebral Cortex*, 13(6), 580-587.
- Utsumi, H., Chiba, H., Kamimura, Y., Osanai, M., Igarashi, Y., Tobioka, H., ... & Sawada, N. (2000). Expression of GFR $\alpha$ -1, receptor for GDNF, in rat brain capillary during postnatal development of the BBB. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 279(2), C361-C368.
- Venters, H. D., Dantzer, R., & Kelley, K. W. (2000). A new concept in neurodegeneration: TNF $\alpha$  is a silencer of survival signals. *Trends in neurosciences*, 23(4), 175-180. **a**
- Venters, H. D., Dantzer, R., & Kelley, K. W. (2000). Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Induces Neuronal Death by Silencing Survival Signals Generated by the Type I Insulin-Like Growth Factor Receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 917(1), 210-220. **b**

- Verderio, C., Muzio, L., Turola, E., Bergami, A., Novellino, L., Ruffini, F., ... & Furlan, R. (2012). Myeloid microvesicles are a marker and therapeutic target for neuroinflammation. *Annals of neurology*, 72(4), 610-624.
- Verkman, A. S., Binder, D. K., Bloch, O., Auguste, K., & Papadopoulos, M. C. (2006). Three distinct roles of aquaporin-4 in brain function revealed by knockout mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(8), 1085-1093.
- Vetsika, E. K., Bannister, C. M., Buckle, A. M., & Miyan, J. A. (1999). The effects of CSF blockage in early-onset hydrocephalus on the activity of the germinal epithelium. *European journal of pediatric surgery: official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery...[et al]= Zeitschrift fur Kinderchirurgie*, 9, 43-44.
- Wagner, C., Batiz, L. F., Rodriguez, S., Jimenez, A. J., Paez, P., Tome, M., Pérez-Figares, J. M., and Rodriguez, E. M. (2003). Cellular mechanisms involved in the stenosis and obliteration of the cerebral aqueduct of hsh mutant mice developing congenital hydrocephalus. *J Neuropathol Exp Neurol* 62: 1019-40.
- Wang, D., Nykanen, M., Yang, N., Winlaw, D., North, K., Verkman, A. S., & Oowler, B. K. (2011). Altered cellular localization of aquaporin-1 in experimental hydrocephalus in mice and reduced ventriculomegaly in aquaporin-1 deficiency. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 46(1), 318-324.
- Watters, O., Pickering, M., & O'Connor, J. J. (2011). Preconditioning effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  and glutamate on calcium dynamics in rat organotypic hippocampal cultures. *Journal of neuroimmunology*, 234(1), 27-39.
- Weller, R. O., & Wisniewski, H. (1969). Histological and ultrastructural changes with experimental hydrocephalus in adult rabbits. *Brain*, 92(4), 819-828.
- Zaki W. (1981). Ultrastructure of the choroid plexus and its development in the mouse. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*. (95) 919–135.

Zheng, G. Q., Li, Y., Gu, Y., Chen, X. M., Zhou, Y., Zhao, S. Z., & Shen, J. (2010). Beyond water channel: aquaporin-4 in adult neurogenesis. *Neurochemistry international*, 56(5), 651-654.

Zheng, W., & Chodobski, A. (Eds.). (2005). *The blood-cerebrospinal fluid barrier*. CRC Press.