



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

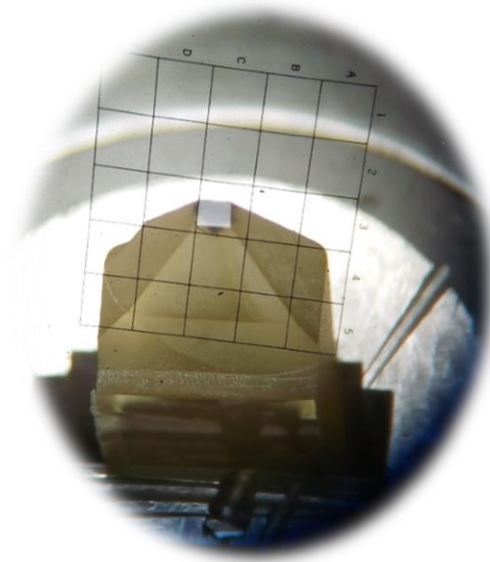
Grao en Bioloxía

Memoria do Traballo de Fin de Grao

**ESTUDO ULTRAESTRUTURAL DO PLEXO COROIDEO NO
PEIXE ZEBRA (*DANIO RERIO*)**

**ESTUDIO ULTAESTRUTURAL DEL PLEXO COROIDEO EN
EL PEZ CEBRA (*DANIO RERIO*)**

**ULTRASTRUCTURAL STUDY OF THE CHOROID PLEXUS IN
THE ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)**



Vanessa Pérez Miniño

Febreiro, 2019

Titor académico: Julián Yáñez Sánchez

Imaxe da portada: fotografía dun molde de inclusión para microscopía electrónica vista dende o ultramicrótomo.



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

JULIÁN YÁÑEZ SÁNCHEZ, Catedrático de Bioloxía Celular do Departamento de Bioloxía da Facultade de Ciencias da Universidade da Coruña,

INFORMA:

Que o Traballo de Fin de Grao titulado “Estudo ultraestrutural do plexo coroideo no peixe cebrá (*Danio rerio*)” presentado pola alumna Vanessa Pérez Miniño foi realizado baixo a miña dirección.

Considerándoo finalizado, autorizo a súa presentación e defensa.

A Coruña, 15 de febreiro do 2018.

Fdo:

Dr. Julián Yáñez

ÍNDICE

RESUMO/RESUMEN/ABSTRACT	1
INTRODUCCIÓN	3
O peixe cebra	3
O peixe cebra como modelo biolóxico	4
Os plexos coroideos	6
Os plexo coroideo posterior de <i>Danio</i> e a súa comparación con outras especies	7
OBXETIVOS	8
MATERIAL E MÉTODOS	9
Material biolóxico: obtención e procesamento	9
Fixación	9
Inclusión	9
Seccionado	9
Tinguido/contrastado	9
Observación, obtención e procesamento das imaxes	10
RESULTADOS E DISCUSIÓN	10
ESTRUTURA DO PLEXO COROIDEO	10
ULTRAESTRUTURA DO PLEXO COROIDEO	11
Rexión apical das células coroideas	11
Rexión intermedia	14
Rexión basolateral	16
Parte basal	16
Parte lateral	18
Lumen	19
CONCUSIÓN/CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	20
AGRADECEMENTOS	21
BIBLIOGRAFÍA	22

ÍNDICE DE FIGURAS

- Fig. 1. Peixe cebra (*Danio rerio*) onde se aprecian as súas características morfolóxicas 3
- Fig. 2. Diferencias morfolóxicas externas entre femias e machos do peixe cebra (*Danio rerio*) 3
- Fig. 3. Comparación do peixe cebra (*Danio rerio*) con dous dos modelos biolóxicos máis utilizados no laboratorio (*Drosophila melanogaster* e *Mus musculus*) e as súas vantaxes con respecto a eles 5
- Fig. 4. Esquema dunha sección transversal dunha vilosidade coroidea de mamíferos 8
- Fig. 5. Estrutura do plexo coroideo (posterior) no peixe cebra (*Danio rerio*) 11
- Fig. 6. Ultraestrutura da superficie apical do plexo coroideo posterior no peixe cebra (*Danio rerio*) 13
- Fig. 7. Ultraestrutura dos orgánulos que acompañan ó núcleo do plexo coroideo posterior no peixe cebra (*Danio rerio*) 15
- Fig. 8. Ultraestrutura da rexión basolateral e microvasculatura do plexo coroideo no peixe cebra (*Danio rerio*) 17
- Fig. 9. Identificación da célula de Kolmer no lumen do plexo coroideo posterior do peixe cebra (*Danio rerio*) 19

ABREVIATURAS

C: Cilios

Cap: Capilar

Cb: Corpo basal

CK: Célula de Kolmer

Cmv: Corpo multivesicular

Cs: Célula sanguínea

D: Desmosoma

EE: Espacio estromal

E: Endosoma

end: Endotelio

F: Fibroblasto

Fc: Fibras de colágeno

FI: Filamentos intermedios

G: Complejo de Golgi

L: Lumen

LB: Lámina basal

LCR: Líquido cefalorraquídeo

Ly: Lisosoma

M: Melanóforos

Mf: Microfilamentos

Mit: Mitocondria

Mv: Microvilosidad

N: Núcleo

P: Pericito

PC: Plexo coroideo

PCs: Plexos coroideos

RER: Retículo Endoplasmático Rugoso

Vr: Vesícula revestida

TF: Tampón fosfato

ZA: *Zonula Adhaerens*

ZO: *Zonula Occludens*

RESUMO

O plexo coroideo é un tecido secretor formado por un pregue vascular e por un epitelio derivado do revestimento endimario dos ventrículos. O peixe cebrá (*Danio rerio*) é un destacado modelo biolóxico polo seu parecido co ser humano, pero a pesar da multitude de estudos realizados nel, sábese moi pouco dos plexos coroideos de dita especie. No presente traballo realizouse un estudo estrutural e ultraestrutural con microscopía electrónica de transmisión no plexo coroideo rombencefálico do peixe cebrá que nos permite confirmar que se trata dunha estrutura repregada que consta dun epitelio monoestratificado asociado a unha rede de capilares sanguíneos fenestrados. Ademais, a abundancia de vesículas revestidas na superficie apical das células epiteliais suxire un importante papel da endocitose na renovación do líquido cefalorraquídeo. A análise comparada dos resultados deste estudo cos plexos coroideos doutros peixes e vertebrados confirman que se trata dunha estrutura altamente conservada na evolución.

Palabras chave: Tela coroidea, barreira sangue-LCR, célula de Kolmer, teleósteos.

RESUMEN

El plexo coroideo es un tejido secretor formado por un pliegue vascular y por un epitelio derivado del revestimiento endimario de los ventrículos. El pez cebrá (*Danio rerio*) es un destacado modelo biológico por su parecido con el ser humano, pero a pesar de la multitud de estudios realizados en él, se sabe muy poco de los plexos coroideos de dicha especie. En el presente trabajo se realizó un estudio estructural y ultraestructural con microscopía electrónica de transmisión en el plexo coroideo rombencefálico del pez cebrá que nos permite confirmar que se trata de una estructura repregada que consta de un epitelio monoestratificado asociado a una red de capilares sanguíneos fenestrados. Además, la abundancia de vesículas revestidas en la superficie apical de las células epiteliales sugiere un importante papel de la endocitosis en la renovación del líquido cefalorraquídeo. El análisis comparado de los resultados de este estudio con los plexos coroideos de otros peces y vertebrados confirma que se trata de una estructura altamente conservada en la evolución.

Palabras clave: Tela coroidea, barrera sangre-LCR, célula de Kolmer, teleósteos.

ABSTRACT

The choroid plexus is a secretory tissue consisting of a folded vascular layer and an epithelium derived from the ventricles ependymal lining. The zebrafish (*Danio rerio*) is an outstanding model for its biological similarities with humans, but despite a number of studies in these species, we know very little about the choroid plexuses of this organism. In present work we carried out a structural and ultrastructural study with transmission electron microscopy in the rhombencephalic choroid plexus of the zebrafish allowing us to confirm that it is a folded structure consisting on a monostratified epithelium associated with a network of fenestrated blood capillaries. In addition, the abundance of coated vesicles on the apical surface of the epithelial cells suggest an important role of the endocytosis in the renewal of the cerebrospinal fluid. The comparative analysis of the results of this study with other fish and vertebrate confirms this structure as highly conserved through evolution.

Key words: Tela Choroidea, blood-LCR barrier, Kolmer cell, teleost.

INTRODUCCIÓN

O peixe cebra

Hamilton Buchanan, na década de 1822, estableceu o xénero *Danio* e describiu varias especies baixo este xénero, entre as cales se encontra o peixe cebra (*Danio rerio*) (Barman, 1991). En 1916 foi relegado ó subxénero *Brachydanio* por presentar 7 franxas dorsais e unha liña lateral incompleta (Laale, 1977). Finalmente tras varios estudos morfolóxicos, moleculares e filoxenéticos foi reasignado ó xénero *Danio* (Spence *et al.*, 2008).

O peixe cebra pertence ó Xénero *Danio*, Subfamilia *Danioninae*, Familia *Cyprinidae*, Superfamilia *Cyprinoidea*, Orde *Cypriniformes*, Serie *Otophysi*, Superorde *Ostariophysi*, División *Teleostei*, Subclase *Neopterygii*, Clase *Actinopterygii*, Subgrao *Osteichthyes*, Grao *Teleostomi*, Superclase *Gnathostomata*, Subfilo *Craniata*, Filo *Chordata* (Nelson, 2006).

Son peixes de corpo alongado, fusiforme e comprimido lateralmente, que rara vez exceden os 40 mm de lonxitude (Barman, 1991). Cubertos por escamas cicloides de forma e dimensión variadas que lle confiren unha cor de base dourada (Fernández Vega, 2015). Caracterízanse por presentar de 5 a 7 franxas lonxitudinais de cor azul escuro que se estenden dende o opérculo ata o final da aleta caudal, unha liña lateral incompleta que se estende ata a base da aleta pelviana e 2 pares de finas barbas (Barman, 1991). A aleta anal ten raias similares



Figura 1. Peixe cebra (*Danio rerio*) onde se aprecian as súas características morfolóxicas. O individuo corresponde a unha femia adulta . Fonte: <http://www.vivelanaturaleza.com/especie-peiz-cebra-danio-rerio.php>

á caudal mentres que a dorsal presenta un borde superior azul escuro, bordeado de branco (Spence *et al.*, 2008). A boca sitúase nunha posición oblicua e terminal, dirixida cara arriba, na que a mandíbula inferior sobresa máis que a superior e os ollos son centrais (Fig. 1) (Barman, 1991).

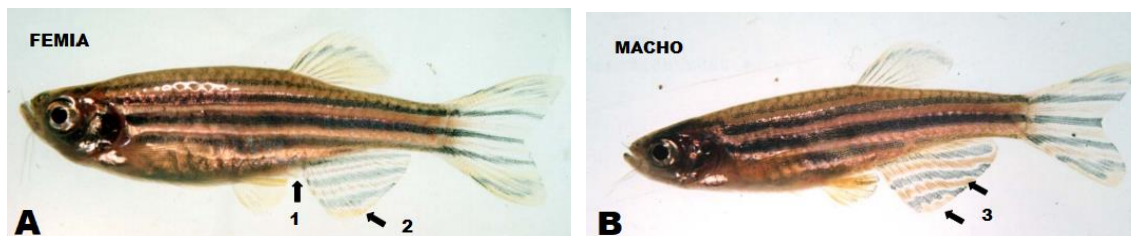


Figura 2. Diferencias morfolóxicas externas entre femias e machos do peixe cebra (*Danio rerio*). (A) Femia, de maior tamaño, co ventre máis avultado e cor lixeiramente máis pálido, tanto no ventre como na aleta anal (2). Nótese a presenza dunha papila xenital na femia (1). (B) Macho, de corpo máis delgado e tonalidade máis escura, tanto no ventre como na aleta anal (3). Modificado de: Pritchard, 2001.

Presentan certo dimorfismo sexual (Fig. 2) xa que os machos teñen aletas anais máis grandes, máis finas e máis amarelas que as femias (Laale, 1977; Pritchard, 2001) e a pesar de ter unha coloración similar os machos son dunha tonalidade dourada no ventre mentres que as femias presentan unha cor máis pálida (Westerfield, 1994) ou prateada. Ademais as femias son máis grandes que os machos (Spence et al., 2008) e teñen o ventre máis avultado (Fernández Vega, 2015).

É orixinario das cuncas hidrográficas do Sur de Asia, dende Paquistán ata Bangladesh, incluíndo a maioría das cuncas hidrográficas da India e Nepal así como do Sueste asiático, Myanmar (Birmania) e da illa de Sri Lanka (Barman, 1991; Spence et al., 2008; Engeszer et al. 2007a). Encontrándose, máis comunmente, en estanques pouco profundos e corpos de auga estancados, frecuentemente en lugares sen sombra, con vexetación abundante e substratos limosos. Estes, aparecen a miúdo, cerca dos cultivos de arroz (Engeszer et al. 2007a; Pritchard, 2001; Spence et al., 2008) onde hai poucos predadores e abundante zooplancto, constituínte principal da súa dieta omnívora xunto con pequenos insectos (Spence et al., 2007a). Alí onde foron encontrados en ríos estaban relegados ás marxes e en pequenas cantidades (Engeszer et al. 2007a; Pritchard, 2001).

Ademais, foron rexistradas poboacións salvaxes do peixe cebra en Colombia, Malasia e o sur de EE.UU. Dada a popularidade da especie como peixe de acuario, é probable que estean establecidos noutros sitios (Pritchard, 2001).

O peixe cebra como modelo biolóxico

O peixe cebra (*Danio rerio*), converteuse nun importante modelo para a investigación biomédica dende que George Streisinger, na década dos 80, publicara un artigo onde suxire que o peixe cebra podería ser utilizado como modelo para a análise xenética do desenvolvemento embrionario en vertebrados (Maldonado, 2003), identificando os primeiros mutantes da especie e reducindo así as limitacións que ata o momento impedían a mutaxénese a gran escala en vertebrados (Rojas-Muñoz et al., 2007). Dende ese momento, o peixe cebra cobra importancia en numerosas investigacións xenéticas, de bioloxía do desenvolvemento, neurofisioloxía e biomedicina (Spence et al., 2008).

Foron tantas as investigacións levadas a cabo sobre o peixe cebra que o seu xenoma está completamente secuenciado e totalmente dispoñible en bases de datos como The Zebrafish Model Organism Database (ZFIN; <http://zfin.org>) facilitando así a creación de mutantes de peixe cebra que modelan enfermidades humanas específicas (Howe et al., 2017). O alto grao de semellanza xenética e fisiolóxica co ser humano foron de vital importancia para levar a cabo estas investigacións. Entre as semellanzas están o tipo de proteínas utilizadas para construír as diferentes partes do corpo, os mecanismos empregados para producir un organismo adulto e os procesos que marcan o seu envellecemento e morte (Rojas-Muñoz et al., 2007). Ademais de presentar moitas similitudes e homoloxías organizativas co encéfalo humano, especificamente a presenza dun encéfalo anterior, medio e posterior, e mostrando comportamentos complexos como a memoria, as respostas condicionadas e o aprendizaxe (Tavares & Santos Lopes, 2013). Así mesmo, a secuenciación do xenoma do peixe cebra revelou que o 71% dos xenos humanos teñen polo menos un ortólogo do peixe cebra, mentres que o 69% dos xenos do peixe cebra teñen polo menos un ortólogo humano (Howe et al., 2017).

Danio, igual que outros organismos modelo biolóxicos, como a mosca do vinagre (*Drosophila melanogaster*) ou o rato común (*Mus musculus*), presenta certas características, que os outros non posúen, que o fan atractivo para o estudo de laboratorio (Fig. 3), a saber:

- O seu pequeno tamaño permite manter grandes poboacións de forma fácil e económica no laboratorio (Spence *et al.*, 2008) cun custo entre 100 e 1000 veces menor có rato (Rojas-Muñoz *et al.*, 2007).
- As femias poden desovar cada 2-3 días (Spence *et al.*, 2008), obténdose de 200 a 500 embrións por parella á semana (Rojas-Muñoz *et al.*, 2007).
- Tempo aproximado de xeración de 3 meses, manténdose os adultos fértiles por máis de 12 meses. O que implica un subministro constante de embrións a baixo custo (Rojas-Muñoz *et al.*, 2007).
- Fecundación e desenvolvemento embrionario externos, xunto coa transparencia dos embrións fan posible a manipulación e o seguimento das primeiras etapas do desenvolvemento de vertebrados (Rojas-Muñoz *et al.*, 2007), así como seguir en detalle as primeiras divisións celulares, a formación das capas embrionarias e o desenvolvemento dos seus órganos internos (Maldonado, 2003).
- Tamaño dos ovos relativamente grande (0.7 mm antes da fertilización) en comparación con outros peixes (Spence *et al.*, 2008), o que facilita a súa manipulación.
- Desenvolvemento rápido (dentro das 36 horas) con precursores de todos os órganos principais (Spence *et al.*, 2008).

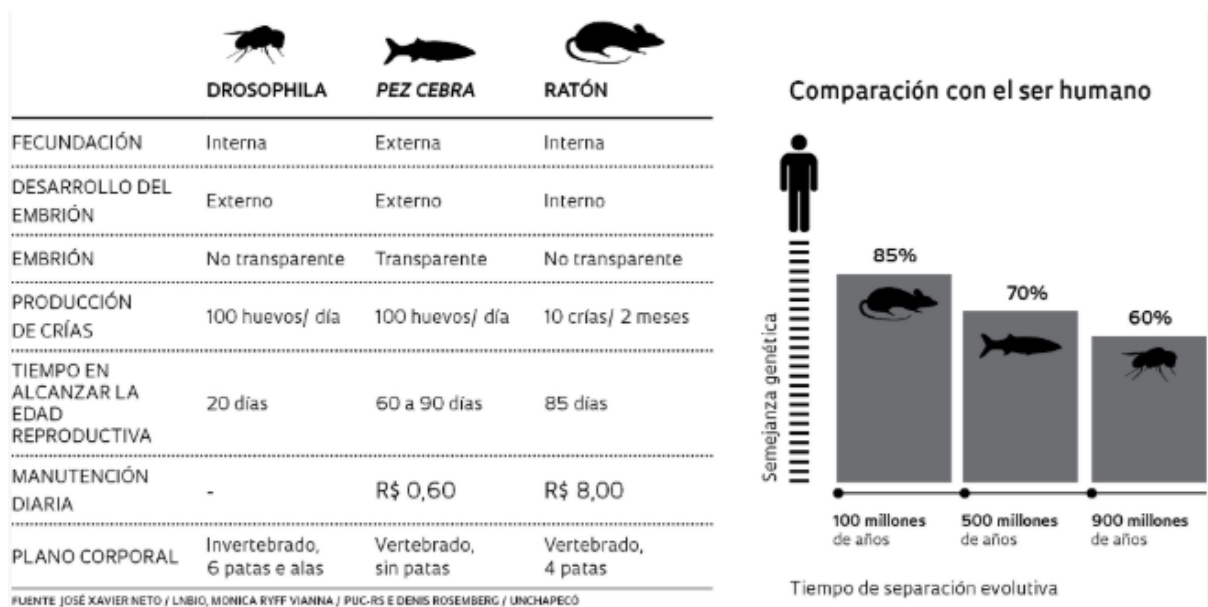


Figura 3. Comparación do peixe ceبرا (*Danio rerio*) con dous dos modelos biolóxicos máis utilizados no laboratorio (*Drosophila melanogaster* e *Mus musculus*) e as súas vantaxes con respecto a eles. Obsérvase a semellanza xenética co ser humano de cada un dos modelos biolóxicos: 85% co rato, 70% co peixe ceبرا e 60% con *Drosophila*. Fonte: <http://revistapesquisa.fapesp.br/es/2013/08/13/un-pezo-modelo/>

Por outro lado, *Danio*, a diferenza da maioría dos vertebrados, está capacitado para rexenerar diferentes estruturas da súa anatomía (Rojas-Muñoz *et al.*, 2007) como aletas amputadas, lesións encefálicas, a retina, a medula espiñal, o corazón, e outros tecidos polo que é moi utilizado en medicina rexenerativa (Gremberling *et al.*, 2013; Tavares & Santos Lopes, 2013).

Dende fai pouco é utilizado con fins terapéuticos para avaliar o efecto de numerosos compostos químicos así como para identificar novos medicamentos. E mesmo está empezando a ser utilizado en biotecnoloxía para detectar medios contaminados mediante mutantes bioluminiscentes (Rojas-Muñoz *et al.*, 2007; Tavares & Santos Lopes, 2013).

En resumo, co peixe cebra e a secuenciación do seu xenoma, produciron un gran número de liñas mutantes, técnicas especializadas para a marcaxe, transplantes de células, métodos para a destrución de xenos e a transxénesis. Ademais, hoxe en día, utilízase o peixe cebra para estudos de mecanismos básicos do desenvolvemento, bioloxía do cancro e células nai, síndromes e enfermidades, inmunoloxía e infección, hematopoeses, fisioloxía, adición, rexeneración, visión e moitos máis (Parichy *et al.*, 2006).

Pero, a pesar da gran cantidade de información que existe sobre o peixe cebra, sábese moi pouco sobre os plexos coroideos de dita especie e por iso o noso interese no presente estudo.

Os plexos coroideos

O plexo coroideo (PC) é un tecido secretor responsable da produción de líquido cefalorraquídeo (LCR) no encéfalo dos vertebrados (Lun *et al.*, 2015). Está formado por un pregue vascular da pia madre recuberto por un epitelio derivado do revestimento ependimario dos ventrículos. O pregue vascular consiste nunha serie de vasos sanguíneos incrustados nun estroma de tecido conectivo. Un termo máis correcto para denominar estas dúas estruturas xuntas sería tela coroidea (Peters *et al.*, 1991) xa que antigamente o termo PC era referido só ó pregue vascular (Bill & Korzh, 2014; Peters *et al.*, 1991).

O plexo coroideo é unha estrutura evolutivamente conservada (Bill & Korzh, 2014) que está presente en todos os vertebrados. De feito, a función do plexo coroideo tamén parece conservarse en todas as especies posto que segrega sinais análogas en varios sistemas (Lun *et al.*, 2015).

A súa principal función, como xa se dixo, é a produción de LCR, que algúns autores afirman que se produce por secreción activa mentres que outros afirman que a produción ocorre por diálise pasiva (Dohrmann, 1970; Peters *et al.*, 1991). Ademais, atribúenselle outras funcións como secreción, absorción, purificación, actividade endócrina (Dohrmann, 1970) e transporte de ións, proteínas, nutrientes e precursores metabólicos dende o sangue ó LCR. Así mesmo, o PC forma a barreira sangue-LCR ó presentar unións estreitas ou *zonula occludens* entre as células epiteliais (Lun *et al.*, 2015). O líquido cefalorraquídeo é unha rica fonte de proteínas, lípidos, hormonas, colesterol, glicosa, microARN e moitas outras moléculas e metabolitos que afectan a unha ampla gama de funcións do SNC (Lun *et al.*, 2015) polo que o PC estaría implicado na homeostase de todo o cerebro (Wolburg & Paulus, 2010), sabéndose que controla os roles do sono e do apetito, a dispoñibilidade do transmisor neuronal e o desenvolvemento do cerebro (Bill & Korzh, 2014). O plexo coroideo secreta ata 500 ml de LCR por día ó cerebro humano adulto, este flúe dende o ventrículo lateral ó terceiro ventrículo a

través do foramen de Monro, e dende aquí pasa ó cuarto ventrículo a través do acueduto cerebral. Posteriormente, o LCR flúe pola medula espiñal ou circula polo espazo subaracnoideo ata ser reabsorbido por vilosidades aracnoideas (Lun *et al.*, 2015).

O plexo coroideo posterior de *Danio* e a súa comparación con outras especies

Na maioría do vertebrados hai 4 plexos coroideos, un en cada un dos teitos dos ventrículos terceiro e cuarto e na parede medial de cada ventrículo lateral (Peters *et al.*, 1991). Debido ás diferencias no desenvolvemento do telencéfalo dorsal ou palio, os teleósteos só teñen dous PCs, o PC sobre o ventrículo telencefálico (Vijil Scalici, 2018) denominado PC anterior ou prosencefálico e o PC sobre o ventrículo rombencefálico (PC posterior) que son homólogos ós plexos coroideos do terceiro e cuarto ventrículos de mamíferos respectivamente (Bill & Korzh, 2014). Para o presente estudo centrarémonos no plexo coroideo rombencefálico ou posterior.

Despois do peche do tubo neural, o plexo coroideo rombencefálico é o primeiro en aparecer (Lun *et al.*, 2015). Estudos do destino celular en ratos demostraron que os labios rómbicos teñen un papel importante na formación do plexo coroideo posterior. A análise *in vivo* das fases do desenvolvemento do plexo coroideo posterior en mutantes de peixe cebra levada a cabo por García-Lecea *et al.* (2008) demostraron un papel similar dos labios rómbicos no peixe cebra e permitiu definir as seguintes etapas da súa formación (Bill & Korzh, 2014):

1. A tela coroidea (primordio do PC) fórmase a partir das células neuroepiteliais do teito do cuarto ventrículo, á vez que a vasculatura crece ata aquí.
2. Algunhas células migradoras dos labios rómbicos superior e lateral únense a tela coroidea (recorda á migración en ratos e en outra liña transxénica de peixe cebra).
3. A tela coroidea únese formando unha estrutura tipo botón correspondente ás células epiteliais do plexo coroideo posterior no teito do cuarto ventrículo.
4. O capilar rodea a estrutura e invade o seu interior.
5. A medida que a tela coroidea se une, as células restantes dos grupos laterais desenvolven un fenotipo astrogial.
6. Estas células astrogiales converxen máis tarde coas células epiteliais debido a unha redución do ventrículo e do teito ventricular.

Así mesmo, sábese que as vías de sinalización Notch e Hedgehog están implicados neste proceso (Bill & Korzh, 2014; García-Lecea *et al.*, 2008).

A aparencia macroscópica do plexo coroideo rombencefálico é similar entre as diferentes especies de vertebrados (Lun *et al.*, 2015). En mamíferos, no seu borde libre, o PC invaxínase no ventrículo aumentando a súa superficie mediante numerosas vilosidades (Peters *et al.*, 1991). Caracterízase por presentar un epitelio monoestratificado, con células cuboides e núcleos ovóides en posición central ou basal. Este epitelio aséntase sobre unha membrana basal inflada en contacto cun tecido conectivo que rodea un vaso sanguíneo fenestrado. As células epiteliais presentan numerosas microvilosidades e algúns cilios na súa superficie apical.

Ademais, as membranas celulares laterais son moi aproximadas e presentan unións estreitas cerca da superficie apical (Fig. 4) (Dohrmann, 1970).

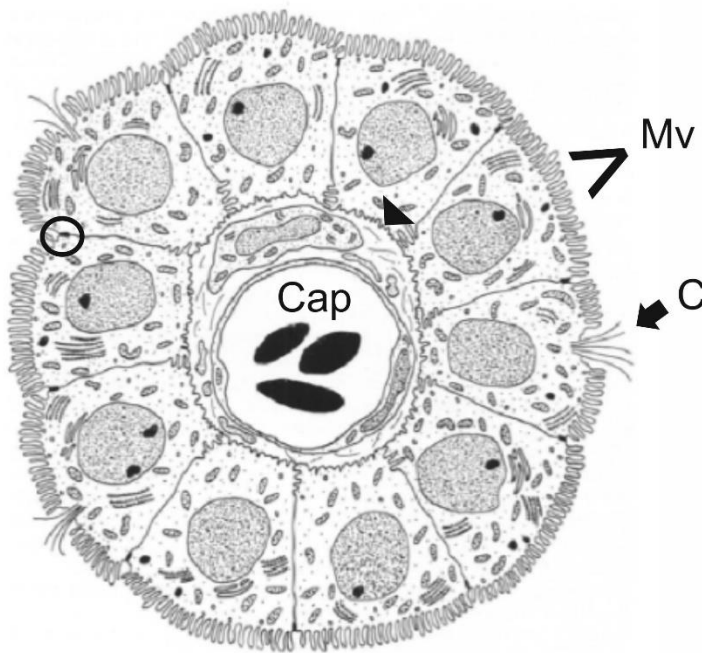


Figura 4. Esquema dunha sección transversal dunha vilosidade coroidea de mamíferos. O círculo está rodeando unha unión estreita e a punta de frecha sinala a membrana basal. C, cilios; Cap, capilar; Mv, microvilosidades. Modificada de Dohrmann, 1970.

En algúns teleósteos como é o caso da troita arco da vella (*Salmo gairdneri* Richardson) encontramos, no teito do ventrículo diencefálico, unha estrutura semellante ó plexo coroideo anterior do peixe cebra, o saco dorsal (*Saccus Dorsalis*) que se presenta como unha evaxinación rostro-dorsal do teito diencefálico. Este caracterízase por presentar un epitelio monoestratificado, con células cuboides na súas partes lateral e ventral mentres que na parte dorsal as células son cilíndricas. Os núcleos ovóides localízanse centralmente. A parte basal das células epiteliais está en contacto cunha membrana basal pouco pregada que se asenta sobre un tecido conectivo, o sistema vascular subxacente está ben desenvolvido. A superficie apical alárgase nun borde en cepillo e presenta varios cilios. Así mesmo, descríbense unións estreitas cerca da superficie apical (Jansen *et al.*, 1976).

OBXECTIVOS

Neste traballo preténdese estudar o plexo coroideo que se atopa sobre o ventrículo rombencéfalo do peixe cebra (*Danio rerio*) adulto mediante:

1. Descrición e análise das características morfolóxicas das súas células.
2. Comparación cos datos de plexos coroideos e/ou estruturas análogas doutras especies.

MATERIAL E MÉTODOS

Material biolóxico: obtención e procesamento

Para o estudo a realizar, utilizáronse 10 exemplares adultos de peixe ceбра (*Danio rerio* Hamilton, 1822) obtidos comercialmente de subministradores locais e mantidos en acuarios axeitados no laboratorio de Bioloxía Celular da Facultade de Ciencias da Universidade da Coruña ata o seu uso.

Os peixes foron manipulados baixo as normas da Unión Europea (2010/63/UE) e a lexislación española (RD 1201/2005, BOE 252/34367-91, 2005) establecidas para o uso e coidado de animais de experimentación.

Os exemplares median entre 2,7 e 3 cm de lonxitude total.

Para o procesamento das mostras seguíronse técnicas convencionais de microscopía electrónica de transmisión (Dykstra & Reuss, 2003):

Fixación

Os exemplares foron anestesiados con Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt ó 0,1% (MS222, SIGMA) e posteriormente fixados por perfusión transcárdial con paraformaldehído ó 2% e glutaraldehído ó 1% en tampón fosfato 0,1 M e pH 7,4 (TF). Trala fixación extrouxéronse os encéfalos da cavidade cranial que foron mantidos no mesmo fixador durante 16 horas a 4 °C. Posteriormente os plexos coroideos foron separados do encéfalo e mantidos ata a posfixación en TF. Todas as operacións foron realizadas baixo o estereomicroscopio (SMZ-U, Nikon). Tras o lavado foron sometidas a unha segunda fixación (posfixación) con tetróxido de osmio ó 1% en TF 0,1 M durante 1,5 horas. Finalmente as mostras foron lavadas e mantidas en auga destilada.

Inclusión

As mostras deshidratáronse en tres baños sucesivos de acetona ó 99,5% durante 1 hora e logo en dous baños sucesivos de acetona pura durante 15 min. Logo, foron sometidas a dous baños de resina Spurr 100%, o primeiro durante 2h e o segundo 12h. Tras estes baños as mostras dispuxéronse nuns moldes de silicona con nova resina e foron polimerizadas en estufa a 60 °C durante 2 días.

Seccionado

O bloque de resina foi tallado nunha talladora (Ultratim E, Leica-Reichert) para eliminar o exceso de resina ó redor do tecido e posteriormente foi cortado nun ultramicrotomo (Ultracut E, Leica-Reichert) cunha coitela de diamante (DIATOME) obténdose dous tipos de seccións:

1. Semifinas de 0,35-0,4 µm recollidos en portaobxectos xelatinizados.
2. Ultrafinas de 70-80 nm recollidos en reixas de cobre de número de cuadrícula 200 e recubertas dunha lámina de polímero (formvar).

Tinguido/contrastado

Os semifinos tinguíronse con azul de toluidina ó 1% nunha solución acuosa de bórax ó 0,5% durante 40 segundos sobre unha placa calefactora a 60 °C.

Por outro lado, as seccións ultrafinas foron contrastados primeiramente con acetato de uranilo ó 10% en metanol durante 20 min, seguido dun lavado en auga destilada e posteriormente con

citrato de chumbo durante 20 min, seguido dun primeiro lavado a chorro con unha solución de hidróxido sódico libre de dióxido de carbono ó 0,02 N e un segundo lavado con auga destilada.

Observación, obtención e procesamento das imaxes

Os portaobxectos foron observados nun microscópio óptico (ECLIPSE 90i, Nikon) e fotografados cunha cámara dixital (DP71, OLYMPUS) adaptada ó mesmo.

As reixas foron observadas e fotografadas nun microscopio electrónico de transmisión (JEN 1010 (JEOL)) a 80Kv equipado cunha cámara dixital adaptado ó mesmo co software de control DigitalMicrograph.

As imaxes seleccionadas foron procesadas, editadas e montadas. Para o procesado das imaxes e a realización das placas empregouse o paquete informático Corel®Suit 2018. O procesado da imaxe fíxose en Corel®Photopaint modificando contraste e luminosidade naquelas que o precisaban e para o montaxe e a edición das imaxes empregouse o Corel®Draw.

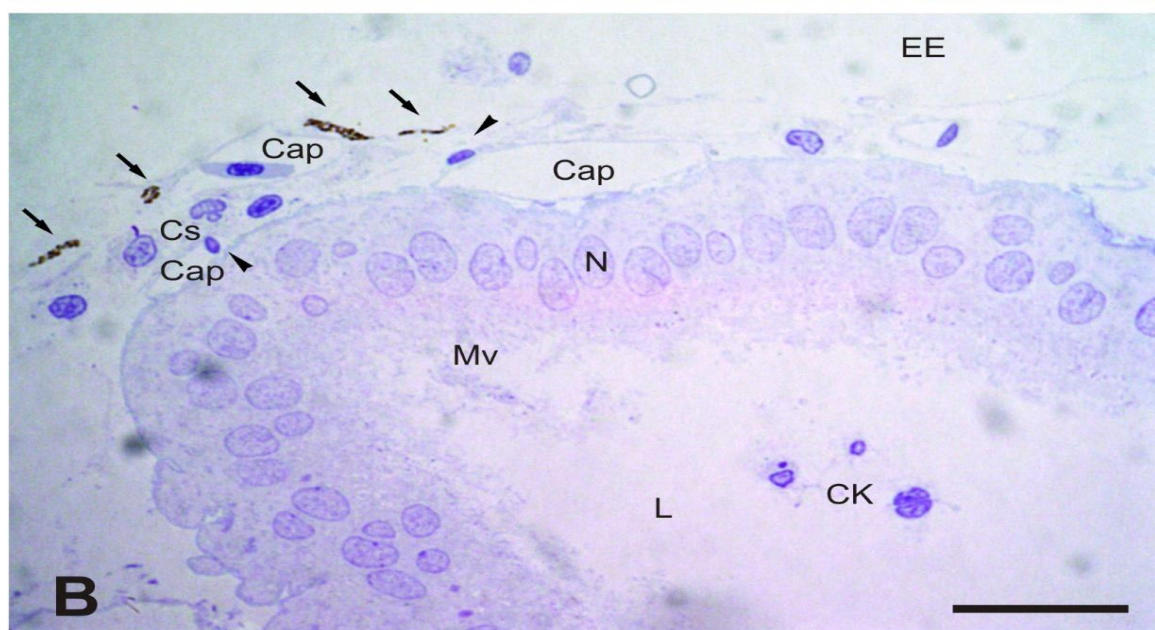
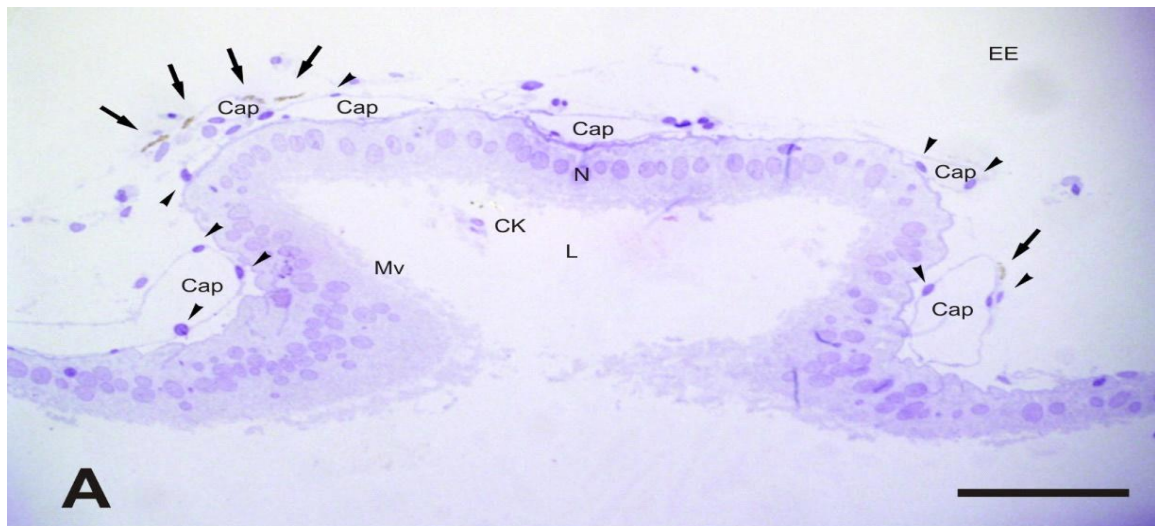
RESULTADOS E DISCUSIÓN

ESTRUTURA DO PLEXO COROIDEO

No encéfalo do peixe cebrá (*Danio rerio*), o teito do rombencéfalo aparece cuberto por unha lámina de tecido epitelial. Consta dunha monocapa de células aplanadas nos seus marxes laterais e cuboides ou prismáticas cara a liña media, onde aparece repregado e asociado pola súa cara dorsal a numerosos capilares (Fig. 5A). O epitelio e o sistema vascular subxacente conforman o plexo coroideo rombencefálico ou posterior. As células do epitelio apóianse sobre unha fina lámina basal disposta neste caso dorsalmente e definindo a superficie basal (cara ó exterior do encéfalo) e apical (superficie ventricular) do epitelio. As células do epitelio teñen unha altura aproximada de 15 μm . Os núcleos celulares son eucromatínicos, ovoides e presentan unha pequena fendedura, miden 4 μm de ancho e 7 μm de largo. En xeral localízanse centralmente á mesma altura do epitelio salvo nos puntos de pregamento. (Fig. 5B).

A estrutura epitelial non difire moito do definido como PC anterior na mesma especie (Vijil Scalici, 2018) e é bastante similar ás descrições do saco dorsal doutros teleosteos, como a troita arco da vella *Salmo gairdneri* (Jansen, *et al.*, 1976). A presenza de pequenas fendeduras nos núcleos foi tamén observada en ratos novos e en embrións de coello (Dohrmann, 1970).

Figura 5. Estrutura do plexo coroideo (posterior) no peixe cebrá (*Danio rerio*). (A) Sección transversal ó microscopio óptico tinguida con azul de toluidina, mostrando o plexo coroideo (PC). O plexo está formado por un epitelio monoestratificado asociado a numerosos capilares (Cap) na súa cara basal ou externa (EE) e a un bordo en cepillo correspondente ás numerosas microvilosidades (Mv) na súa cara interna ou apical en contacto co líquido cefalorraquídeo do cuarto ventrículo (L), onde pódense tamén observar células de Kolmer (CK). (B) Detalle onde se pode apreciar mellor as células endoteliais (puntas de frecha) e prolongacións de melanóforos (frechas) pertencentes ás meninxes. Barras de calibración: 50 μm (A); 20 μm (B).



ULTRAESTRUTURA DO PLEXO COROIDEO

As células adxacentes do epitelio están en estreito contacto, sendo así que as súas membranas celulares presentan complexos de unión intercelulares especialmente na rexión apical. Estas unións están formadas por especializacións de membrana coñecidas como unións estreitas ou oclusivas (*zonula occludens*) que selan e delimitan dous compartimentos extracelulares, un apical continuo co ventrículo e o LCR e outro basolateral. De seguido describiremos as características ultraestruturais das rexións celulares correspondentes ou próximas a estes compartimentos e da zona central da célula.

Rexión apical das células coroideas

A rexión apical das células epiteliais consta de múltiples repregues dixitiformes de membrana plasmática, irregulares e que ocasionalmente poderíanse ramificar ou fusionar (Fig. 6A, B, E), como ocorre no saco dorsal da troita (Jansen, *et al.*, 1976). Aínda que non podemos precisar a

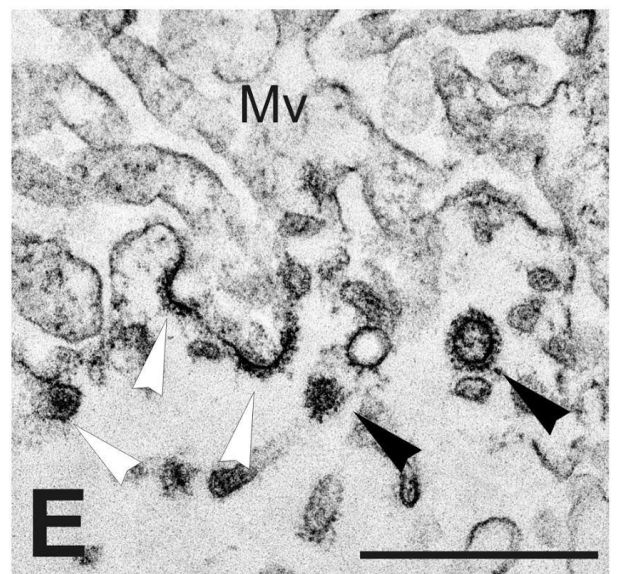
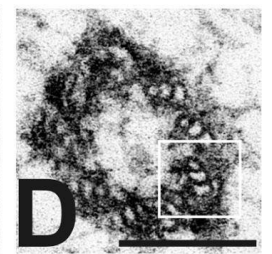
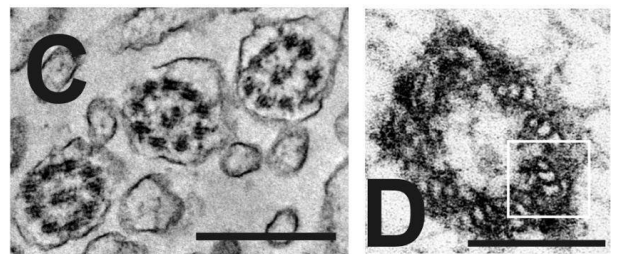
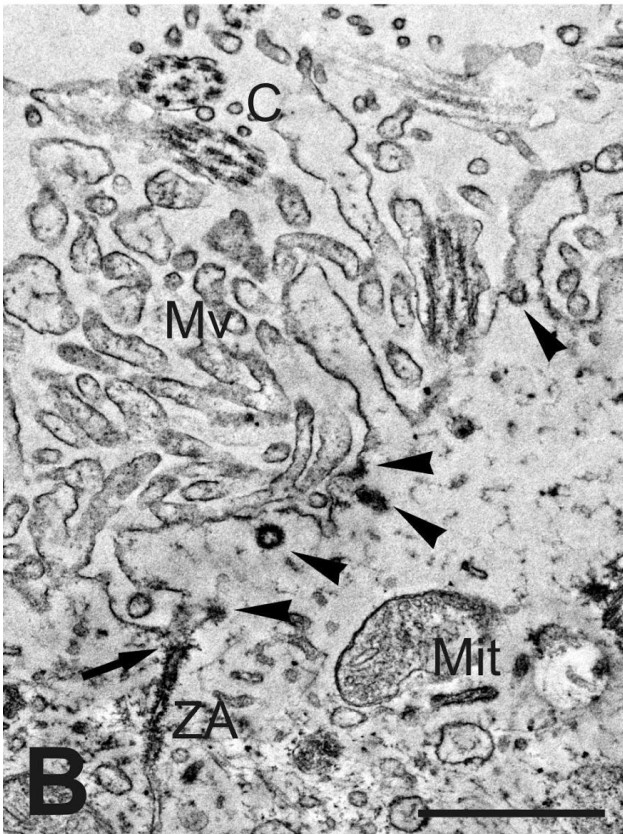
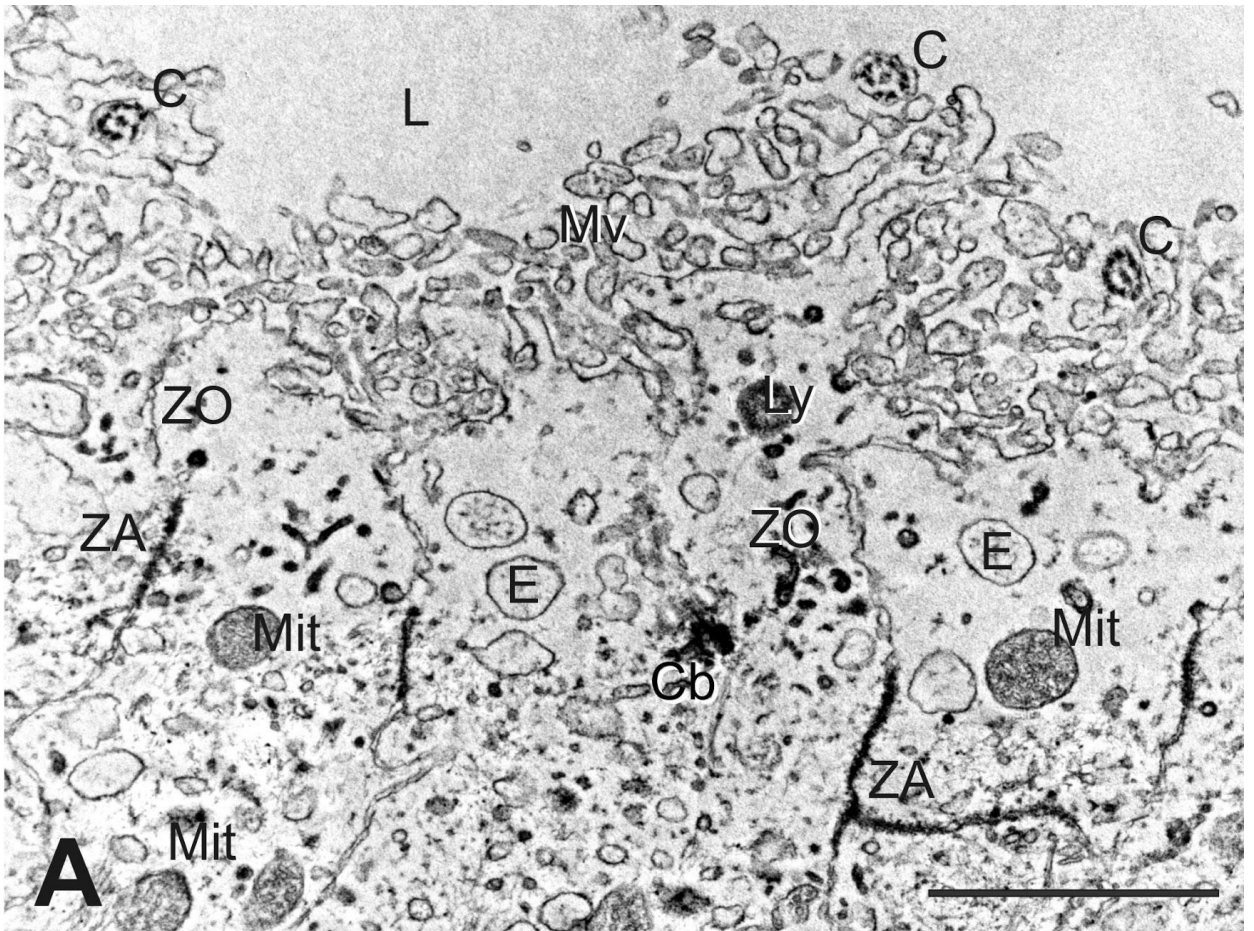
lonxitude máxima polas súas formas irregulares e os seus intrincados traxectos estimamos que poden ter arredor de 1,30 μm . Varios autores describenas simplemente como longas noutros teleósteos como no caso de *Leuciscus rutilus* (Obermüller-Wilén, 1973) e no saco dorsal da troita (Jansen *et al.*, 1976); o que si podemos afirmar e que son estreitas tal e como as describen Dohrmann (1970), Jansen *et al.* (1976), Lun *et al.* (2015) e Obermüller-Wilén (1973), cun ancho de 0,26 μm . Sen embargo Jansen *et al.* (1976) indica que ditas microvilosidades se ensanchan no ápice, feito que Dohrmann (1970) explica argumentando que é un artefacto de fixación que produce distensión celular, o cal podemos observar nas nosas mostras, aínda que máis ben parece ser debido a como está situado o perfil da microvelosidade con respecto ó plano de sección. Ditas microvilosidades presentan un citoplasma claro no que non se observan as agrupacións de microfilamentos típicas doutros epitelios especializados na absorción; teñen unha aparencia de estruturas valeiras e libres de organelos, agás escasos gránulos densos interpretados coma ribosomas libres por Jansen *et al.* (1976) aínda que tampouco exclúe que sexan artefactos. En calquera caso, o gran aumento da membrana apical do epitelio estaría implicado na súa función de intercambio e complementariamente coa produción de LCR (Lun *et al.*, 2015).

A observación ultraestrutural desta rexión en *Danio* confirmou a presenza de longos cilios aparentemente móbiles que constan dun esqueleto microtubular formado por 9 pares de microtúbulos periféricos e un par central (9 + 2), sobresaíndo entre as microvilosidades (Fig. 6A-C). Estas estruturas foron atopadas nos plexos coroideos de moluscos, anfibios, ratos e humanos (Dohrmann, 1970) e tamén descritos no saco dorsal da troita (Jansen *et al.*, 1976). Teñen un diámetro de 300 nm e pódense presentar sos ou en grupos e contribúen ó fluxo de LCR (Lun *et al.*, 2015). Os corpos basais dos cilios presentan un diámetro de 230 nm, localízanse na rexión apical celular baixo a membrana celular e presentan a típica estrutura formada por 9 tripletes de microtúbulos (Fig. 6A, D).

Dende a base das microvilosidades ata onde comezan as unións de membrana podemos observar unha zona de citoplasma practicamente libre de orgánulos celulares, agás vesículas revestidas, lisosomas e corpos multivesiculares (Fig. 6A). Fenómeno que se observa en todas as células transportadoras coñecidas segundo Jansen *et al.* (1976); sen embargo Dohrmann (1970) interpretouno como un fenómeno *post mortem* das células epiteliais do plexo coroideo.

Nesta rexión de citoplasma apical pódense observar numerosas vesículas, na súa maioría, revestidas de clatrina cun diámetro de 130 nm (Fig. 6B, E), formadas por invaginacións da membrana apical que se observa nos ocos revestidos. Xa que estas vesículas revestidas son típicas nos procesos de endocitose mediada por receptor, a súa presenza suxire que hai un transporte específico e regulado de substancias particulares dende o LCR ata o interior da célula.

Figura 6. Ultraestrutura da superficie apical do plexo coroideo posterior no peixe cebra (*Danio rerio*) (A) Vista xeral da superficie apical: C, cilios; Cb, corpo basal; E, endosoma; L, lumen; Ly, Lisosoma; Mit, mitocondrias; Mv, microvilosidades; ZA, *zonula adhaerens*; ZO, *zonula occludens*. (B) Detalle das microvilosidades (Mv) onde se aprecian cilios (C) tanto en sección transversal como lonxitudinal entre as microvilosidades (Mv) e vesículas revestidas de clatrina (puntas de frecha). Nótese a unión entre 2 membranas laterais cunha *zonula occludens* (frecha negra) xusto encima dunha *zonula adhaerens* (ZA). (C) Detalle dun grupo de cilios en sección transversal mostrando o seu axonema con estrutura 9 + 2. (D) Detalle dun corpo basal en sección transversal destacando a asociación dun triplete de microtúbulos (recadro) que conforman a súa parede. (E) Detalle dos diferentes estadios no proceso de formación de vesículas endocíticas revestidas de clatrina, (puntas de frecha negras) a partir de ocos revestidos (puntas de frecha brancas). Barras de calibración: 2 μm (A); 1 μm (B); 500 nm (C, E); 200 nm (D).



Varios autores constatan este papel de absorción. Así, Jansen *et al.* (1976) no saco dorsal da troita suxire que estas vesículas están implicadas na absorción de moléculas de alto peso molecular dende o LCR; Obermüller-Wilén (1973), no seu estudo sobre o PC de *Leuciscus rutilus* confirma que hai unha absorción de substancias do LCR ó interior da célula co fin de descompoñelas e Dohrmann (1970), na súa revisión histórica do PC recompila varios autores que probaron este papel de absorción. Así mesmo, Obermüller-Wilén (1973) coincide con Peters *et al.* (1991), en que hai un maior transporte dende o polo basal ata o polo apical por vesículas electrón claras que segregarían metabolitos ó LCR. Función secretora que moitos autores sitúan como a principal, e. g. Dohrmann (1970) contempla varios experimentos que o demostran. Por outra banda, Jansen *et al.* (1976) argumenta que características tales como un número elevado de mitocondrias na zona apical, espazos apicais e extracelulares entre as microvilosidades e espazos intercelulares dilatados son típicas de células secretoras. Agás a última, estas características morfolóxicas podémolas encontrar neste estudo.

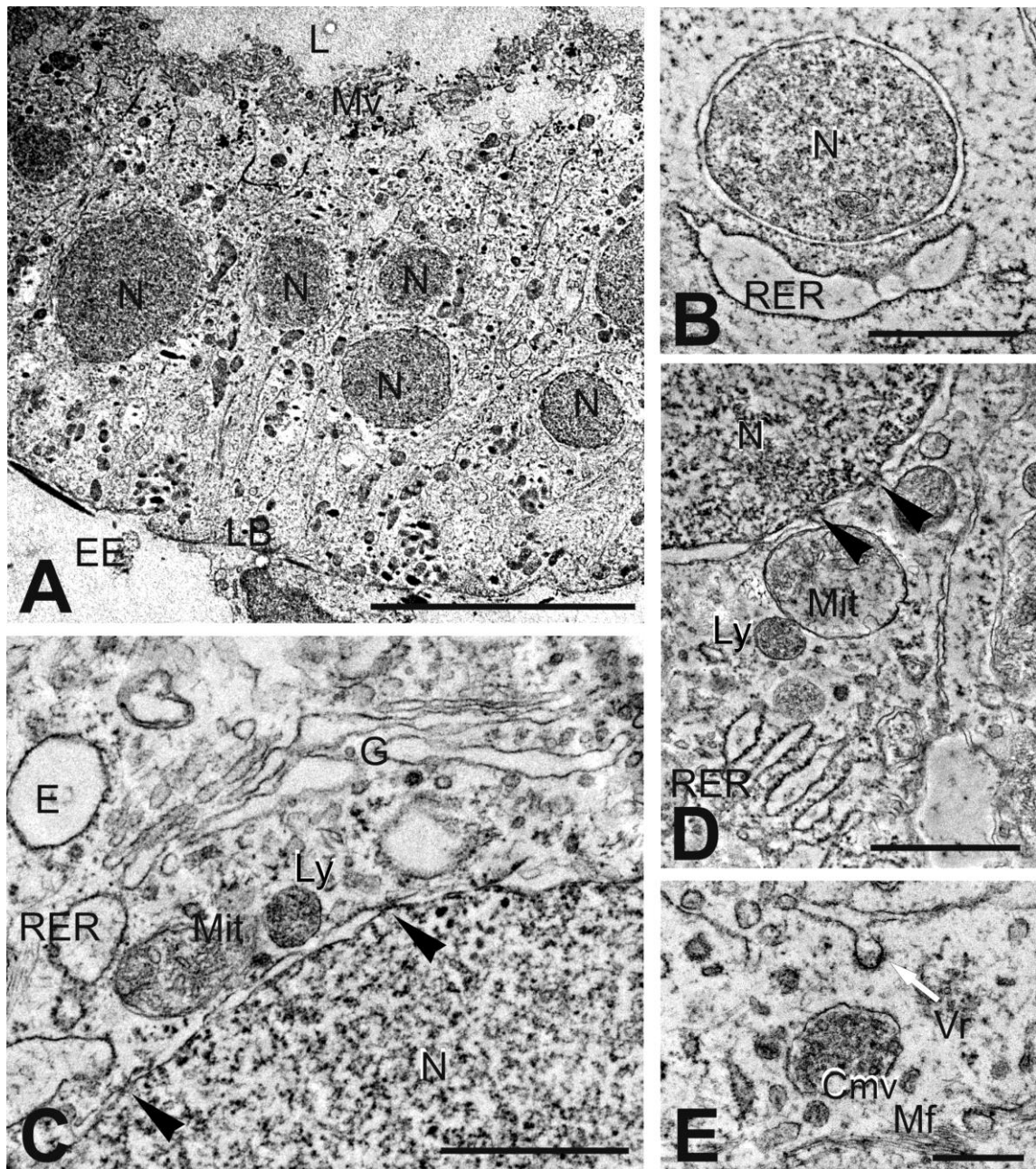
Finalmente, destacar nesta zona de citoplasma apical valeira ou con escaseza de orgánulos a presenza de feixes de microfilamentos de actina dispostos en paralelo baixo a superficie apical (Fig. 7E, 8D).

Rexión intermedia

Esta rexión da célula coroidea está definida pola presenza do núcleo e os orgánulos adxacentes. Na parte central atopamos núcleos ovoides, delimitados por unha dobre membrana atravesada por poros nucleares. O nucleoplasma está composto case exclusivamente de cromatina laxa (eucromatina), sendo a heterocromatina moi escasa ou nula (Fig. 7B-D). A descrición do núcleo das células do saco dorsal da troita (Jansen *et al.*, 1976) coincide coas nosas observacións. En *Danio*, é frecuente atopar un só nucléolo por núcleo, aínda que noutras especies descríbense hasta 3 (Dohrmann, 1970; Jansen *et al.*, 1976).

Na zona supranuclear atópase o Complexo de Golgi composto por un apilamento de 3 cisternas alargadas e estreitas, con pequenas vesículas ó seu carón (Fig. 7C). A posición na que se atopa o Complexo de Golgi parece coincidir en todos os organismos estudados ata agora, i.e. PC de gato, polo, can, ra, coello de Indias, lamprea, lagarto, home, mono, rato, zarigüeya, coello, rata, píntega, sapo e marmota (Dohrmann, 1970), saco dorsal da troita (Jansen *et al.*, 1976), PC do ventrículo lateral de ratas (Peters *et al.*, 1991) pero só coincide en escaseza de cisternas co saco dorsal da troita xa que nos demais parece estar máis desenvolvido.

Figura 7. Ultraestrutura dos orgánulos que acompañan ó núcleo do plexo coroideo posterior no peixe cebra (*Danio rerio*). (A) Vista xeral do epitelio coroideo onde se aprecia unha lámina basal (LB) no súa superficie basal e un borde en cepillo na súa superficie apical correspondente ás numerosos microvilosidades (Mv). Nótase a posición céntrica dos núcleos. (B) Porción dun núcleo seccionado ó través da súa periferia (N) mostrando a súa envoltura nuclear. Apréciase que só contén cromatina laxa (eucromatina). Baixo o núcleo unha cisterna de Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) cos seus característicos ribosomas asociados á súa cara citosólica. (C) Detalle dun núcleo (N) sinalando os poros nucleares (punta de frecha) na súa envoltura nuclear. Sobre o núcleo apréciase un Complexo de Golgi e asociado a este unha cisterna de Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) con ribosomas asociados. (D) Detalle dun núcleo (N) sinalando os poros nucleares (punta de frecha) na súa envoltura nuclear. Baixo este apréciase un Retículo Endoplasmático Rugoso coas súas cisternas apiladas. (E) Detalle dun corpo multivesicular (Cmv) e un feixe de microfilamentos (Mf) asociados ó núcleo. E, endosoma; EE, espazo estromal; L, lumen; Ly, lisosoma; Mit, mitocondria; Vr, vesícula revestida de clatrina. Barras de calibración: 10 μ m (A); 1 μ m (B, C, D); 500 nm (E).



Pola contra, preto do Complexo de Golgi, na zona supranuclear (Fig. 7C) atopouse o Retículo Endoplasmático Rugoso, caracterizado pola presenza de numerosos ribosomas asociados á superficie citosólica da súa membrana. Este sistema de membranas atópase tamén arredor do núcleo nas zonas laterais e sobre todo infranuclear, si ben aparece constituído por un número reducido de cisternas dispostas en paralelo e co espazo luminal dilatado. A escaseza de cisternas suxire que este compartimento non parece estar moi desenvolvido (Fig. 7B, D) e que polo tanto as células corioideas non estarían especializadas na síntese e secreción de compostos proteicos.

As mitocondrias observadas nas células corioideas do peixe cebra non parecen ter unha distribución particular ou forma especial como é o caso das mitocondrias descritas noutros organismos segundo diversos autores, e.g. na zona supranuclear describíronse mitocondrias alongadas e ramificadas no teleosteo *Leuciscus rutilus* (Obermüller-Wilén, 1973) e macromitocondrias alongadas e con forma de copa no saco dorsal da troita (Jansen, *et al.*,

1976). Pola contra, en *Danio* as mitocondrias presentan, na súa maioría, unha forma ovoide ou circular, sendo as formas alongadas escasas. Miden 0.60 μm de lonxitude e 0.50 μm de ancho.

Ademais, no citoplasma da zona intermedia observáronse, lisosomas cun diámetro medio de 0,30 μm (Fig. 7C, D), corpos multivesiculares de 690 nm de ancho e 480 nm de lonxitude (Fig. 7E). Tamén puidemos observar filamentos intermedios preto do núcleo (Fig. 8C) e ocasionalmente algún centriolo (Fig. 8C).

Rexión basolateral

Nesta zona son comúns tanto as mitocondrias (Fig. 8B-F) como as vesículas revestidas (Fig. 8B, D, E). As vesículas revestidas pódense observar cerca da membrana plasmática lateral así como da basal, ben no momento da súa formación como ocós revestidos ou ben como vesículas revestidas xa formadas, pero en menores cantidades que no caso das observadas na rexión apical.

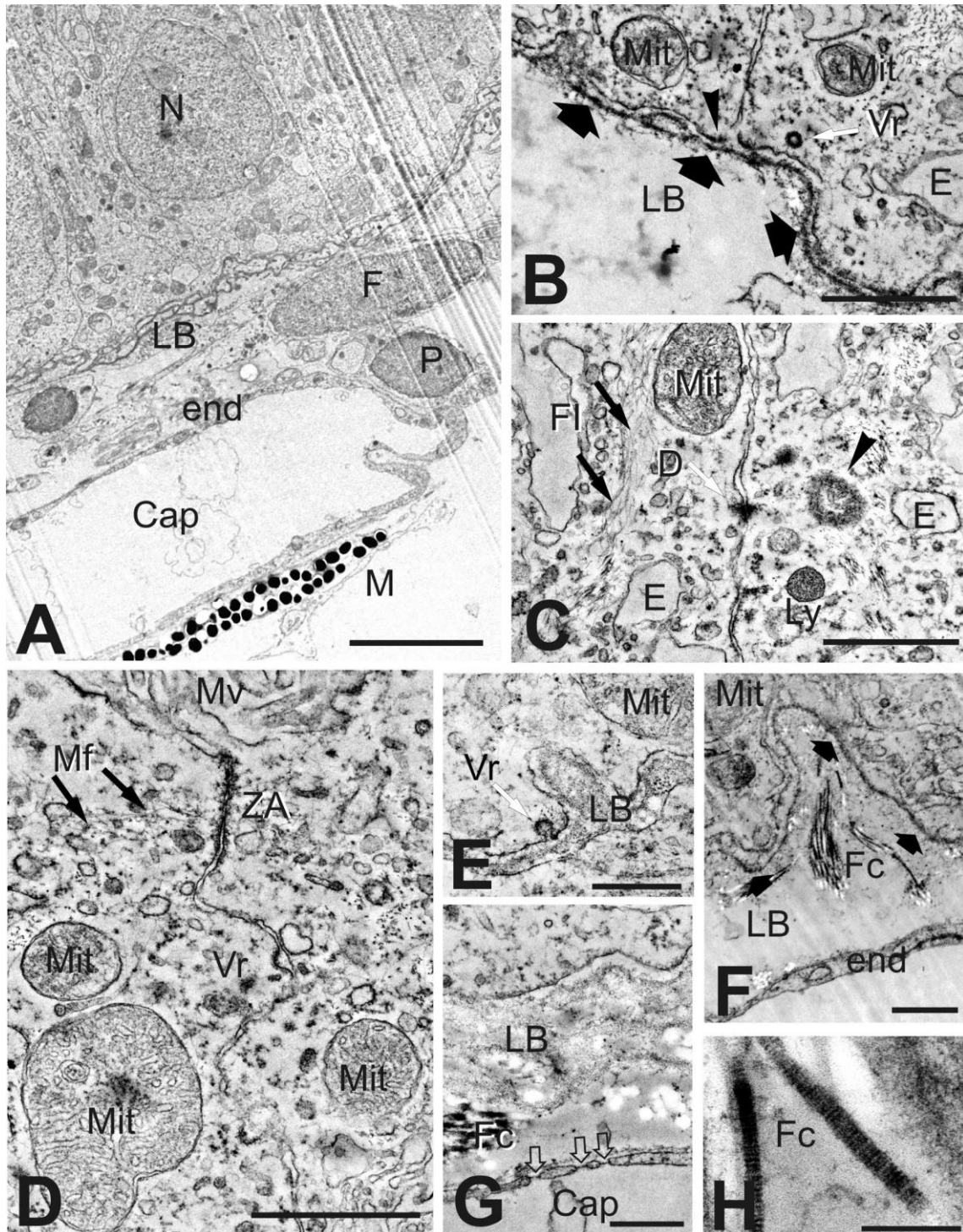
As mitocondrias aquí, tampouco mostraron unha distribución preferente, ó contrario do que ocorre no teleósteo *Leuciscus rutilus*, que se dispoñen en paralelo ós pregues da lámina basal (Obermüller-Wilén, 1973).

Parte basal

A célula epitelial descansa sobre unha lámina basal de 51 nm de grosor que nalgún caso se prega cara ó interior da mesma célula (Fig. 8A, B, E-G). Nestes pregues e baixo a lámina puidemos observar fibras de coláxeno como compoñente estrutural das membranas basais xunto coa lámina basal (Fig. 8F, H).

Baixo o epitelio coróideo atopamos múltiples capilares asociados a pericitos. Os capilares, de paredes moi finas, están formados por unha capa de células endoteliais cos núcleos aplanados e rodeados dunha lámina basal asociada a fibras de coláxeno (Fig. 8A, G) e sen capa muscular.

Figura 8. Ultraestrutura da rexión basolateral e microvasculatura do plexo coróideo no peixe cebra (*Danio rerio*). (A) Vista xeral da superficie basolateral do epitelio coróideo que descansa sobre unha fina lámina basal (LB), que se separa da rede capilar (Cap) formado por células endoteliais aplanadas (end) e pericitos (P). Ocasionalmente obsérvanse prolongacións de melanóforos (M) cheos de melanosomas cubrindo a súa parte máis externa e tecido conectivo entre ambos con fibroblastos (F) como compoñente estrutural. (B) Detalle das membranas da superficie basal de dúas células adxacentes do epitelio coróideo, mostrando hemidesmosomas (puntas de frecha) nos bordes que rematan sobre a lamina basal (frechas negras). (C) Detalle das membranas basais de dúas células adxacentes unidas por un desmosoma (D) e un feixe de filamentos intermedios (FI) cerca das mesmas. A punta de frecha sinala un centriolo. (D) Detalle dunha *zonula adhaerens* (ZA) con microfilamentos asociados (MF). Obsérvase a formación dunha vesícula revestida de clatrina (Vr) na membrana lateral e as numerosas cristas mitocondriais nas mitocondrias (Mit). (E) Detalle da superficie basal do epitelio coróideo que descansa sobre a lámina basal (LB) onde se observa un pregamento da mesma cara o interior da célula. Nótese a formación dunha vesícula revestida (Vr) na membrana basal cara o interior da célula. (F) Detalle do tecido conectivo que se atopa entre a lámina basal (LB) e o endotelio (end) do capilar mostrando un feixe de fibras de coláxeno (Fc) en sección transversal. (G) Detalle dun capilar (Cap) de endotelio fenestrado onde as frechas translúcidas nos sinalan os poros. (H) Detalle de dúas fibras de coláxeno en sección lonxitudinal (Fc). E, endosoma; Ly, lisosoma; Mv, microvilosidades; N, núcleo. Barras de calibración: 5 μm (A); 1 μm (B, C, D, F); 500 nm (E); 250 nm (G); 200 nm (H).



Alguns destes capilares presentan fenestracións cun diámetro de 107 nm (Fig. 8G) cuxa función é permitir a saída de substratos desde o sistema vascular ó estroma (Bill & Korzh, 2014), conferíndolle así unha alta permeabilidade (Wolburg & Paulus, 2010) principalmente á moléculas pequenas e auga, permitindo un subministro rápido de auga a través do sangue ás células epiteliais para a produción de LCR. Os solutos poden cruzar dende o sangue ata o espazo estromal por difusión ou mediante transporte vesicular (Lun *et al.*, 2015).

Como xa se indicou na análise da estrutura do plexo coroideo coa microscopía óptica, o plexo estaría asociado a fibroblastos e melanóforos que formarían parte das meninxes (Fig. 8A).

Entre epitelio e capilar atópanse algúns fibroblastos (Fig. 8A) e fibras de coláxeno (Fig. 8F) que compoñen o tecido conectivo estromal.

A estrutura descrita parece estar bastante conservada en todos os PC dos organismos estudados ata agora. Do que non hai evidencias é do “labirinto basal” que Jansen *et al.*, (1976) describen como un sistema de membranas plasmáticas basais ramificadas, sen lámina basal subxacente, que recobren espazos saculares estreitos no saco dorsal da troita, e presente tamén en mamíferos, en xeral (Wolburg & Paulus, 2010) e na rata en particular (Peters *et al.*, 1991). Tampouco observamos en *Danio* ningunha zona de ancho variable libre de organelos celulares tales como mitocondrias, xa que estas chegan case ata o límite da célula, como ocorre no saco dorsal da troita (Jansen *et al.*, 1976).

Parte lateral

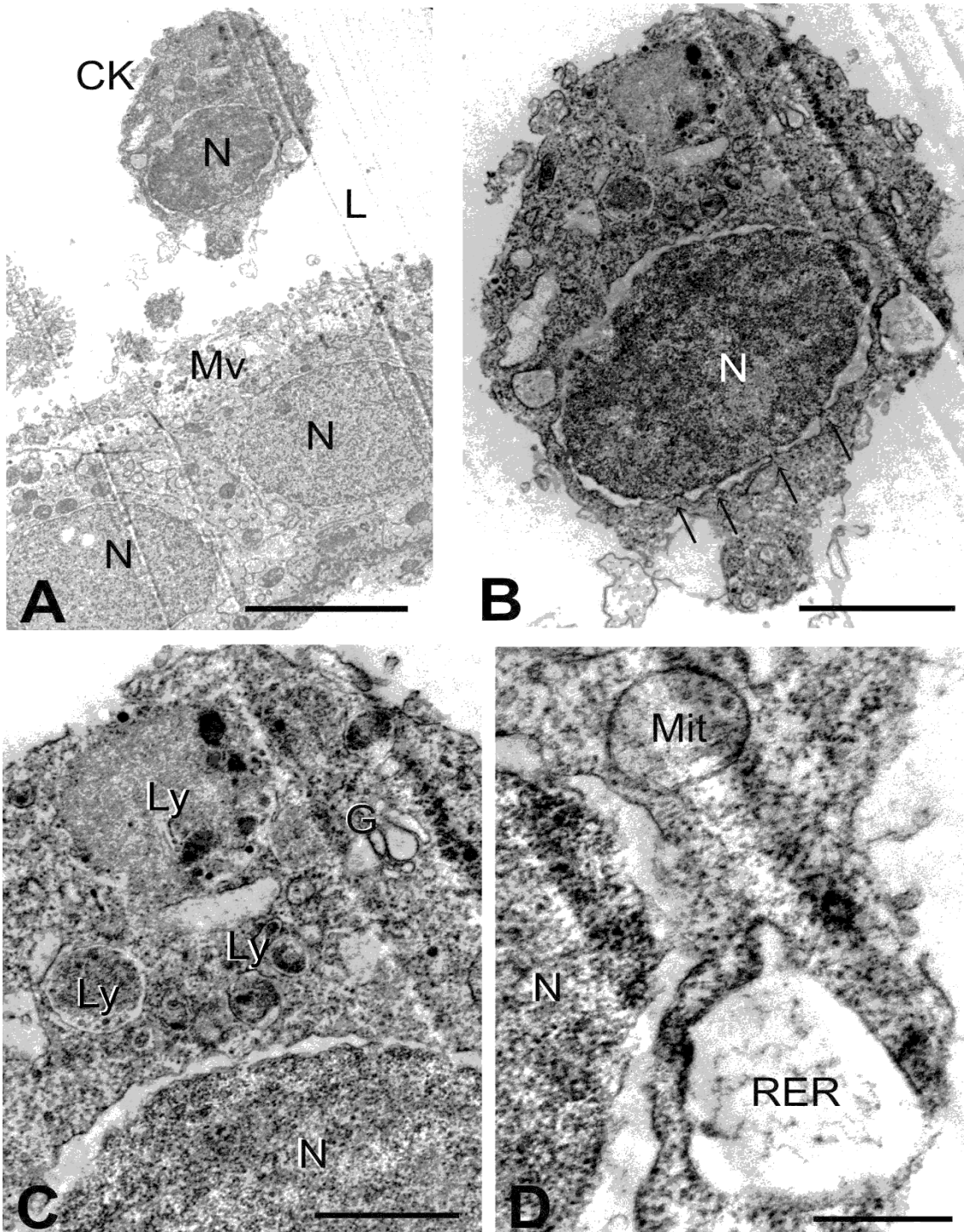
Nesta zona destacan as unións entre células, sendo así que, xusto debaixo do compartimento apical encontramos unións estreitas ou *zonula occludens* (ZO), mencionadas anteriormente (Fig. 6A, B), cuxa función é a de filtrar o paso de moléculas e ións hidrofílicos do sangue ó LCR (Bill & Korzh, 2014) para evitar a difusión de substancias sanguíneas ó ventriculo (Wolburg, H. & Paulus, W., 2010) constituíndo así a barreira sangue-LCR, que impide o paso paracelular das moléculas da circulación sistémica ó LCR (Lun *et al.*, 2015); e inmediatamente debaixo destas observáronse desmosomas en banda ou *zonula adhaerens* (ZA) (Fig. 6A, B e 8D) onde as membranas plasmáticas das células adxacentes se aproximan tanto que só deixan un ínfimo espazo intercelular, estas aseguran a polaridade ápico-basal das proteínas de membrana (transportadores) xunto coa ZO (Lun *et al.*, 2015); mentres que na zona máis basal encontramos desmosomas puntuais (*macula adhaerens*) (Fig. 8C) que contribúen á estabilidade das células e ó longo da membrana plasmática basal podemos observar a presenza dalgún hemidesmosoma (Fig. 8B) que une a célula epitelial á matriz extracelular, neste caso á lámina basal.

Estas unións de membrana tamén son unha estrutura típica que mostran todos os PC dos organismos estudados ata agora. Na que encontramos diferencias co saco dorsal en salmónidos (Jansen *et al.*, 1976) e co PC de ratas (Peters *et al.*, 1991) nos cales aparecen uns ensanchamentos puntuais dos espazos intercelulares baixo as ZA.

Tamén son comúns os feixes de filamentos intermedios cerca dos límites entre as células (Fig. 8C). Dende o punto de vista da análise morfolóxica non é doado precisar o tipo de filamento intermedio do cal se trata; non obstante é posible que a célula coroidea exprese polo menos algún tipo de queratinas (e.g. cytoqueratinas) xa que estas, xeralmente, asócianse á presenza de desmosomas e hemidesmosomas. Outro posible candidato poderían ser os filamentos de vimentina ou os neurofilamentos, presentes nos plexos coroideos de mamíferos. (Kasper *et al.*, 1987).

Figura 9. Identificación da célula de Kolmer no lumen do plexo coroideo posterior do peixe cebra (*Danio rerio*). (A) Vista xeral da célula de Kolmer (CK) co seu núcleo (N) ovalado. (B) Detalle do núcleo (N) da célula de Kolmer mostrando a súa dobre membrana e os poros nucleares (frechas). (C) Detalle do citoplasma da célula de Kolmer mostrando varios lisosomas (Ly) e un Complexo de Golgi (G). (D) Detalle dunha mitocondria (Mit) e do Reticulo Endoplasmático Rugoso (RER) da célula de Kolmer. L, lumen; Mv, microvilosidades. Barras de calibrado: 5 µm (A); 2 µm (B); 1 µm (C); 500 nm (D).

Lumen



Aínda que non é parte estrutural dos plexos coroideos, na luz do plexo coroideo atopamos algunha célula solitaria (Fig. 9) con longas prolongacións e que presenta un núcleo eucromatínico ovoide (Fig. 9B), con numerosos lisosomas e vesículas da vía endolisosomal (Fig. 9C). Esta célula correspóndese coa denominada célula de Kolmer que Peters, *et al.* (1991) describen en ratas e gatos con propiedades de células ameboides e que en ambos descansa sobre os cilios e microvilosidades. Peters *et al.* (1991) conclúen que esta célula é un macrófago cuxa función é limpar a superficie das células epiteliais coroideas. Os somas das células observadas no lumen de *Danio* non estaban apoiados senón algo separados da superficie

apical do epitelio coroideo, non obstante a presenza das longas expansións filopodiais e o seu contido citoplasmático con dominancia de estruturas subcelulares implicadas na vía degradativa, fan pensar que estas células cumpren as función das células de Kolmer descritas noutras especies. Células similares tamén foron observadas no saco dorsal da troita (Jansen *et al.*, 1976), aínda que non sempre se describiron no lado apical, si na maioría dos casos; fenómeno que confirman Lun *et al.* (2015) ó afirmar que poden residir tanto no lado apical como no ventricular. Bill & Korzh, (2014) pola contra, sitúana entre as células do estroma.

CONCLUSIÓNS

O presente estudo describe a estrutura e ultraestrutura das células do plexo coroideo rombencefálico ou posterior no peixe cebra (*Danio rerio*). Como resumo podemos destacar,

1. O plexo coroideo do peixe cebra adulto é una estrutura repregada que consta dun epitelio monoestratificado asociado a unha rede de capilares sanguíneos fenestrados disposta sobre o teito do rombencéfalo.
2. A morfoloxía e estrutura do plexo coroideo do peixe cebra é semellante ó plexo coroideo doutros peixes e vertebrados estando conservada na evolución.
3. A abundancia de vesículas revestidas na superficie apical das células epiteliais suxiren un importante papel da endocitose na renovación do líquido cefalorraquídeo.
4. A baixa presenza de vesículas de secreción e de orgánulos implicados na vía secretora, suxire unha baixa actividade secretora convencional de tipo vesicular do plexo.
5. Descríbense células de tipo fagocítico asociadas ó plexo no espazo ventricular que se asemellan ás células de Kolmer presentes noutros vertebrados.

CONCLUSIONES

El presente estudio describe la estructura y la ultraestructura de las células del plexo coroideo rombencefálico o posterior en el pez cebra (*Danio rerio*). Como resumen podemos destacar,

1. El plexo coroideo del pez cebra adulto es una estructura replegada que consta de un epitelio monoestratificado asociado a una red de capilares sanguíneos fenestrados dispuesta sobre el techo del rombencéfalo.
2. La morfología y estructura del plexo coroideo del pez cebra es semejante al plexo coroideo de otros peces y vertebrados estando conservada en la evolución.
3. La abundancia de vesículas revestidas en la superficie apical de las células epiteliales sugieren un importante papel de la endocitosis en la renovación del líquido cefalorraquídeo.
4. La baja presencia de vesículas de secreción y de orgánulos implicados en la vía secretora, sugieren una baja actividad secretora convencional de tipo vesicular del plexo.
5. Se describen células de tipo fagocítico asociadas al plexo en el espacio ventricular que se parecen a las células de Kolmer presentes en otros vertebrados.

CONCLUSIONS

The present study describes the structure and ultrastructure of the rhombencephalic choroid plexus cells in the zebrafish (*Danio rerio*). As a summary we can highlight,

1. The choroid plexus of the adult zebrafish is a folded structure consisting of a monostratified epithelium associated with a network of fenestrated blood capillaries covering the roof of the hindbrain.
2. The morphology and the structure of the choroid plexus of the zebrafish is similar to the choroid plexus of other fish and vertebrates, and therefore preserved in evolution.
3. The abundance of coated vesicles on the apical surface of the epithelial cells suggests an important role of endocytosis in the renewal of the cerebrospinal fluid.
4. The low presence of secretory vesicles and organelles involved in the secretory pathway, suggest a low conventional vesicular secretory activity of the plexus.
5. Phagocytic-type cells are described in the ventricular space resembling the Kolmer cells in other vertebrates.

AGRADECEMENTOS

En primeiro lugar, agradecer ó Dr. Julián Yáñez, director do traballo, pola súa axuda e paciencia pero sobre todo por non perder a esperanza e infundirme ánimos cando as cousas empezaron a saír mal. Grazas ós investigadores da área de bioloxía celular da Universidade da Coruña por prestarme as instalacións así como o material. Grazas tamén, ó SAI (Servizo de Apoio á Investigación) por permitirme facer uso das súas instalacións e polo material prestado para o estudo, sen o cal non sería posible realizalo, e sobre todo ás chicas da área de microscopía electrónica por prestarme axuda en todo o posible e resolver as miñas dúbidas.

En segundo lugar, quixera agradecer a meus pais por non darme todo feito e ensinarme a loitar polas miñas metas. En especial a miña nai, quen non é só unha nai, se non tamén mellor amiga e confidente. A Brais, por facer as veces de superheroe (técnico informático, taxista...), por ver o meu peor lado e aínda así quedarse. A miña irmá por prestarme o seu ordenador cando o meu empezou a fallar e pola compañía prestada ata altas horas da noite. A Melisa, Ángeles e Alba por facer máis levadías as tardes de estudo, por ensinarme a rirme de min mesma e por esas “saídas” tan merecidas, grazas compañeiras de viaxe.

Por último, pero non por iso menos importante, se non todo o contrario, agradecer a meu avó sen o cal esta viaxe sería unha auténtica odisea.

BIBLIOGRAFÍA

- Barman, R. P. (1991). A taxonomic revision of the Indo-Burmese species of *Danio rerio*. *Record of the Zoological Survey of India. Occasional Papers*. 137, 1-91.
- Bill, B. R., Korzh, V. (2014). Choroid plexus in developmental and evolutionary perspective. *Frontiers in Neuroscience*. 8(363), 1-11.
- Dohrmann, G. J. (1970). The choroid plexus: A historical review. *Brain Research*. 18, 197-218.
- Dykstra, M. J. & Reuss, L. E. (2003). *BIOLOGICAL ELECTRON MICROSCOPY: Theory, Techniques and Troubleshooting*. (2^a ed.) New York: Kluwer Academic.
- Engeszer, R. E., Patterson, L. B., Rao, A. A. & Parichy, D. M. (2007a) Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish*. 4, 21-40.
- Fernandez Vega, A. (2015). *Estudio inmunohistoquímico de la distribución del receptor opioide delta (DOR1) en el encéfalo adulto del pez cebra (Danio rerio) y su relación con la Met/Leu encefalina* (Tesis doctoral). Universidade da Coruña, Galicia, España.
- García-Lecea, M., Kondrychyn, I., Fong, S. H., Ye, Z-R., Korzh, V. (2008). *In vivo* Analysis of Choroid Plexus Morphogenesis in Zebrafish. *PLoS ONE*. 3(9), 1-12.
- Gemberling, M., Bailey T. J., Hyde, D. R., Poss, K. D. (2013). The zebrafish as a model for complex tissue regeneration. *Trends Genet*. 29(11), 611-620.
- Howe, D. G., Bradford, Y. M., Eagle, A., Fashena, D., Frazer, K., Kalita, P., Mani, P., Martin, R., Moxon, S. T., Paddock, H. *et al.* (2017). The Zebrafish Model Organism Database: new support for human disease models, mutation details, gene expression phenotypes and searching. *Nucleic Acids Res*. 45, D758–D768.
- Jansen, W. F., de Weger, R. A., Woutersen, R. A. van Loveren, H. & van de Kamer, J. C. (1976). The Saccus Dorsalis of the Rainbow Trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Cell Tiss. Res*. 167, 467-491.
- Kasper, M., Goertchen, R., Stosiek, P., Perry, G., Karsten, U. (1987). Coexistence of cytokeratin, vimentin and neurofilament protein in human choroid plexus. *Vichows Archiv. European Journal of Pathology*. 410(3), 173-177.
- Laale, H. W. (1977). The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research. A literature review. *Journal of Fish Biology*. 10, 121-173.
- Lun, M. P., Monuki, E. S. & Lehtinen, M. K. (2015). Development and functions of the choroid plexus-cerebrospinal fluid system. *Nat Rev Neurosci*. 16(8), 445-457.

- Maldonado, E. (2003). Experimentación en el pez-cebra, un modelo de biología del desarrollo. *Mensaje bioquímico*. 27, 147-156.
- Nelson, J. S., Grande, T. C., Wilson M. V. H. (2006). *Fishes of the world* (4ª ed.) Hoboken: John Wiley and Sons.
- Obermüller-Wilén, H. (1973). Fine Structure and Histochemistry of the Choroid Plexus of the Teleost *Leuciscus rutilus*. *Acta Zool.* 54, 1-8.
- Parichy, D. M. (2007). Homology and the Evolution of Novelty During *Danio* Adult Pigment Pattern Development. *Journal of experimental zoology. Part B, Molecular and developmental evolution*, 308 5, 578-90 .
- Peters, A., Palay, S. L., Webster, H. (1991). Choroid Plexus. *The Fine Structure of the Nervous System: Neurons and Their Supporting Cells*. (3ª ed., p. 328-342). New York: Oxford University Press.
- Pritchard, V. (2001). *Behaviour and morphology of the zebrafish (Danio rerio)*. (Tesis doctoral). University of Leeds, UK.
- Rojas-Muñoz, A., Miana, A. B. & Izpisúa-Belmonte J. C. (2007). El pez cebra, versatilidad al servicio de la biomedicina. *Investigación y ciencia*. 366, 62-69.
- Spence, R., Fatema, M. K., Ellis, S., Ahmed, Z. F. & Smith, C. (2007a). The diet, growth and recruitment of wild zebrafish (*Danio rerio*) in Bangladesh. *Journal of Fish Biology*. 71, 304-309
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C. (2008). The Behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio Rerio*. *Biological Reviews*. 83(1), 13-34.
- Tavares, B. & Santos Lopes, S. (2013). The importance of Zebrafish in biomedical research. *Acta Med Port*. 26(5), 583-592.
- Vijil Scalici, E. N. (2018). *Estudio de la estructura y ultraestructura del plexo coroideo anterior del pez cebra (Danio rerio)* (Trabajo de fin de máster). Universidade da Coruña, Galicia, España.
- Westerfield, M. (2000). *The Zebrafish Book: a guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. (4ª ed.) University of Oregon Press: Eugene.
- Wolburg, H. y Paulus, W. (2010). Choroid plexus: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 119, 75-88.