



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias

Máster Biología Molecular, Celular y Genética

**Estudio de la estructura y ultraestructura
del plexo coroideo anterior del pez cebra
(*Danio rerio*)**

**Study of the structure and ultrastructure of
the anterior choroidal plexus of the
zebrafish (*Danio rerio*)**

**Estudo da estrutura e ultraestrutura do
plexo coroideo anterior no peixe cebra
(*Danio rerio*)**

Trabajo de Fin de Máster presentado por Elsa Ninet Vijil Scalici bajo la dirección del Dr. Julián Yáñez y la Dra. Mónica Folgueira.

A Coruña, 24 de julio del 2018.



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

JULIÁN YÁÑEZ SÁNCHEZ, Catedrático de Biología Celular del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña y MÓNICA FOLGUEIRA OTERO, Profesora Doctora del mismo Departamento.

INFORMAN:

Que el Trabajo de Fin de Máster titulado “*Estudio de la estructura y ultraestructura del plexo coroideo anterior del pez cebra (Danio rerio)*” presentado por la alumna Elsa Ninet Vijil Scalici ha sido realizado bajo nuestra dirección.

Considerándolo finalizado, autorizamos su presentación y defensa.

A Coruña, 17 de julio del 2018.

Fdo:

Dr. Julián Yáñez

Dra. Mónica Folgueira

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
El pez cebra como modelo de estudio en la investigación biomédica.....	3
Características anatómicas y fisiológicas generales de los plexos coroideos.....	4
Los plexos coroideos en el pez cebra y su comparación con otras especies	5
Patologías de los plexos coroideos	9
Justificación	11
Objetivos.....	12
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Modelo de experimentación: pez cebra	12
Mantenimiento y reproducción del pez cebra.....	12
Procesamiento histológico para estudio ultraestructural	13
Análisis ultraestructural	14
Análisis inmunohistoquímico para microscopia óptica.....	14
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
Estructura de la tela y epitelio coroideo en adulto de pez cebra (<i>Danio rerio</i>).....	15
Región vascular y tejido conectivo circundante	25
Estructura de la tela y plexo coroideo en larva de 5 dpf de pez cebra (<i>Danio rerio</i>).....	27
Análisis inmunohistoquímico	30
CONCLUSIONES	31
BIBLIOGRAFÍA	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Diferencias morfológicas externas entre individuos macho y hembra del pez cebra (<i>Danio rerio</i>)-----	3
Figura 2- Esquema comparativo del sistema ventricular entre mamíferos y el pez cebra-----	7
Figura 3- Representación esquemática del proceso de eversión y evaginación-----	8
Figura 4- Esquema de sección transversal de una vellosidad coroidea de mamíferos-----	9
Figura 5- Visualización de plexo coroideo en embriones de pez cebra-----	10
Figura 6- Identificación de la tela coroidea y diferenciación a plexo coroideo en adulto del pez cebra <i>Danio rerio</i> -----	17
Figura 7- Ultraestructura del plexo coroideo anterior del pez cebra adulto-----	18
Figura 8- Ultraestructura de las especializaciones de las membranas apicales de las células del epitelio coroideo del pez cebra adulto-----	19
Figura 9- Especializaciones de la superficie apical del plexo coroideo en el pez cebra adulto-----	21
Figura 10- Detalle de la ultraestructura de algunas especializaciones del epitelio coroideo -----	23
Figura 11- Ultraestructura de algunos componentes citosólicos del epitelio coroideo anterior de <i>Danio rerio</i> -----	24
Figura 12- Ultraestructura de la zona vascular y tejido conectivo circundante del plexo coroideo en el pez cebra adulto -----	26
Figura 13- Identificación de tela coroidea y plexo coroideo en región telencefálica en larva de 5dpf-----	28
Figura 14- Identificación del plexo coroideo en región posterior del telencéfalo en larva de 5 dpf-----	29
Figura 15- Características de las células del plexo coroideo en la larva de 5df-----	30
Figura 16- Micrografía obtenida con microscopio de fluorescencia de una vista lateral del encéfalo de larva de 5 dpf de pez cebra-----	31

ABREVIATURAS

dpf: Días posterior a la fecundación

hpf: Horas post fecundación

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LRP1: Lipoproteína receptora de baja densidad relacionada con la proteína 1

LRP2: Lipoproteína receptora de baja densidad relacionada con la proteína 2

MET: Microscopio electrónico de transmisión

PB: Tampón fosfato

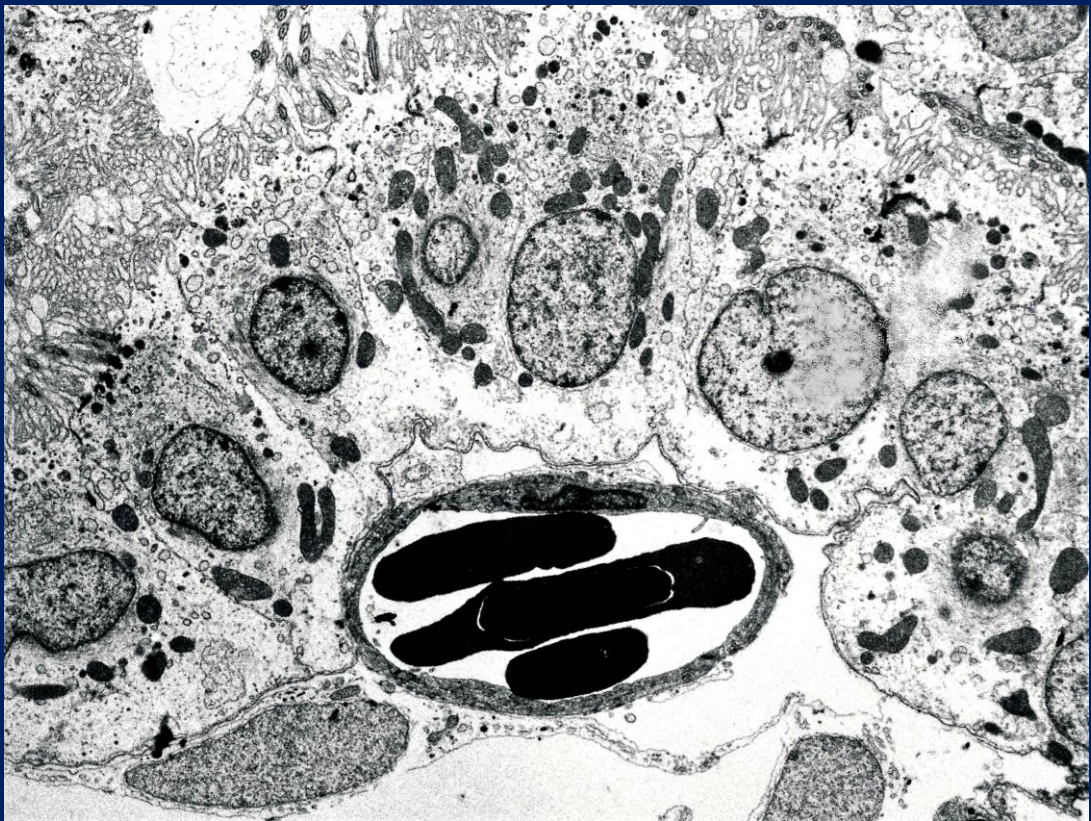
PBTr: Tampón fosfato con Tritón -X100 al 0,5%

PC: Plexo coroideo

PCs: Plexos coroideos

PFA: Paraformaldehído

RE: Retículo endoplasmático



**Estudio de la estructura y ultraestructura del
plexo coroideo anterior del pez cebra (*Danio rerio*)**

RESUMEN

Los plexos coroideos son tejidos altamente vascularizados, formados por un epitelio coroideo que deriva de una fina capa de revestimiento endimario conocida como tela coroidea y una región vascular con tejido conectivo circundante. En el pez cebra (*Danio rerio*) se han descrito dos plexos coroideos, uno anterior a nivel del prosencéfalo y otro posterior a nivel rombencefálico. Debido a la ausencia de información detallada sobre la morfología del plexo coroideo anterior en el pez cebra, se realizó un estudio estructural y ultraestructural con microscopia electrónica de transmisión. Los resultados confirman que el plexo coroideo anterior se localiza a nivel telencefálico y no a nivel diencefálico como había sido propuesto por algunos autores. Se observa que es un derivado de la tela coroidea y se describe morfológicamente como un epitelio monoestratificado cúbico que descansa sobre una lámina basal, con un sistema vascular localizado dorsalmente. Las membranas celulares laterales de las células coroideas muestran uniones intercelulares que lo convierten en un elemento fundamental de la barrera hemato-líquido cefalorraquídeo. Los hallazgos obtenidos en el presente estudio muestran un elevado grado de homología con otras especies, lo que incrementa el interés por el estudio de esta estructura y hacen del pez cebra un posible modelo para el estudio de las patologías relacionadas con este órgano.

Palabras clave: Tela coroidea, sistema ventricular, líquido cefalorraquídeo, barrera hemato-líquido cefalorraquídeo.

ABSTRACT

The choroid plexuses are a highly vascularized tissues, formed by a choroidal epithelium that derives from a thin layer of ependymal lining known as tela choroidea and a vascular region with surrounding connective tissue. In zebrafish, two choroid plexuses have been described, on located anteriorly in the forebrain and another posteriorly in the hindbrain. Due to the lack of detailed information on the morphology of the anterior choroid plexus in the zebrafish (*Danio rerio*), a structural and ultrastructural study was carried out using transmission electron microscopy. Results confirm that the anterior choroid plexus is located in the telencephalon, derivative of the tela choroidea and is described morphologically as a cubic monostratified epithelium, on a basal lamina, with a dorsal localized vascular system and lateral membranes showing intercellular junctions that make it a fundamental element of the blood-cerebrospinal fluid barrier. Our findings show a high degree of homology with other

species, which increases the interest in the study of this structure and make zebrafish a possible model for the study of pathologies related to this organ.

Key words: Tela choroidea, ventricular system, cerebrospinal fluid, blood-cerebrospinal fluid barrier.

RESUMO

Os plexos coroideos son tecidos altamente vascularizados formados por un epitelio coroideo que deriva dunha fina capa de revestimento endimario coñecida como tea coroidea e unha rexión vascular con tecido conectivo circundante. No peixe cebra describíronse dous plexos coroideos, un anterior a nivel do prosencéfalo e outro posterior a nivel do rombencéfalo. Debido á ausencia de información detallada sobre a morfoloxía do plexo coroideo anterior no peixe cebra (*Danio rerio*), realizouse un estudo estrutural e ultraestructural con microscopia electrónica de transmisión. Os resultados confirman que o plexo coroideo anterior localízase a nivel telecefálico, procedente da tea coroidea e descríbese morfolóxicamente como un epitelio monoestratificado cúbico, sobre unha lámina basal, cun sistema vascular localizado dorsalmente e membranas laterais que mostran unións intercelulares que lle convérten nun elemento fundamental da barreira hemato-líquido cefalorraquídeo. Os achados deste estudo mostran un elevado grao de homoloxía con outras especies, incrementando o interese polo estudo desta estrutura e facendo do peixe cebra un posible modelo para o estudo das patoloxías relacionadas con este órgano.

Palabras clave: Tea coroidea, sistema ventricular, líquido cefalorraquídeo, barreira hemato-líquido cefalorraquídeo.

INTRODUCCIÓN

El pez cebrá como modelo de estudio en la investigación biomédica

La investigación biomédica, como integración de los conocimientos de la biología con la medicina, es un pilar fundamental en el campo de la salud y constituye la base de la medicina traslacional, que consiste en facilitar la transición de la investigación básica a aplicaciones clínicas, asegurando que el conocimiento científico llegue a las poblaciones para las cuales han sido diseñadas (Villalobos, 2014). Para efectuar dicha transición es necesario como paso previo realizar estudios preclínicos donde se emplean diversos modelos de investigación. Sin embargo, existen limitaciones en muchos países para el desarrollo de la medicina traslacional, debido a la alta inversión que demanda, especialmente a nivel de las infraestructuras necesarias y en el cuidado de los modelos animales tradicionalmente empleados.

En la búsqueda de un modelo animal de bajo costo y alta versatilidad, surge el pez cebrá (*Danio rerio* Hamilton, 1822) como modelo emergente en la investigación. Es un pez teleosteo de agua dulce, diploide, de aproximadamente 3 a 5 cm de largo, perteneciente a la familia *Cyprinidae* y originario de Bangladesh y la India. Morfológicamente tienen aspecto fusiforme, presenta alrededor de 5 franjas laterales oscuras sobre fondo claro que se extienden desde los opérculos hasta la aleta caudal. Presentan diferencias externas apreciables a simple vista entre machos y hembras (Figura 1).

Figura 1- Diferencias morfológicas externas entre individuos hembra y macho del pez cebrá (*Danio rerio*). (A) Hembra, de mayor tamaño, con incremento de volumen del tronco en relación al macho y color más plateado. (B) Macho, de tonalidad más dorada, cuerpo alargado y más delgado. Imagen tomada de Chivian y Bernstein, 2015.



En 1981, George Streisinger de la Universidad de Oregón, al introducirlo como modelo para el análisis genético en el estudio del desarrollo de vertebrados (Detrich et al., 2009), destacó las características más importantes que posee y que le confieren grandes ventajas frente a otros modelos de vertebrados, dentro de las que se encuentran:

1. El desarrollo embrionario y larval ocurre externamente, con un proceso de desarrollo rápido debido a que el tiempo transcurrido desde la fecundación hasta la edad de adulto joven es relativamente corto (2 a 3 meses).
2. Elevada fecundidad distribuida a lo largo de todo el año, produciendo un gran número de embriones por apareamiento, aproximadamente entre 100 a 200.
3. Transparencia en las primeras etapas de vida embrionaria y larval, permitiendo el seguimiento directo del desarrollo y funcionamiento de los órganos internos, facilitando la realización de estudios embriológicos y de mutagénesis.
4. Adquisición rápida y sencilla, con un costo de reproducción, mantenimiento e infraestructura bajo, al ser comparados por los generados en el caso de otros modelos animales, como roedores.

Otro de los aspectos que ha impulsado la utilización del pez cebra en el área de la investigación, radica en la existencia de bases de datos para el pez cebra (ej. “The Zebrafish Model Organism Database” o “ZFIN”) que contienen, entre otros, información sobre el genoma del pez cebra y sobre diversas líneas transgénicas y mutantes, así como diversos protocolos y técnicas de investigación. Mientras que en Estados Unidos y Europa existe un incremento en el número de publicaciones que han utilizado el pez cebra como modelo de estudio, principalmente en las áreas de biología molecular, genética, toxicología, neurociencias, bioquímica, cardiología y oncología. En la mayor parte de Latinoamérica es un modelo desconocido, siendo los únicos países que lo utilizan Chile, Argentina, Brasil, Colombia y, especialmente México que ha impulsado la divulgación de sus beneficios a través de la Red Latinoamericana de Pez Cebra.

Características anatómicas y fisiológicas generales de los plexos coroideos

Los plexos coroideos (PCs) son tejidos altamente vascularizados, conservados filogenética y ontogenéticamente. Están formados por un epitelio coroideo que deriva de una fina capa de revestimiento ependimario conocida como tela coroidea y una región vascular con tejido conectivo circundante (Peters et al., 1991). En mamíferos, los PCs se localizan dentro las cavidades del encéfalo o ventrículos y son responsables de la producción de la mayor parte del líquido cefalorraquídeo (LCR) (Neman y Chen, 2016).

Diversas funciones han sido atribuidas a las células de los PCs, lo que les permite la producción de LCR, entre ellas: filtración, absorción y secreción (Dohrmann, 1970). A la vez, los PCs, forman parte de la barrera hemato-LCR, que proporciona una puerta de entrada

selectiva para que células inmunes y agentes específicos ingresen al encéfalo (Kaur et al., 2016). Se considera que la permeabilidad a los fármacos a nivel de los PCs es muy superior a la de la barrera hematoencefálica del encéfalo, a pesar de que ésta última presenta un área 1000 veces mayor (Loch-Neckel y Koepp, 2010).

El adecuado funcionamiento de las células de los PCs permite que la producción de LCR en humanos se efectuó a una velocidad de 10-20 ml/h (Neman y Chen, 2016), circulando por el sistema ventricular alrededor de 150 ml de LCR, con una tasa de renovación de tres a cuatro veces por día, lo que representa una producción total diaria de aproximadamente 500 ml de LCR (Zappaterra y Lehtinen, 2012). Asimismo, se ha determinado que en los ventrículos encefálicos en larvas de pez cebra existe un recambio de volumen de LCR de 4 veces al día, de modo semejante al humano (Fame et al., 2016).

Los plexos coroideos en el pez cebra y su comparación con otras especies

Los PCs, como ha sido mencionado anteriormente, se localizan a nivel del sistema ventricular, que constituye un sistema de cavidades y conductos que permiten la circulación del LCR dentro del encéfalo. Por tanto, para facilitar la comprensión de su ubicación es importante recordar que en peces, al igual que en el resto de los vertebrados, el sistema nervioso central se forma a partir del tubo neural, dando lugar a la formación del encéfalo y la médula espinal. La regionalización anteroposterior del encéfalo, permite la formación de las siguientes divisiones, de rostral a caudal: encéfalo anterior o prosencéfalo (que se subdivide en telencéfalo y diencefalo), encéfalo medio o mesencéfalo y encéfalo posterior o rombencéfalo (subdividido tradicionalmente en metencéfalo y mielencéfalo). En mamíferos se han descrito cuatro ventrículos principales dentro del sistema ventricular: los ventrículos laterales (I y II) que se comunican con el tercer ventrículo (III) a través del agujero interventricular de Monro y el cuarto ventrículo (IV), que se conecta con el anterior a través del acueducto cerebral o de Silvio, zona en la que la cavidad ventricular se reduce de tamaño (Figura 2A).

En cuanto a la descripción morfológica del sistema ventricular en el pez cebra planteada por Turner et al., 2012 (Figura 2B) el ventrículo rombencefálico o posterior, es homólogo al cuarto ventrículo de mamíferos, presentando parte de su techo dorsal cubierto por una delgada capa de epitelio. Al igual que en los mamíferos, ventral al cerebelo se encuentra el acueducto ventricular, siendo el segmento más estrecho del sistema, que se continúa rostralmente con el ventrículo diencefálico, equivalente al tercer ventrículo. En teleósteos, existen además dos

expansiones laterales en cada lóbulo del techo (*tectum*) óptico denominados ventrículos tectales. En el prosencéfalo el ventrículo diencefálico se continua rostralmente con el ventrículo telencefálico que se mantiene como estructura impar a consecuencia del proceso de eversión durante el desarrollo telencefálico (Duvernoy y Risold, 2007), lo que representa una de las principales diferencias con el sistema ventricular de mamíferos.

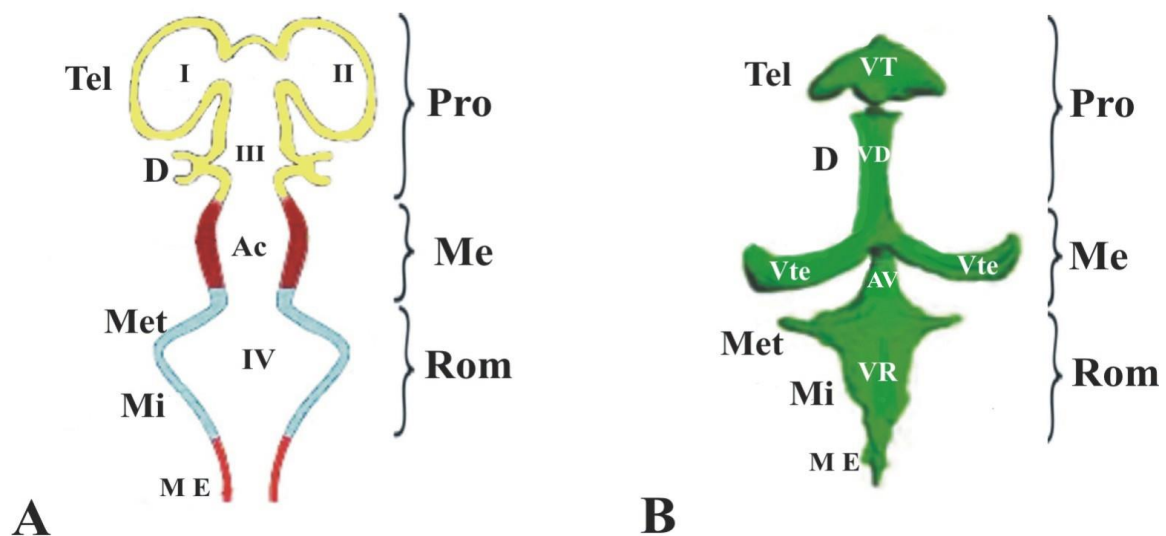


Figura 2- Esquema comparativo del sistema ventricular entre mamíferos y el pez cebra. (A) Representación del sistema ventricular de mamíferos y descripción de la regionalización de rostral (hacia arriba) a caudal del encéfalo. (B) Representación del sistema ventricular del pez cebra y sus subdivisiones encefálicas. Ac, acueducto cerebral; AV, acueducto ventricular; D, diencefalo; ME, médula espinal; Me, mesencéfalo; Met, metencéfalo; Mi, mielencéfalo; Pro, prosencéfalo; Rom, rombencéfalo; Tel, telencéfalo; VD, ventrículo diencefálico; VT, ventrículo telencefálico; Vte, ventrículo tectal; VR, ventrículo rombencéfálico; I y II, ventrículos laterales; III, tercer ventrículo; IV, cuarto ventrículo. Imágenes modificadas de Redolar, 2008 (A) y Turner et al., 2012 (B).

En mamíferos, el telencéfalo consiste en dos hemisferios, cada uno alrededor de un ventrículo lateral generados durante el desarrollo por un proceso denominado evaginación (Figura 3, derecha). Sin embargo, en peces teleósteos, el telencéfalo se desarrolla mediante el proceso de eversión (Figura 3, izquierda), el cual consiste en una flexión hacia afuera de las paredes laterales del telencéfalo, de modo que el telencéfalo dorsal (palio) se pliega lateralmente sobre el telencéfalo ventral (subpalio). Por tanto, en el pez cebra el encéfalo anterior contiene dos lóbulos telencefálicos sólidos, con una cavidad ventricular que los separa, presentando en la superficie dorsal telencefálica una delgada capa de tela coroidea, que cubre el espacio ventricular (Figura 3).

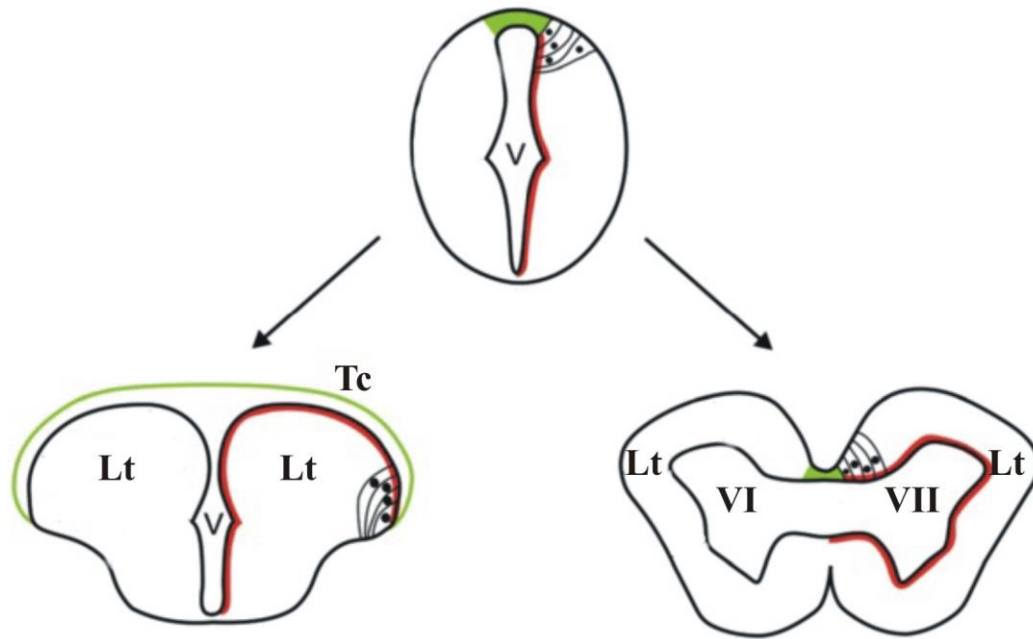


Figura 3 Representación esquemática del proceso de eversión y evaginación. A la derecha se muestra la evaginación de las vesículas telencefálicas en mamíferos, observando los lóbulos telencefálicos (Lt) alrededor de los ventrículos laterales (I y II) en contraste a la eversión ocurrida en teleosteos representada a la izquierda, en la cual se aprecia los lóbulos telencefálicos (Lt) solidos con una cavidad ventricular (V) impar que los separa y cubiertos en la superficie dorsal por la tela coroidea (Tc). Este proceso también reubicaría algunas células ventriculares a la superficie dorsal telencefálica (línea roja). Imagen modificada de Folgueira et al., 2012.

Los PCs en mamíferos se desarrollan en fases tempranas del periodo embrionario, ocurriendo de manera similar en el pez cebra. Ya que a través del estudio realizado por Henson et al. (2014), se demostró que en *Danio rerio* a las 30 horas post fecundación (hpf), se observa la aparición de las células del plexo coroideo (PC) en la línea media del ventrículo rombencefálico (PC posterior) y consecutivamente una segunda estructura a nivel del encéfalo anterior (PC anterior). Haciendo uso de la transparencia que brindan los embriones y larvas tempranas del pez cebra, García-Lecea et al. (2008) desarrollaron un análisis *in vivo* de las fases del desarrollo del PC posterior, encontrando que éstas difieren en algunos aspectos a las tradicionalmente basadas en la morfología de las células epiteliales y la presencia de glucógeno (Dohrmann, 1970). Esta nueva caracterización propone tres fases en el desarrollo del PC posterior (García-Lecea et al., 2008). Una primera fase que comenzaría con el reclutamiento de células originadas en el neuroepitelio dorsal del tubo neural y la migración de las células del rombencéfalo hacia la línea media, donde forman una monocapa que constituye la tela coroidea. En esta fase la vía de señalización Notch es la encargada de regular la expresión de proteínas que participan en los eventos de adhesión celular. En una

segunda fase, Sonic hedgehog promueve la proliferación celular, mantiene la viabilidad celular de la tela corioidea y ayuda a la formación de las células del PC. En la tercera y última fase, se produciría un cambio en el comportamiento celular que involucra la adquisición de la capacidad de detectar el lugar de coalescencia y la capacidad de moverse de manera coordinada no solo a lo largo del eje medio-lateral, sino también hacia una posición específica a lo largo del eje anteroposterior; vinculando el movimiento rápido detectado, a la presencia de reservas de glucógeno.

En el caso de mamíferos, tras el nacimiento los PCs continúan el proceso de maduración, manteniendo una estructura de epitelio monoestratificado, con células cuboides de aproximadamente $15\mu\text{m}$ de alto (Dohrmann, 1970), un núcleo redondeado que puede ser central o basal, aumento en el número de mitocondrias y la presencia de uniones estrechas (Del Biggio, 1995). Las uniones estrechas se concentran en ambos lados de las células epiteliales cerca de la parte apical, impidiendo la difusión pasiva de sustancias entre la sangre y el LCR (Redzic y Segal, 2004). El polo basal del epitelio es descrito como una membrana que contiene numerosas interdigitaciones con fibras de colágeno, escasas células dendríticas, macrófagos, fibroblastos y grandes capilares con endotelio fenestrado, esenciales para el intercambio de moléculas entre la vasculatura y el fluido intersticial circundante (Figura 4).

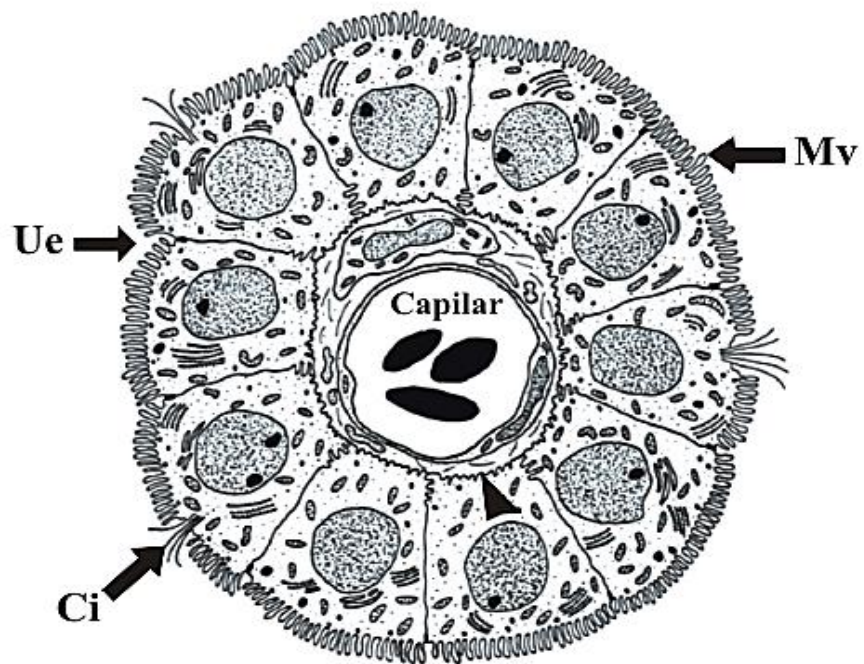


Figura 4- Esquema de sección transversal de una vellosidad corioidea de mamíferos. Ci, cilios; Ue, uniones estrechas; Mv, microvellosidades; punta de flecha, membrana basal. Imagen modificada de Dohrmann, 1970.

En contraposición a la detallada caracterización que se encuentra de las células de los PCs en los modelos de mamíferos, en el pez cebra, aunque hay identificación del PC prosencefálico (anterior) y rombencefálico (posterior) (Figura 5A), hay pocos estudios con descripciones morfológicas de sus células y, los pocos que hay, han sido realizados únicamente en el PC rombencefálico o posterior (García-Lecea et al., 2008). A partir de secciones histológicas, el PC posterior del pez cebra se describe como un epitelio monoestratificado de células cuboidales, procedentes de la tela corioidea y con su superficie apical dirigida hacia en el espacio ventricular (Figura 5B). En el caso del PC anterior no existe información en relación a la caracterización morfológica de sus células, por lo que no es posible una comparación con el PC posterior del pez cebra o con lo reportado del PC anterior/saco dorsal en otras especies de teleósteos (Jansen et al., 1976).

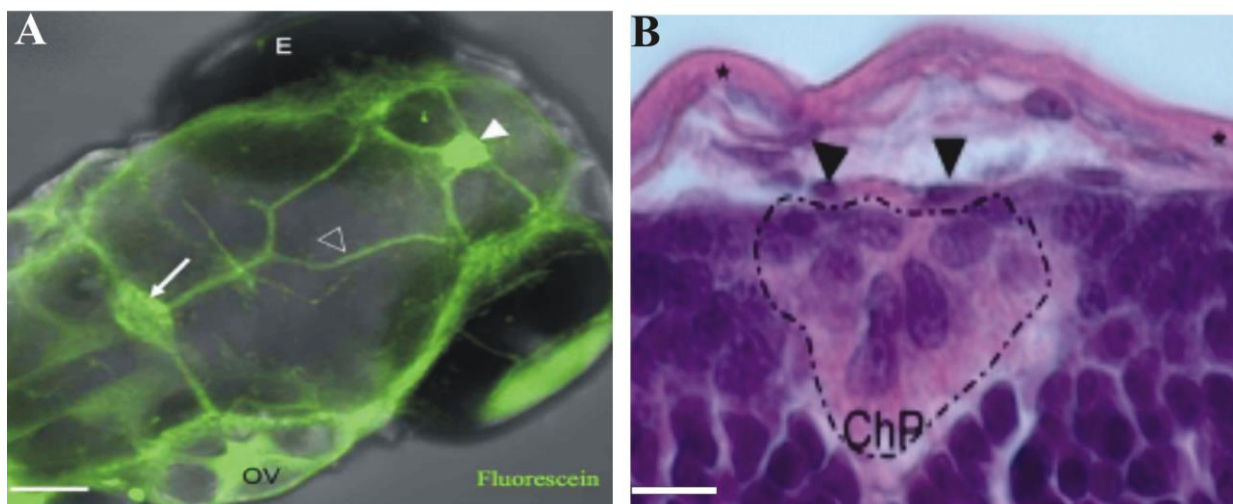


Figura 5- Visualización de plexo coroideo en embriones de pez cebra. **(A)** Vista dorsal de embrión de pez cebra de 4dpf donde a partir del marcaje vascular (en verde) se aprecia la posible ubicación del plexo coroideo anterior (punta de flecha) y posterior (flecha), así como la vasculatura suprayacente (perfil de flecha). E, ojo; OV; vesícula ótica. **(B)** Sección transversal del plexo coroideo del ventrículo posterior (ChP) en embrión de pez cebra con tinción hematoxilina–eosina. Asterisco: tegumento; punta de flecha; vasos. Imágenes tomadas de Henson et al., 2014 (A) y García-Lecea et al., 2008 (B).

Patologías de los plexos coroideos

Los cambios en la estructura y funcionamiento de los PCs contribuyen al inicio y/o progreso de diversas patologías. Estas enfermedades afectan desde el periodo gestacional, debido al papel que desempeñan los PCs en la modulación de la neurogénesis (Johansson, 2014), hasta la edad adulta. Se observan cambios en los PCs ocurridos con el envejecimiento: las células de los PCs, al ser dependientes de energía, son incapaces de mantener la producción normal

de ésta con el envejecimiento, lo que conduce a una reducción de la actividad enzimática, afectando profundamente el metabolismo celular normal. Estos resultados observados con la edad, complementan los estudios de imagen por medio de Tomografía Axial Computarizada en humanos, que reportan cambios de los PCs atribuidos al envejecimiento, presentados como calcificaciones localizadas frecuentemente en los ventrículos laterales y en el cuarto ventrículo (Orellana, 2003).

Cuando a nivel encefálico se producen cuadros de hipoxia e isquemia, el incremento de la severidad del episodio ocasiona muerte celular de los PCs, que conduce a un aumento de la permeabilidad de la barrera hemato-LCR proporcionando un acceso a las citocinas circundantes y moléculas citotóxicas que pueden agravar la lesión (Sanberg y Sanberg, 2006). Por otro lado, las alteraciones en la homeostasis entre la producción de LCR y su reabsorción puede originar hidrocefalia, patología caracterizada por un incremento del volumen total de LCR en el interior de la cavidad craneal que genera una dilatación ventricular. Dentro de su etiopatogenia destaca la hipersecreción de LCR (Nazar y Nazar, 1985) a causa de una hiperplasia vellositaria difusa de los PCs, que desencadena una hipersecreción de LCR por un aumento en el número de las células del epitelio del PC. (Karimy et al., 2016).

Variaciones en las células de los PCs también han sido implicadas en diversas enfermedades neurodegenerativas, encontrándose en modelos animales atrofia de células epiteliales con disminución de la altura celular en un 22%, microvellosidades fibróticas, engrosamiento vascular, cuerpos hialinos, calcificaciones y depósitos de inmunoglobulinas a lo largo de la membrana basal (Sanberg y Sanberg, 2006). Respecto a la enfermedad de Alzheimer, el deficiente aclaramiento β -amiloide a través de la barrera hemato-LCR, por los receptores LRP-2 y LRP-1 (González et al., 2014). Asimismo, la disminución en el nivel de transtiretina, la cual se asocia con el β -amiloide para formar complejos y evitar así el desarrollo de placas $A\beta$ (Balusu et al., 2016), han relacionado a las células del PC con la patogénesis de esta enfermedad.

Finalmente, en relación al aspecto oncológico, se ha demostrado que la señalización aberrante de Notch genera tumores de los PCs (Brent et al., 2008). Un grupo de neoplasias cerebrales raras, predominantemente pediátricas, localizadas en su mayoría a nivel de los ventrículos laterales. En la edad adulta también existen neoplasias del PC, frecuentemente carcinomas a nivel del cuarto ventrículo que cursan con un mal pronóstico (Pérez et al., 2016). En el caso del tercer ventrículo se desarrolla xantogranulomas, tumores benignos pero sintomáticos en

esta ubicación, por su capacidad de obstruir el agujero de Monro, desencadenado hidrocefalia adquirida (Insausti et al., 2009).

Justificación

Los PCs son estructuras no solo implicadas en la formación del LCR, sino que también ejercen diversas funciones que los convierten elementos clave de la barrera hemato-LCR. Los PCs influyen significativamente en el correcto funcionamiento neurológico, motivo por lo que las patologías que origina o exacerba son de pronóstico crítico.

Aunque han sido empleados una variedad de modelos de mamíferos para el estudio de los PCs, en los últimos años el pez cebra ha surgido como posible modelo por las numerosas ventajas que presenta. Es importante subrayar que diversas investigaciones (Turner et al., 2012; Henso et al., 2014; Korzh, 2018) han determinado que, a pesar de las diferencias existentes en el sistema ventricular del pez cebra, éste conserva similitudes con el de mamíferos. Esto permite la viabilidad del estudio de enfermedades que afectan a estas cavidades y a los PCs, cuya investigación en mamíferos resulta difícil debido a que los ventrículos están situados en las profundidades del encéfalo.

Algunas investigaciones han sugerido que el conocimiento mejorado de la fisiología molecular del transporte iónico de los PCs y los mecanismos que regulan la tasa de secreción del LCR podrían ser empleados como estrategias terapéuticas no invasivas en la hidrocefalia. Ejemplo de ello es la aquaporina 1 donde estudios en ratones han demostrado que su reducción disminuye la producción de LCR (Wang et al., 2011), aproximadamente en un 20-30% (Beitz, 2009). En cambio, con el uso de la aquaporina 4, se plantea un efecto neuroprotector al incrementar la adsorción del LCR por parte de esta proteína (Bloch et al., 2006). Por lo tanto, los PCs se colocan en la mira de la medicina regenerativa, porque al profundizar su estudio ayuda a determinar dianas terapéuticas potenciales, para tratamientos de las enfermedades con las que se relaciona, proporcionando un beneficio al paciente que la padece y contribuyendo a mejorar su calidad de vida.

Al analizar el pez cebra como modelo en la investigación de los PCs, nos encontramos con la limitación de que, a pesar de la información previa en relación a la organización de su sistema ventricular, así como el uso de líneas transgénicas que han identificado la posible presencia de un PC tanto en el ventrículo rombencefálico o posterior como a nivel del encéfalo anterior, solo se dispone de la descripción morfológica del PC del ventrículo posterior. Carecemos de

información sobre las células del PC del ventrículo anterior de esta especie, razón por la que estimamos conveniente realizar un estudio morfológico detallado de las mismas, originadas por especialización de las células de la tela coroidea, tal como ocurre en el PC del ventrículo posterior y en mamíferos.

Objetivos

- 1- Describir y analizar las características morfológicas de las células de la tela coroidea presentes sobre el espacio ventricular del prosencéfalo para que, mediante la comparación con los datos de otras especies, confirmar la presencia de un plexo coroideo anterior especializado en el adulto del pez cebra (*Danio rerio*).
- 2- Analizar en larvas de pez cebra de 5dpf la morfología de las células de la tela coroidea encontradas en el ventrículo anterior y determinar su grado de diferenciación estructural con respecto a un PC desarrollado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modelo de experimentación: pez cebra

El animal de experimentación utilizado ha sido el pez cebra (*Danio rerio* Hamilton, 1822). Tanto las larvas como adultos empleados fueron tipo salvaje, procedentes del Laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña. Los peces fueron manipulados observando las directrices de la Unión Europea (2010/63/UE) y la legislación española (RD 1201/2005, BOE 252/34367-91, 2005) vigentes para el uso y cuidado de animales de experimentación.

Mantenimiento y reproducción del pez cebra

Los individuos adultos fueron mantenidos en acuarios de aproximadamente 10 L de volumen con agua dulce desclorada a temperatura de 28 °C. La iluminación se mantuvo con ciclos de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Para la obtención de las larvas el día previo a la puesta, los ejemplares reproductores (dos hembras y un macho) se trasladaron a una pecera de cría, que permite la recolección de los huevos al quedar estos depositados en una cámara separada de los adultos. Tras el estímulo luminoso que induce la liberación de los gametos, se recogió la puesta y se analizó bajo un estereomicroscopio para separar los oocitos que fueron fecundados. Los embriones fueron colocados en placas Petri con agua desclorada y

esterilizada, donde se mantuvieron en una estufa de incubación a 28 °C hasta alcanzar el estadio de 5dpf en base a la clasificación de Kimmel et al. (1995). Es este estadio se procesaron para microscopía electrónica e inmunohistoquímica.

Procesamiento histológico para estudio ultraestructural

Previo a la fijación, los individuos tanto de larvas (10 individuos) como adultos (3 individuos) fueron anestesiados por inmersión con metasulfonato de tricaina (MS222 o TMS, SIGMA), administrado en una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml. El anestésico es absorbido a través de las branquias y piel, posteriormente ingresa al torrente sanguíneo distribuyéndose por todo el cuerpo. Las concentraciones se metabolizan rápidamente por reacciones de acetilación, con una vida media plasmática estimada de 1,5 a 4 horas (Carter et al., 2011). Al encontrarse el pez cebra adulto en el nivel 6 de sedación, caracterizado por el cese del movimiento opercular completo (Matthews y Varga, 2012) y en el caso de la larva la ausencia de movimiento, se prosiguió a realizar la fijación.

En el caso de los individuos adultos, se practicó una abertura dorsal del cráneo para exponer epitelio y los tejidos que cierran dorsalmente el espacio ventricular de los lóbulos telencefálicos. Tras la decapitación, las cabezas se fijaron por inmersión en una solución fría de paraformaldehído (PFA) al 2% y glutaraldehído al 1%, en tampón fosfato 0,1 M y pH 7,4 (PB). Debido al pequeño tamaño de las larvas de 5 días, la fijación realizada fue directamente por inmersión de los individuos en la misma solución fijadora durante 8 horas. Una vez efectuada la fijación, se realizó la extracción del encéfalo del pez cebra adulto, y las muestras fueron lavadas y transferidas a PB a 4 °C hasta su postfijación.

La postfijación se realizó haciendo uso de tetróxido de osmio (OsO_4) al 1% en PB 0,1 M. Este paso es requerido para la visualización de los tejidos biológicos al microscopio electrónico, debido a su efecto en la inmovilización de los lípidos y la incorporación de los átomos del metal pesado (osmio), origen del contraste para la visualización ulterior de las estructuras celulares. Transcurrida 1 hora de postfijación, se efectuaron lavados con agua destilada y las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de acetona. La inclusión se llevó a cabo en moldes de silicona con resina de Spurr, la cual se dejó polimerizar dos días en una estufa a 60°C; esta resina es de tipo epoxi, que posee baja viscosidad y presenta una alta tasa de penetración en los tejidos.

Para el análisis histológico se obtuvieron secciones semifinas de 0,35-0,40 μm , que se tiñeron con azul de toluidina-borax al 1% y fueron observadas y fotografiadas al microscopio óptico. Una vez alcanzada la zona deseada, se procedió a realizar cortes ultrafinos de 70 a 80 nm. Se utilizó en ambos casos un ultramicrotomo Ultracut E (Reichert-Jung), empleando una cuchilla de diamante (DIATOME) para los cortes ultrafinos. Las secciones se recogieron de forma seriada en rejillas de cobre de malla 200, recubiertas con una delgada película de soporte tipo polivinilo formol (Formvar). Posteriormente las secciones fueron contrastadas durante 10 minutos con una solución de acetato de uranilo 1% en metanol y 15 minutos de citrato de plomo.

Análisis ultraestructural

Una vez finalizado el procedimiento de contrastado de las muestras, se procedió a la observación ultraestructural y estudio de las mismas en un microscopio electrónico JEM 1010 (JEOL) a 80KV disponible en la Unidad de Microscopía (UM) de los “Servicios de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de A Coruña”. Asimismo, se tomaron imágenes seleccionadas con una cámara digital acoplada a la columna del microscopio con el software de control DigitalMicrograph. Las estructuras subcelulares se apreciaron como electrondensas y electronlúcidas, gracias a la tinción realizada con los metales pesados que se unen en grado variable a los diversos componentes celulares. Cuando el depósito del metal es elevado, se impide la transmisión del haz de electrones a través de esta área del preparado (estructura electrondensa), tornando la imagen en un color gris oscuro o negro; en cambio en las zonas donde la afinidad por los metales pesados es escasa o nula (estructura electronlúcida), se observan de color gris claro o blanco, porque se permite una mayor transmisión del haz de electrones.

Una vez colocadas las rejillas que portaban las secciones ultrafinas a analizar en el portamuestras, éste se introdujo primero en una antecámara donde se extrae el aire antes de introducirla en la columna del microscopio con alto vacío. Durante la observación se regularon en función de lo observado tanto las aperturas del condensador como del objetivo. El procesado de las imágenes digitales obtenidas (ajuste del brillo y contraste) y su posterior edición se realizó con el paquete informático COREL®Suite.

Análisis inmunohistoquímico para microscopia óptica

Adicionalmente, se aplicó la técnica de inmunofluorescencia indirecta en larvas de pez cebra (10 individuos) de 5dpf, con la finalidad de identificar si los filamentos observados a nivel

ultraestructural con la microscopía electrónica de transmisión (MET) corresponden a la proteína vimentina. Para el procesamiento de los individuos en estudio, se anestesiaron por inmersión larvas de 5dpf utilizando como sedante metasulfonato de tricaína. Seguidamente se realizó la fijación por inmersión con el uso de PFA al 4% y sacarosa al 4% en PB 0,1M durante 4 horas a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se efectuaron lavados en PB con Tritón-X100 al 0,5% (PBTr) durante 15 min. Posteriormente, se llevó a cabo la disección bajo un estereomicroscopio para la exposición del encéfalo, y las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de metanol y se almacenaron a -20°C durante la noche. Para permeabilizar las membranas y permitir que el anticuerpo pueda llegar al antígeno intracelular, se utilizó proteinasa K a una concentración de 1:1000 en PBTr durante 15 minutos a temperatura ambiente. Al concluir este periodo de tiempo se realizaron 3 aclarados con PBTr y una postfijación con PFA al 4% durante 20 minutos.

Para la inmunohistoquímica, la primera incubación se realizó con una solución de bloqueo constituida por suero normal de cabra al 1% en dimetilsulfóxido (DMSO) al 0,5% y PBTr durante 1 hora, con el objetivo de bloquear las uniones inespecíficas. A continuación, se efectuó la incubación con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-vimentina (dilución 1:500) en solución de bloqueo, durante 24 horas a 4°C. Por último, se realizó la incubación en oscuridad con el anticuerpo secundario, empleando un anticuerpo cabra anti-ratón unido a la molécula fluorescente Alexa Fluor 488 (dilución 1:500, Invitrogen), durante 24 horas y a 4°C. Finalmente, se transfirieron las muestras a un portaobjetos excavado con PBTr y se visualizaron en un microscopio de fluorescencia Eclipse 90i (Nikon), obteniendo las imágenes con una cámara digital DP71 (Olympus) acoplada al microscopio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estructura de la tela y epitelio coroideo en adulto de pez cebra (*Danio rerio*)

Las células del PC anterior del pez cebra fueron observadas cubriendo la superficie dorsal de los lóbulos telencefálicos y la cavidad ventricular telencefálica media, homóloga a los ventrículos I y II en mamíferos. Tanto a microscopía óptica como electrónica, se observó que las células de los márgenes laterales y rostromediales al PC forman un epitelio monoestratificado pavimentoso, con células planas que en sección transversal adoptan una forma ahusada. Estas células, que corresponderían a la tela coroidea, presentan núcleos

alargados localizados a nivel central, de aproximadamente 5 μ m de largo (Figuras 6A-B). A través del MET se observaron algunas especializaciones en esta capa epitelial, como microvellosidades y cilios (Figura 6C), aumentando la cantidad de estas estructuras en la región caudomedial del telencéfalo (Figura 6E) donde se pudo apreciar cómo las células de la tela coroidea experimentan una diferenciación hacia la línea media (Figura 6D-F) para constituir el PC. Por tanto, en virtud de los hallazgos encontrados en este estudio, se confirma que el PC anterior procede de la tela coroidea telencefálica, localizándose en el ventrículo de la región telencefálica. A diferencia de lo expuesto por algunos investigadores que parecen considerar al PC anterior de *Danio rerio* como una estructura diencefálica (Korzh, 2018), nuestros resultados muestran claramente que tanto la ubicación final como el proceso de diferenciación de esta estructura ocurre a nivel telencefálico y que por tanto debe considerarse como una especialización telencefálica, como en el resto de los vertebrados.

El PC desarrollado se encuentra compuesto por la yuxtaposición del epitelio coroideo y el sistema vascular. Morfológicamente las células que conforman el epitelio coroideo del PC en el ventrículo anterior del pez cebra forman un epitelio monoestratificado cúbico, apoyado sobre una lámina basal, con un sistema vascular localizado dorsalmente adyacente a dicha lámina, y que define el polo basal del epitelio coroideo (Figura 7). Hallazgos similares se han descrito en relación al saco dorsal (*saccus dorsalis*) de otros teleósteos, como la trucha arcoíris (Jansen et al., 1976). Este saco dorsal se describe como una expansión de la tela coroidea a nivel caudal del telencéfalo, formada por un epitelio simple con células cúbicas similares a las del epitelio coroideo del PC anterior del pez cebra.

En la región apical de las células del epitelio coroideo, las membranas celulares laterales se aproximan entre sí (Figuras 6F; 8A; 11C) y se asocian por medio de especializaciones de membrana, observándose zonas en las que se encuentran en estrecho contacto y donde parecen haberse fusionado (Figura 8C). Estas especializaciones se corresponden con uniones estrechas u oclusivas, características de numerosos epitelios, las cuales sellan las uniones entre las células y generan barreras de permeabilidad, definiendo en este tipo de epitelios dos dominios de membrana: un dominio apical en contacto con el lumen, o en este caso con el ventrículo y el LCR, y un dominio basolateral.

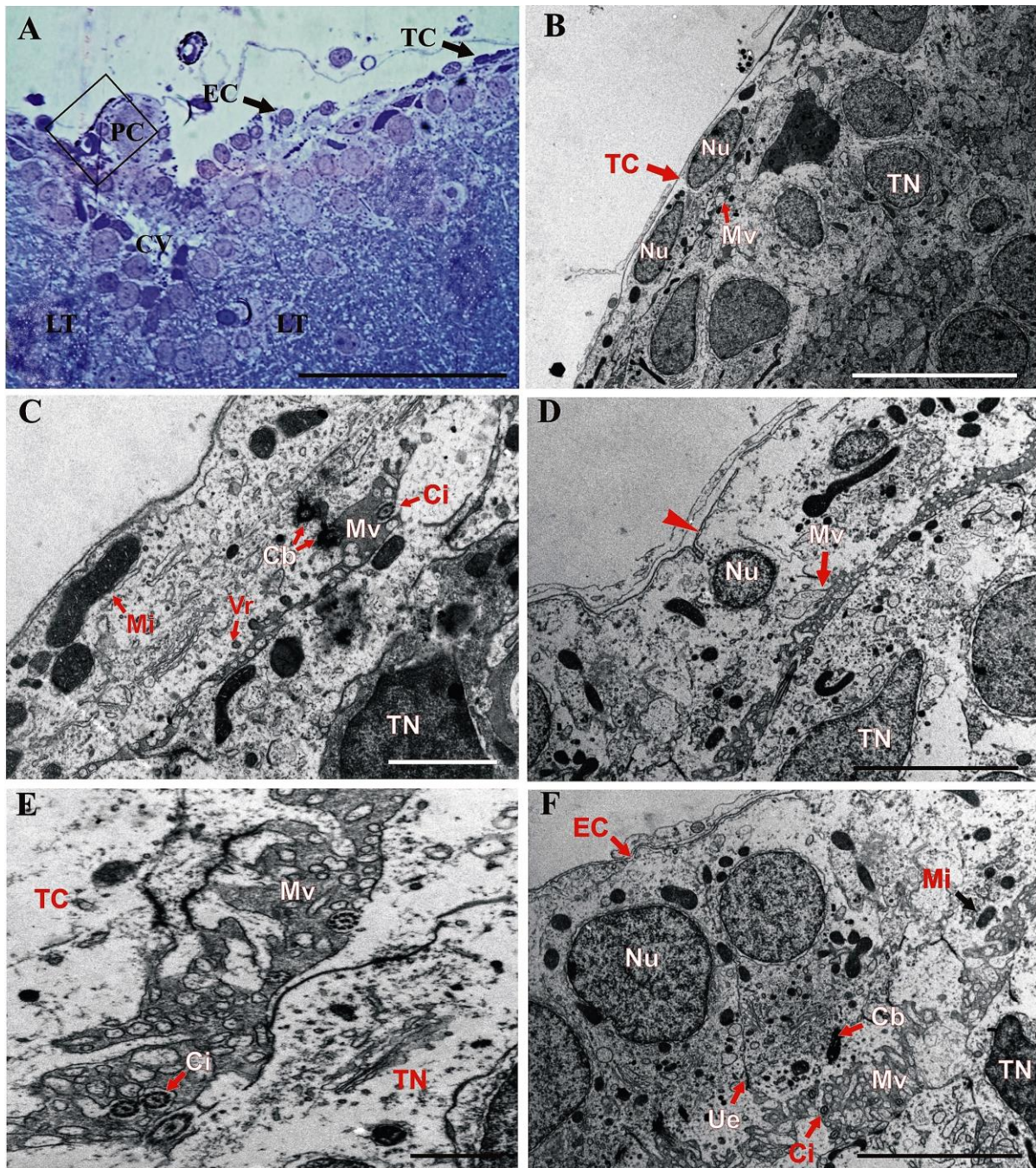


Figura 6- Identificación de la tela corioidea y diferenciación a plexo corioideo en adulto del pez cebra *Danio rerio*. (A) Sección transversal teñida con azul de toluidina, mostrando células correspondientes a la tela corioidea (TC) y su continuidad con el epitelio del plexo corioideo (PC) en la cavidad ventricular (CV), entre los lóbulos telencefálicos (LT). (B) Ultraestructura de la TC caracterizada por epitelio simple, células planas, con núcleos (Nu) alargados. (C) Se observan especializaciones presentes en la superficie apical de las células de la TC (B), nótese la presencia de cuerpos basales (Cb) y vesículas revestidas (Vr). (D) Se indican cambios morfológicos de la TC (punta de flecha) en su proceso de diferenciación al epitelio corioideo del PC hacia la línea media. (E) Detalle de las especializaciones de la superficie apical de la sección (D), observándose un incremento de microvellosidades (Mv) y cilios (Ci) en el epitelio corioideo en comparación con la sección a nivel de las células de la tela (C) (F) Identificación del epitelio corioideo (EC), observándose un aumento en el número de mitocondrias (Mi) y especializaciones tanto de la membrana lateral como de la superficie apical. TN, tejido nervioso; Ue, unión estrecha. Barras de calibración: 10µm (A); 5µm (B,D,F); 2 µm (C); 1µm (E).

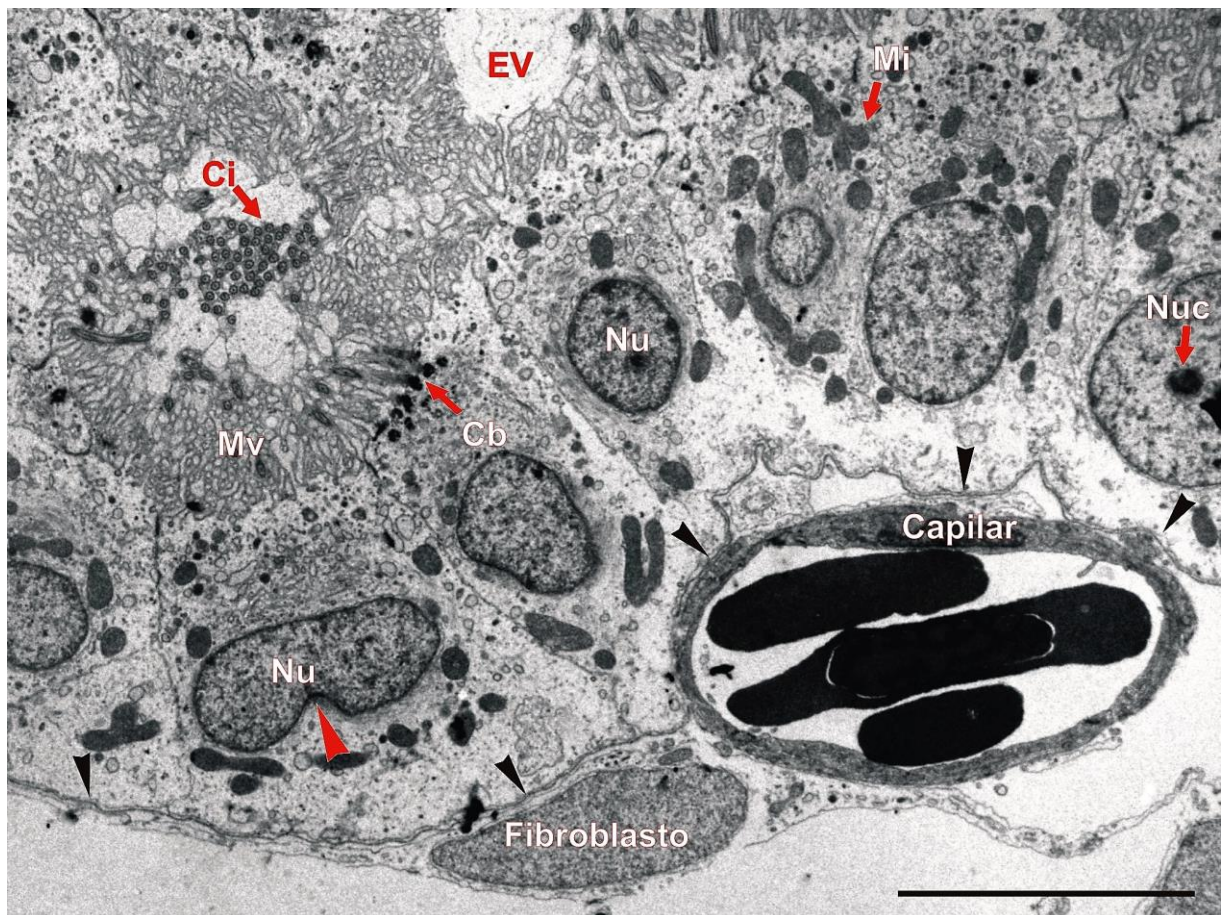


Figura 7-Ultraestructura del plexo coroideo anterior del pez cebra adulto. El PC se caracteriza por un epitelio coroideo monoestratificado cúbico, algo replegado y apoyado sobre una lámina basal (puntas de flecha negra), con numerosas mitocondrias (Mi) y núcleos (Nu) esféricos que en algunos casos presentan una clara indentación lateral (punta de flecha roja). En la superficie apical se aprecian cilios (Ci) y microvellosidades (Mv) hacia el espacio ventricular (EV). En la porción basal se asocia a un sistema vascular representado por capilares. Cb, cuerpos basales; Nuc, nucleolo; Barra de calibración: 10 μ m.

Localizados justo por debajo de las uniones estrechas, se apreciaron uniones adherentes del tipo conocido como cinturón adherente o bandas de adhesión (*zonula adhaerens*), donde las membranas plasmáticas de las células adyacentes se aproximan dejando un estrecho espacio entre ellas y flanqueadas intracelularmente por unas masas electrondensas que representan los haces paralelos de microfilamentos (Figura 8B). Asimismo, en las membranas laterales se observaron ocasionalmente desmosomas (*macula adhaerens*), en este caso distinguiéndose dos membranas opuestas separadas por un espacio intercelular y rodeadas por una placa electrondensa en la cara citoplasmática de cada membrana (Figura 8D). Descripciones similares se encuentran para el epitelio del PC posterior del teleósteo *Leuciscus rutilus*, donde se reportan apicalmente uniones estrechas, seguidas de una *zonula adhaerens*, así como

presencia de desmosomas (*macula adhaerens*) en las membranas laterales (Obermüller-Wilén, 1973).

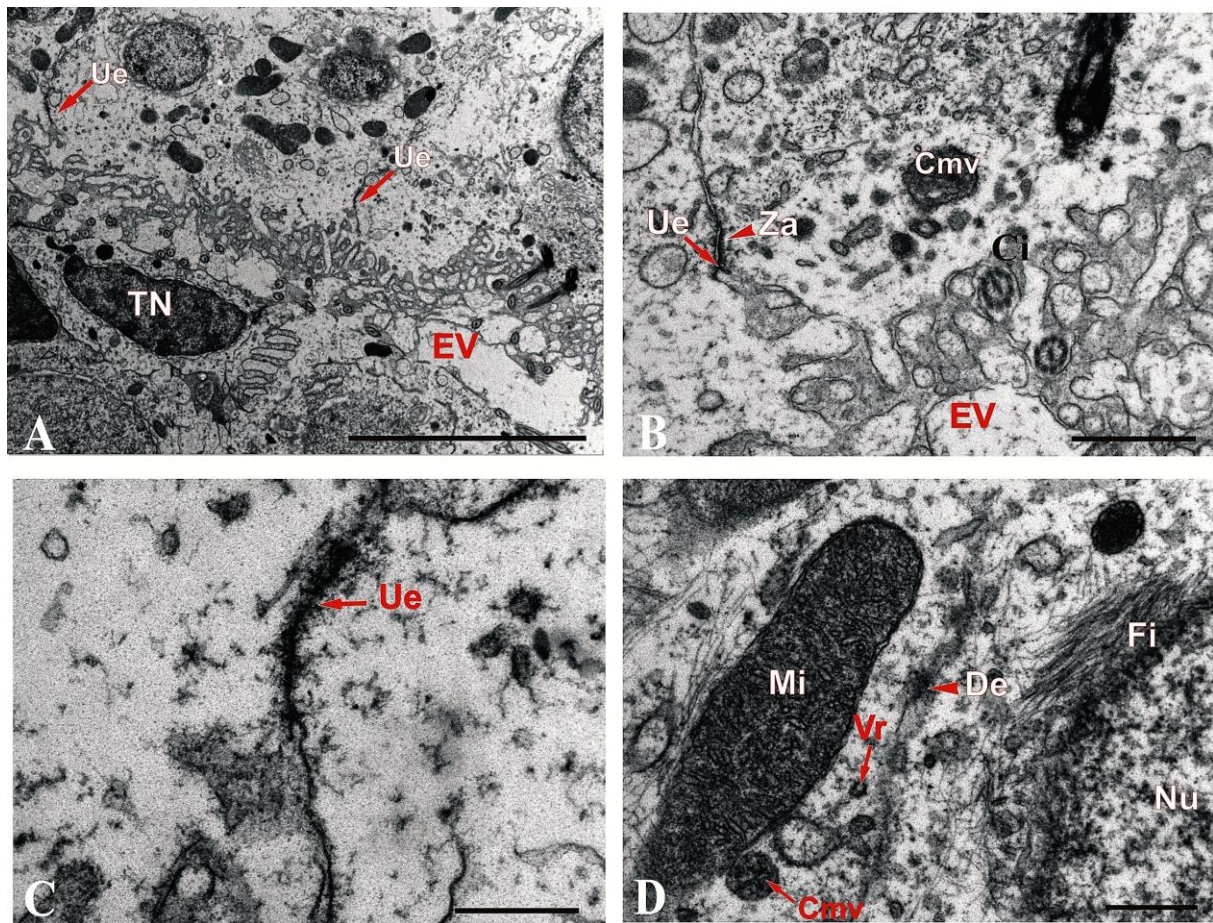


Figura 8- Ultraestructura de las especializaciones de las membranas apicales de las células del epitelio corioideo del pez cebra adulto. (A) Membranas laterales con presencia de uniones estrechas (Ue) próximas a la porción apical. (B) Detalle de una *zonula adherens* (Za) bajo la Ue. (C) Detalle a mayor aumento de la membrana apical de las células del PC mostrando uniones especializadas de membrana. (D) Detalle de las membranas laterales de dos células adyacentes mostrando la existencia de un desmosoma (De), Nótese la existencia de haces de filamentos intermedios (Fi) adyacentes al núcleo (Nu). Cmv, cuerpo multivesicular; EV, espacio ventricular; Mi, mitocondria; TN, tejido nervioso; Ue, unión estrecha; Vr, vesícula revestida. Barras de calibración: 5 μ m (A); 500nm (B,C); 100 nm (D).

El PC adulto en su superficie ventricular presenta dos características importantes. Una de ellas es la presencia de abundantes repliegues de membrana o microvellosidades generalmente entrelazadas entre sí y la presencia de múltiples cilios de aproximadamente 0,2 μ m de diámetro (figuras 6F; 7; 9A-B). Las microvellosidades se observaron como pequeñas proyecciones digitiformes de la membrana plasmática, con cierta heterogeneidad morfológica, que incrementan la superficie de contacto con el LCR. A diferencia de las microvellosidades largas, delgadas y uniformes que forman los ribetes en cepillo o estriados de los epitelios

descritos en enterocitos o las células del túbulo contorneado proximal renal, las microvellosidades del PC difieren de aquellos por la ausencia de los densos paquetes de microfilamentos que los caracterizan. La morfología observada en las microvellosidades del PC del pez cebra es compartida con la de mamíferos (Peters et al., 1991) y presenta una semejanza mayor con las microvellosidades corioplacentarias. En cualquier caso, estas expansiones de membrana observadas en el pez cebra están en consonancia con la función de absorción que se le ha asignado a las células del PC (Martínez, 1974). Así también ha sido descrito en el saco dorsal del teleosteo *Leuciscus rutilus*, donde se establece que este tejido consta de una sola capa de células ependimarias cúbicas con cilios y microvellosidades de forma muy irregular en su porción apical (Obermüller-Wilén, 1971).

Los numerosos cilios por célula observados en el epitelio coroideo (Figuras 9B), presentan en su interior un esqueleto microtubular o axonema formado por 9 dobletes de microtúbulos periféricos alrededor de dos microtúbulos centrales separados $[(9 \times 2) + 2]$. En los planos de sección transversal del axonema se pudieron apreciar los radios que van desde los microtúbulos periféricos hasta la vaina central que recubre al par de microtúbulos centrales e incluso se logró apreciar entre los dobletes de microtúbulos periféricos los brazos de dineína partiendo de los microtúbulos (Figuras 9E). Esta estructura axonémica corresponde con la encontrada en cilios móviles, que mediante movimientos oscilantes activos son capaces de movilizar líquidos, en este caso el LCR.

En el extremo basal de los cilios, ya en el citoplasma celular, fue posible observar la presencia de cuerpos basales de $0,2\mu\text{m}$ de diámetro aproximadamente (Figuras 6F; 7; 9D, F; 11C), con su morfología característica de 9 tripletes de microtúbulos (Figura 9F) cerca de la superficie apical de la célula y asociados a una estructura electrodensa que es continua con el esqueleto microtubular del cilio denominada placa basal (Figura 9D). En algunos casos se han podido apreciar expansiones basales electrodensas que sugiere la existencia de raíces ciliares (Figura 9C). Resulta importante el correcto reconocimiento de la estructura ciliar, debido a que minuciosos estudios sobre cilios del PC muestran que al sufrir éstos una acumulación proteica se desencadena una disfunción ciliar progresiva, que repercute en su adecuado funcionamiento como sensores de presión o quimiosensores que contribuyen a regular la producción del LCR (Swiderski et al., 2012).

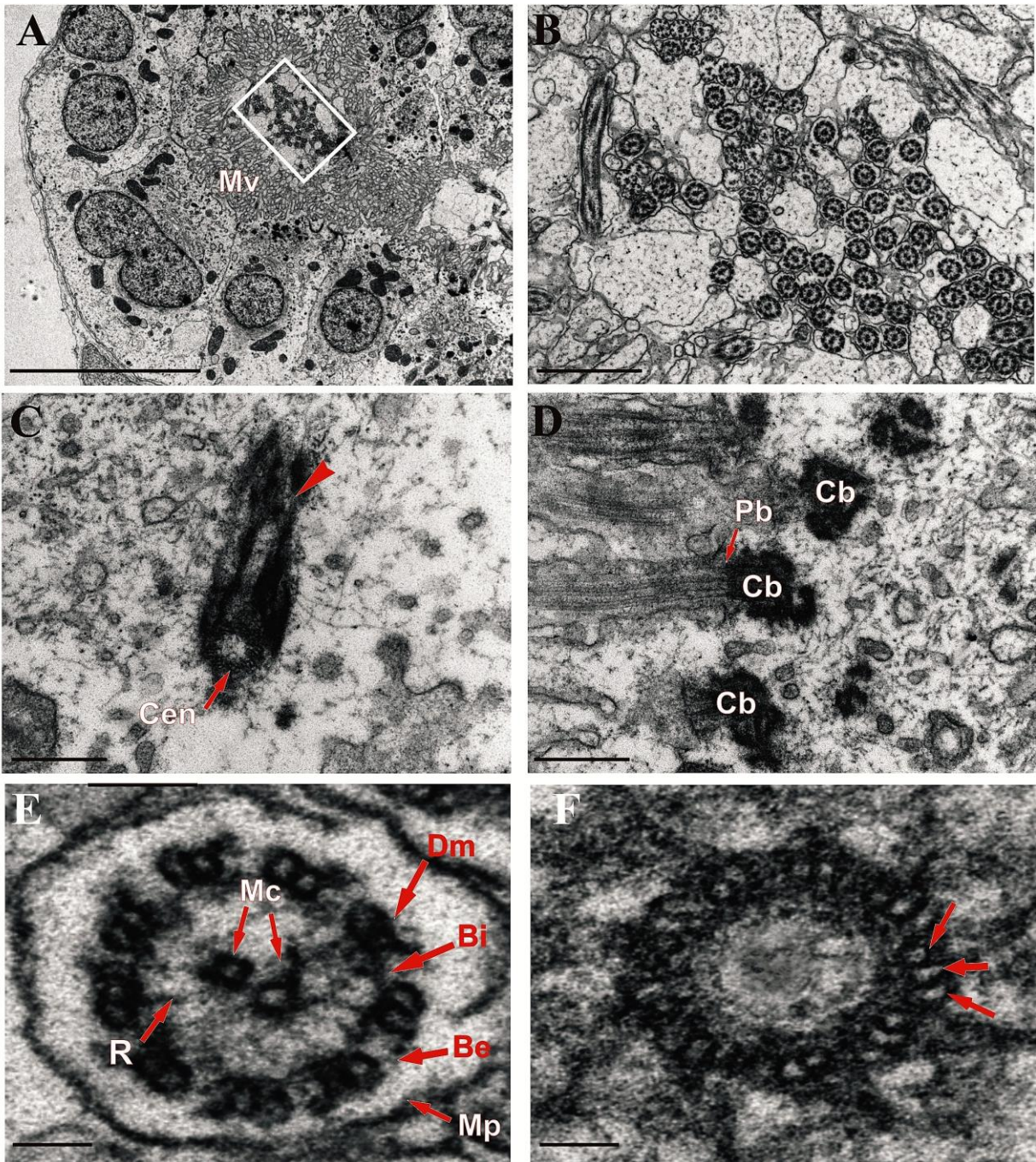


Figura 9-Especializaciones de la superficie apical del plexo coroideo en el pez cebra adulto. **(A)** Vista transversal del epitelio coroideo donde se observan en su porción apical multitud de microvellosidades (Mv) de forma irregular e imbricadas entre sí, hacia la luz del ventrículo. **(B)** Detalle del recuadro de la sección (A), mostrando paquetes de cilios en la superficie ventricular. **(C)** Imagen de un centriolo (Cen) mostrando expansiones basales electrodensas que corresponden a raíces ciliares (punta de flecha). **(D)** Sección longitudinal de los axonemas ciliares y sus cuerpos basales (Cb) correspondientes, señalizando placa basal (Pb). **(E)** Detalle de la sección transversal de un cilio mostrando su axonema con estructura $(9 \times 2) + 2$. Bi, Be brazos interno y externo de dineína; Dm, doblete de microtúbulos periféricos; Mc, microtúbulos centrales; Mp, membrana plasmática; R, radio. **(F)** Sección transversal de un cuerpo basal indicando la asociación de un triplete de microtúbulos (flechas) que forma su esqueleto microtubular. Barras de calibración: $5\mu\text{m}$ (A); $1\mu\text{m}$ (B); 500nm (C, D); 200nm (E, F).

La región basal de las células del epitelio coroideo apoyadas sobre la lámina basal no presentó modificaciones especiales, observándose en el adulto algunos repliegues de membrana en los extremos basolaterales de las células que formaban interdigitaciones con las células contiguas (Figura 10A). Estos repliegues e interdigitaciones intercelulares, descritas también en el saco dorsal y en el PC rombencefálico de otros teleósteos (Jansen, 1976; Obermüller-Wilén, 1973), parecen ser más abundantes en mamíferos (Peters et al., 1991). Por su parte, pudimos observar que la lámina basal acompaña a las invaginaciones de la membrana basal. A diferencia de lo reportado en el PC de otras especies, no observamos haces de fibras de colágeno asociados a la lámina basal (Dohrmann, 1970).

En los dominios de membrana apical y basolateral se observaron una gran cantidad de vesículas endocíticas de aproximadamente 25nm de diámetro, en su mayor parte revestidas de clatrina y características de la endocitosis mediada por receptor. Se distingue con claridad la acumulación electrondensa de clatrina en la cara citosólica de la membrana plasmática, tanto al nivel de la membrana plasmática durante la formación del hoyo revestido, como en la vesícula ya formada en el citosol (Figuras 6C; 8D; 10B-F). De forma semejante, este tipo de vesículas han sido también identificadas en el saco dorsal de *Leuciscus rutilus*, indicando que esta característica reflejaría microvellosidades muy activas (Obermüller-Wilén, 1971).

Las células epiteliales coroideas presentaron un núcleo esférico u ovalado con un diámetro aproximado de 5µm, ubicado tanto a nivel central como basal (Figura 6F). En algunos de ellos se observó una muesca o indentación lateral en el adulto (Figura 7). La presencia de núcleos esféricos e indentados, así como las variaciones de las localizaciones nucleares observadas en el pez cebra ha sido también documentada en ratones jóvenes y en embriones de conejo (Dohrmann, 1970). Se observó la cromatina nuclear de manera dispersa y una estrecha banda de heterocromatina periférica localizada bajo la membrana nuclear interna interrumpida por los poros nucleares (Figuras 11A-B). Los núcleos celulares presentaban generalmente un único nucléolo (Figura 7; 11A). Rodeando al núcleo aparecen haces densos de lo que parecen filamentos intermedios (Figuras 8D; 11A) y cuya identidad no puede determinarse a nivel ultraestructural. Se observaron apilamientos o dictiosomas en su mayoría de tres cisternas pertenecientes al complejo de Golgi (Figura 11C) distribuidos próximos al retículo endoplasmático (RE), tanto en la región apical como lateral e incluso basal de la célula del epitelio coroideo. El RE, en su mayor parte de tipo rugoso, estaba constituido por numerosas cisternas y túbulos con su espacio luminal frecuentemente ensanchado y

homogéneamente distribuidas en el citoplasma, estando recubierto en su superficie citosólica por los característicos ribosomas que definen este sistema de endomembranas (Figura 11B).

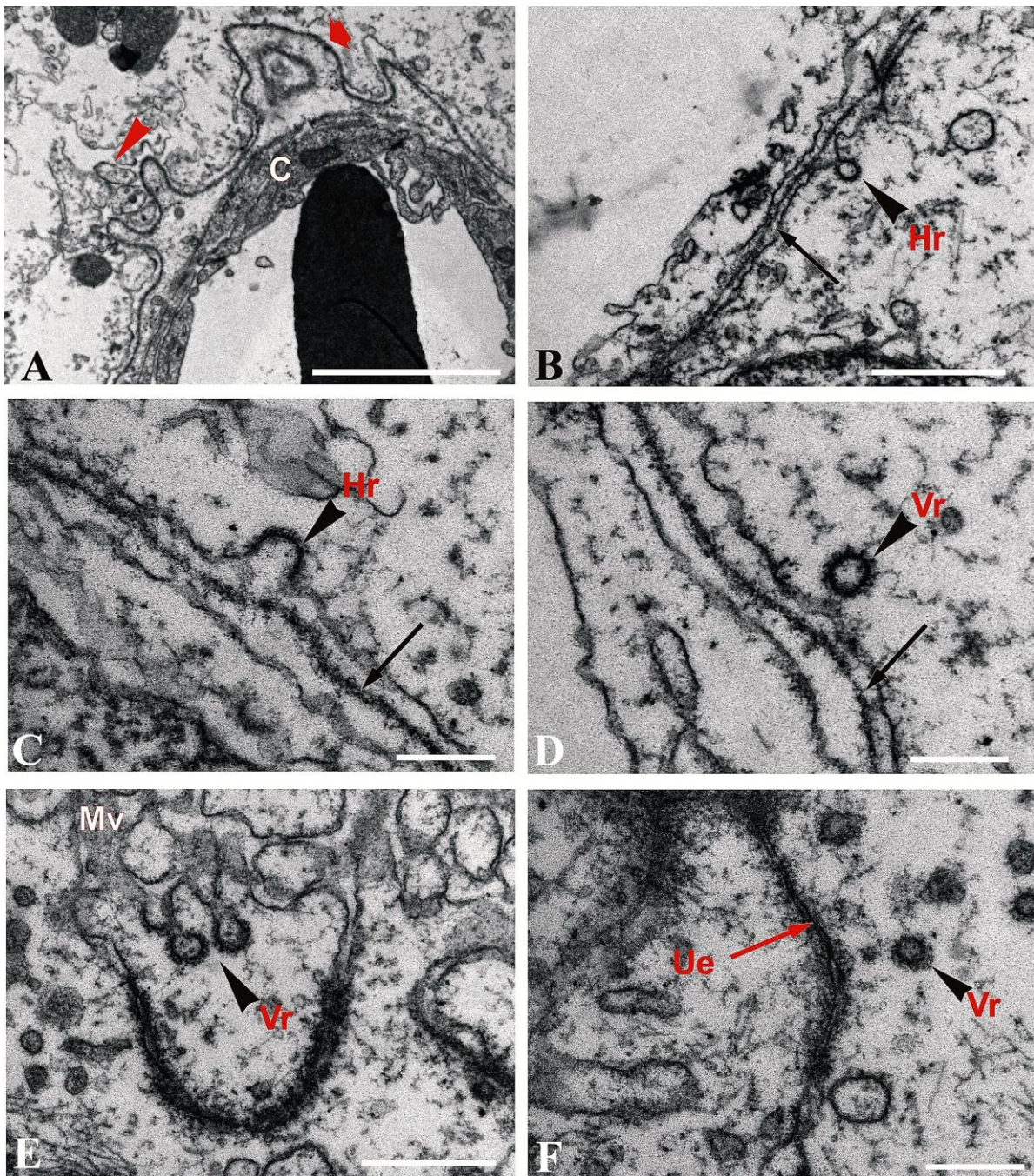


Figura 10- Detalle de la ultraestructura de algunas especializaciones del epitelio coroideo. (A) Superficie basal sobre las que se asientan las células del epitelio coroideo, mostrando repliegues de la lámina basal (flecha roja) y algunas interdigitaciones de la membrana basolateral de las células del plexo coroideo (punta de flecha roja). (B-F) Detalle de las vesículas de endocitosis en los dominios apicales (E, F), y basolaterales (B-D) identificándose la acumulación electrondensa de clatrina en la cara citosólica de la membrana tanto en la formación del hoyo revestido (Hr) (B,C), como en la vesícula revestida (Vr) ya formada en el citosol (D-F). C, capilar; Mv, microvellosidades, Ue, unión estrecha, flecha larga roja; Lamina basal, flecha larga negra . Barras de calibración: 2 μ m (A); 500nm (B, E); 200nm (C,D,F).

En las células del epitelio corioideo del pez cebra adulto se encontraron numerosas mitocondrias distribuidas homogéneamente en el citoplasma, observándose perfiles de forma esférica, alargada e incluso presentando bifurcaciones (Figuras 6F; 7; 8D; 11A), característica que comparte con lo observado en el PC posterior del teleósteo *Leuciscus rutilus* (Obermüller-Wilén, 1973). En el interior de las mitocondrias se observó una elevada densidad de crestas mitocondriales de morfología tanto laminar como tubular (Figura 11D).

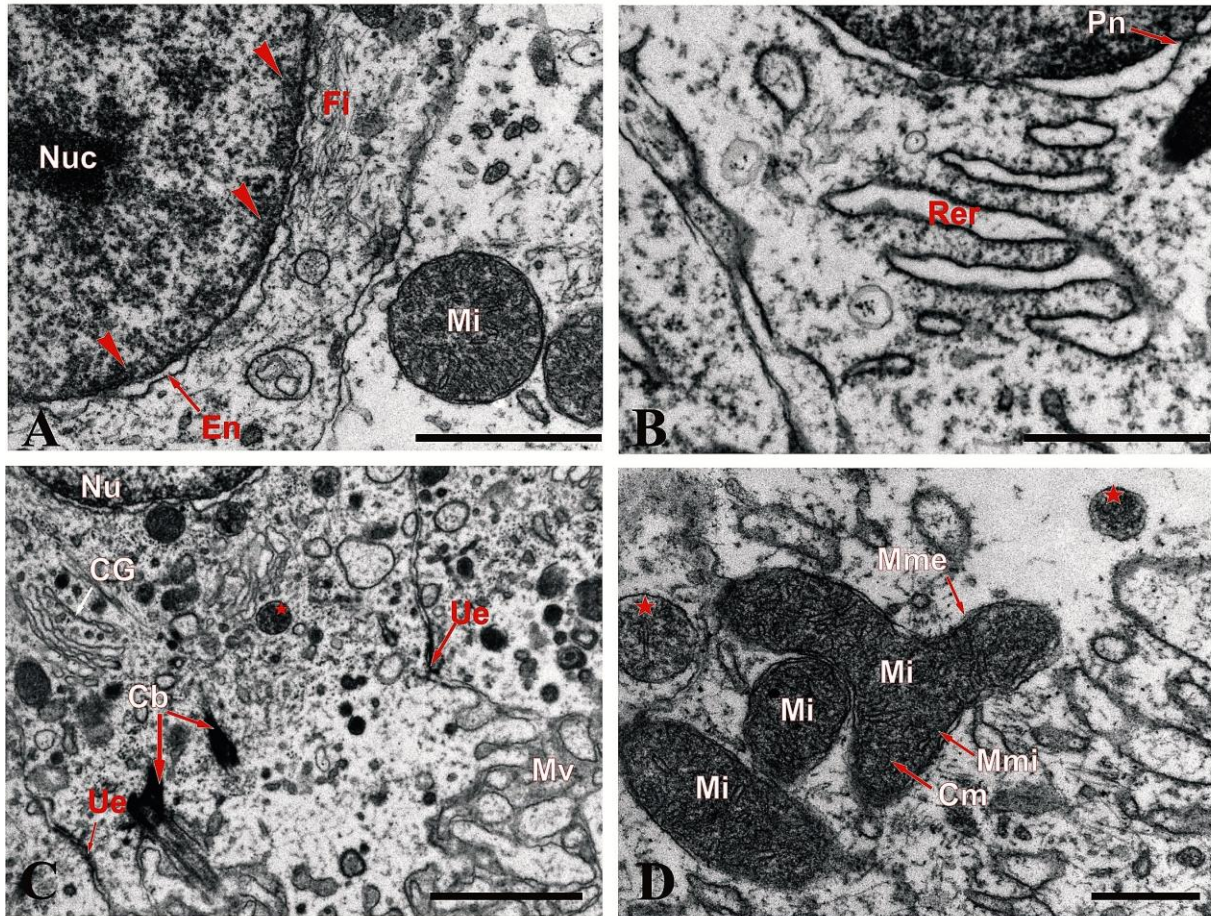


Figura 11- Ultraestructura de algunos componentes citosólicos del epitelio corioideo anterior del pez cebra. (A) Detalle de la morfología general del núcleo (Nu) mostrando nucleolo (Nuc), envoltura nuclear (En) y heterocromatina periférica (punta de fleja roja). Se observa el núcleo asociado a paquetes de filamentos (Fi). (B) Detalle de retículo endoplasmático rugoso (Rer) con cisternas intercomunicadas apiladas y asociadas a ribosomas. (C) Dictiosoma en la región apical de la célula mostrando complejo de Golgi (CG). (D) Detalle de mitocondrias (Mi) observadas en el epitelio corioideo. Pn, poro nuclear; Cb, cuerpos basales; Cm, cresta mitocondrial; Mme, membrana mitocondrial externa; Mmi, membrana mitocondrial interna; Ue, unión estrecha; Estrella; cuerpo multivesicular. Barras de calibración: 1 μ m (A, B); 500nm (C), 200nm (F).

Región vascular y tejido conectivo circundante

Los vasos sanguíneos observados en el PC anterior en el adulto de pez cebra son de tipo capilar próximos o yuxtapuestos a la lámina basal del epitelio coroideo (Figura 6A; 7; 12A; 12F). De paredes muy finas, formados esencialmente por las células endoteliales, no se apreció la existencia de capa muscular asociada. Las células endoteliales se caracterizaron por estar rodeadas de una fina lamina basal, presencia de núcleos aplanados moderadamente heterocromáticos (Figura 12A) y un citoplasma con numerosas vesículas electrónlúcidas originadas de los frecuentes procesos de endocitosis/exocitosis observados (Figura 12B). Los contactos entre los extremos de las membranas plasmáticas de las células endoteliales que forman el cilindro vascular siempre presentaron uniones estrechas u oclusivas (Figura 12A-B). La existencia de estas uniones oclusivas, así como la abundante presencia de estructuras de endocitosis/exocitosis y de vesículas, sugiere que el transporte capilar se realiza esencialmente por transcitosis.

De las muestras analizadas, sólo en una pequeña proporción de los capilares se identificaron fenestras o poros, atravesadas por una fina línea electrodensa que podría constituir el denominado diafragma del poro (Figuras 12A,C). El que se hayan identificado los poros únicamente en una pequeña proporción de los capilares podría atribuirse a que las imágenes observadas corresponden a secciones transversales. En cualquier caso, este tipo de capilares fenestrados presentan características similares a los capilares peritubulares renales (Welsch, 2008), que permiten el tráfico menos selectivo por difusión de moléculas entre la luz capilar y el fluido intersticial circundante, o el epitelio coroideo en este caso. Esta particular estructura capilar podría interpretarse como una discontinuidad en la barrera hematoencefálica, pero en realidad el control del tráfico desde los capilares hacia el encéfalo y el LCR estaría siendo regulado esencialmente por las células del epitelio coroideo (lámina basal y células epiteliales), que serían las responsables de la selección final de las sustancias que llegan al LCR. Por tanto, en esta región particular, la barrera hematoencefálica estaría sustituida por una barrera hemato-LCR permitiéndole con ello segregarse los contenidos de la vasculatura del parénquima cerebral y el LCR, aspecto que debe tenerse en cuenta en la incorporación de sustancias tanto endógenas como exógenas (medicamentos, sustancias neuroactivas, teratógenos, disruptores endocrino) al encéfalo (Loch-Neckel y Koepp, 2010).

A pesar de la ausencia de capas musculares, tuvimos la oportunidad de observar alguna célula contráctil o pericito localizada externamente a las células endoteliales del capilar y rodeadas

por una lámina basal compartida en parte con la membrana basal de las células endoteliales (Figura 12D-E).

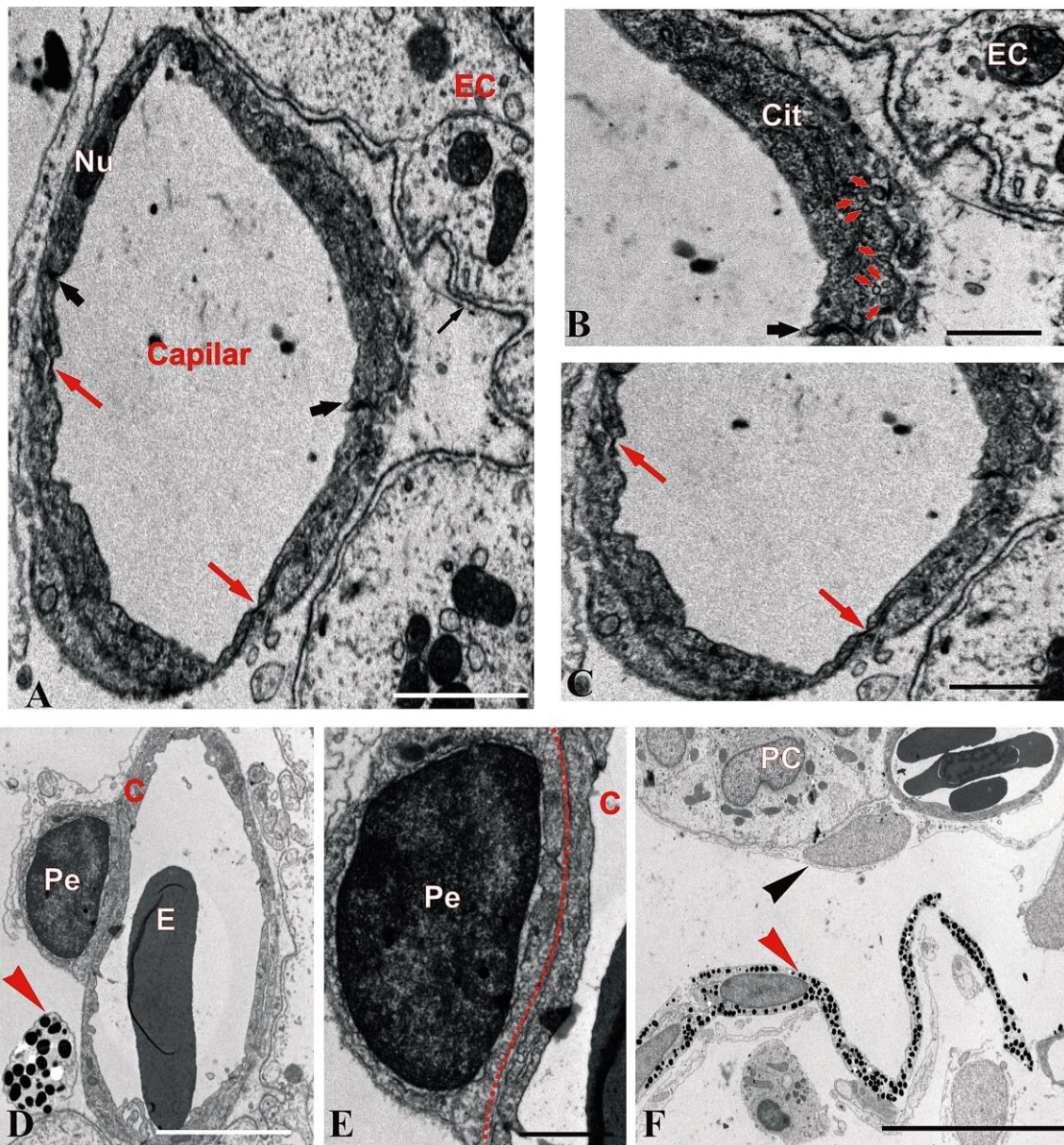


Figura 12- Ultraestructura de la zona vascular y tejido conectivo circundante del plexo coroideo en el pez cebra adulto. **(A)** Capilar (C) de endotelio fenestrado en la cual las fenestraciones aparecen como poros (flecha larga roja) en áreas atenuadas del citoplasma. Se aprecian uniones estrechas (flecha corta negra), núcleos (Nu) aplanados y fina lamina basal (flecha larga negra). **(B)** Detalle de la sección A en la cual se observa a mayor aumento citoplasma endotelial (Cit) indicando múltiples vesículas electrónlúcidas (flecha corta roja), así como unión estrecha (flecha corta negra) próximo a superficie basal del epitelio coroideo (EC). **(C)** Detalle de la sección A observando sitio atravesado por una fina línea electrondensa que podría constituir un diafragma del área fenestrada. **(D-E)** Pericito (Pe) localizado externamente a la célula endotelial, rodeado por una lámina basal propia y compartida en parte con la membrana basal de la célula endotelial señalizada con línea punteada en la figura (E). **(F)** Zona externa del plexo coroideo (PC), mostrando un fibroblasto (punta de flecha negra) yuxtapuesto a la lámina basal y un melanóforo (punta de flecha roja) en posición más externa. Barras de calibración: 1µm (A); 500nm (B, C,E); 2µm,(D); 10 µm (F).

Aparte de los capilares observados, se encontraron ocasionalmente algunos fibroblastos, tanto aislados como yuxtapuestos a la lámina basal, pero siempre del lado opuesto al epitelio corioideo. Así también, en la zona más externa del PC se observaron algunos melanóforos con sus prolongaciones (Figura 12D, F). La ausencia en este estudio de fibras de colágeno, células dendríticas, macrófagos en el tejido conectivo asociado al PC y sí descritas en otras especies (Peters et al., 1991; Neman y Chen, 2016), podría ser debido a limitaciones en la técnica. Sería preciso un estudio más extenso de esta estructura o en otros ejemplares para confirmar este aspecto.

Estructura de la tela y plexo corioideo en larva de 5 dpf de pez cebra (*Danio rerio*)

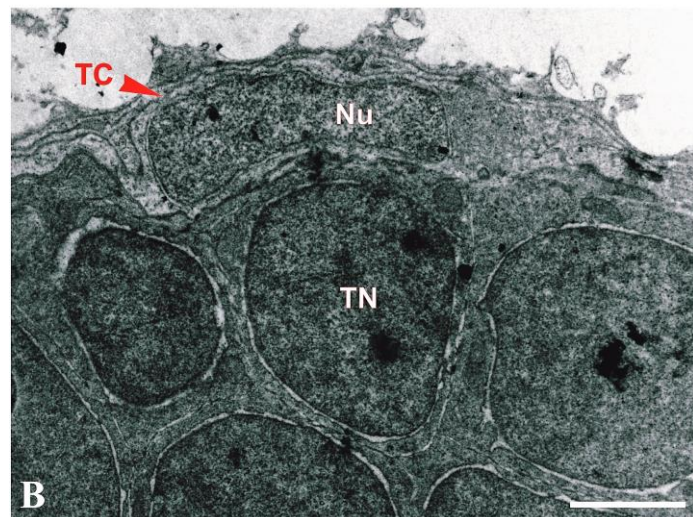
Los resultados obtenidos en el estudio de MET en las larvas del pez cebra, a pesar de haber sido realizados con el mismo protocolo que en el adulto, no resultaron con la misma calidad, dificultando el análisis ultraestructural. Sin embargo, se lograron identificar las células de la tela corioidea tanto por microscopia óptica como electrónica, caracterizadas por un epitelio monoestratificado, con células planas y núcleos alargados a nivel de los márgenes laterales de los lóbulos telencefálicos (Figura 13A-B). Estos resultados se correlacionan con los hallazgos expuestos en el pez cebra adulto y concuerdan con lo descrito del desarrollo del telencéfalo en esta especie (Folgueira et al., 2012), estando a los 5dpf casi toda la parte dorsal del telencéfalo cubierta por una fina capa de epitelio o tela corioidea (Folgueira et al., 2012). Hacia regiones caudales del telencéfalo fue posible visualizar como las células de la tela corioidea se diferencian a células epiteliales corioideas del PC, formando como una capa celular de forma cóncava localizada ventral al órgano pineal (Figura 14A). Esta localización, caudal en el telencéfalo y ventral al órgano pineal, se correspondería con la ubicación del saco dorsal de trucha arcoíris *Salmo gairdneri* (Jansen, 1976) y *Leuciscus rutiluses* (Obermüller-Wilén, 1971).

Al diferenciarse la tela corioidea en epitelio corioideo del PC, se observa una estructura formada por un epitelio simple cúbico, cuyas células presentan un núcleo ovalado o indentado como había sido observado también en el adulto. Estas células están apoyadas sobre una lámina basal que se asocia a un sistema vascular localizado dorsalmente (Figura 14B). Esta descripción se corresponde con lo observado en el análisis *in vivo* del PC rombencefálico en el pez cebra, en el que los vasos sanguíneos ya parecen asociarse al epitelio corioideo a los 2 dpf (García-Lecea et al., 2008). Los resultados obtenidos confirman que las células corioideas del PC se diferencian en fases tempranas del desarrollo (Henson et al., 2014), ya que se puede

apreciar su estructura en la larva de 5 dpf, etapa en la que la larva de pez cebra ya ha eclosionado, desarrolla vida libre y comienza a alimentarse de modo independiente.



Figura 13-Identificación de tela coroidea y plexo coroideo en región telencefálica en larva de 5dpf. **(A)** Sección semifina teñido con azul de toluidina que muestra ubicación de plexo coroideo señalado en línea punteada sobre el estrecho espacio ventricular entre ambos lóbulos telencefálicos (LT). **(B)** Sección de MET mostrando la característica célula plana, con núcleo (Nu) alargado correspondiente a la tela coroidea (TC). TN, tejido nervioso; asteriscos, tegumento. Barras de calibración: 20 μ m (A); 2 μ m. (B)



Una de las principales diferencias encontradas en la larva de 5dpf en comparación con el individuo adulto es una membrana basal con un notable plegamiento (Figura 15B), en contraste con lo observado con otros vertebrados (Dohrmann, 1970). Otras diferencias observadas entre el epitelio coroideo del pez cebra adulto y el de la larva son: una menor presencia de microvellosidades y la escasa presencia de cilios (Figura 15A). Se mantiene sin embargo la clara presencia de uniones estrechas y adherentes en su membrana apico-lateral (Figura 15D), aspecto que está en la línea de lo propuesto por algunos autores y en el que el PC constituye inicialmente en el desarrollo una barrera funcional y posteriormente empieza a desempeñar funciones secretoras (Dziegielewska et al., 2001).

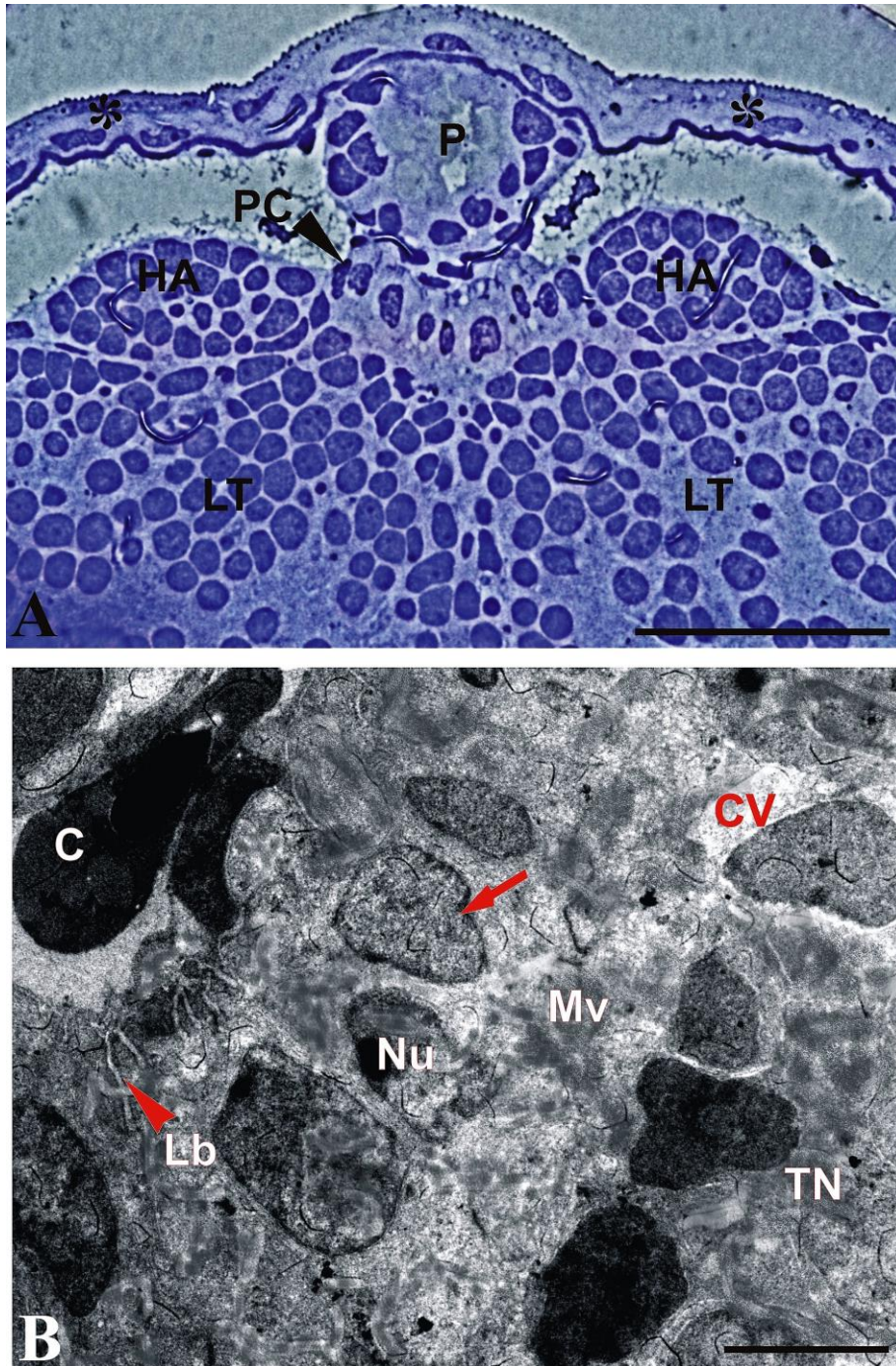


Figura 14- Identificación del plexo coroideo en la región posterior del telencéfalo de larva de 5 dpf. **(A).** Sección transversal teñida con azul de toluidina, indicando células del plexo coroideo (PC) próximas al órgano pineal (P). **(B)** Imagen de la ultraestructura del PC, observando epitelio coroideo (EC) monoestratificado de tipo cúbico, con presencia de núcleos ovalados y en alguno de ellos con indentación lateral (flecha roja). En la superficie apical se encuentran las microvellosidades (Mv) que se extienden hacia la cavidad ventricular prácticamente obliterada y en la porción basal se aprecian las células del EC apoyadas sobre una lámina basal (Lb) electronlúcida y asociadas a un sistema vascular localizado dorsalmente. C, capilar sanguíneo; LT, Lóbulo telencefálico; HA, Habénula; P, órgano pineal; asterisco, tegumento. Barras de calibración: 10µm (A) 5µm (B).

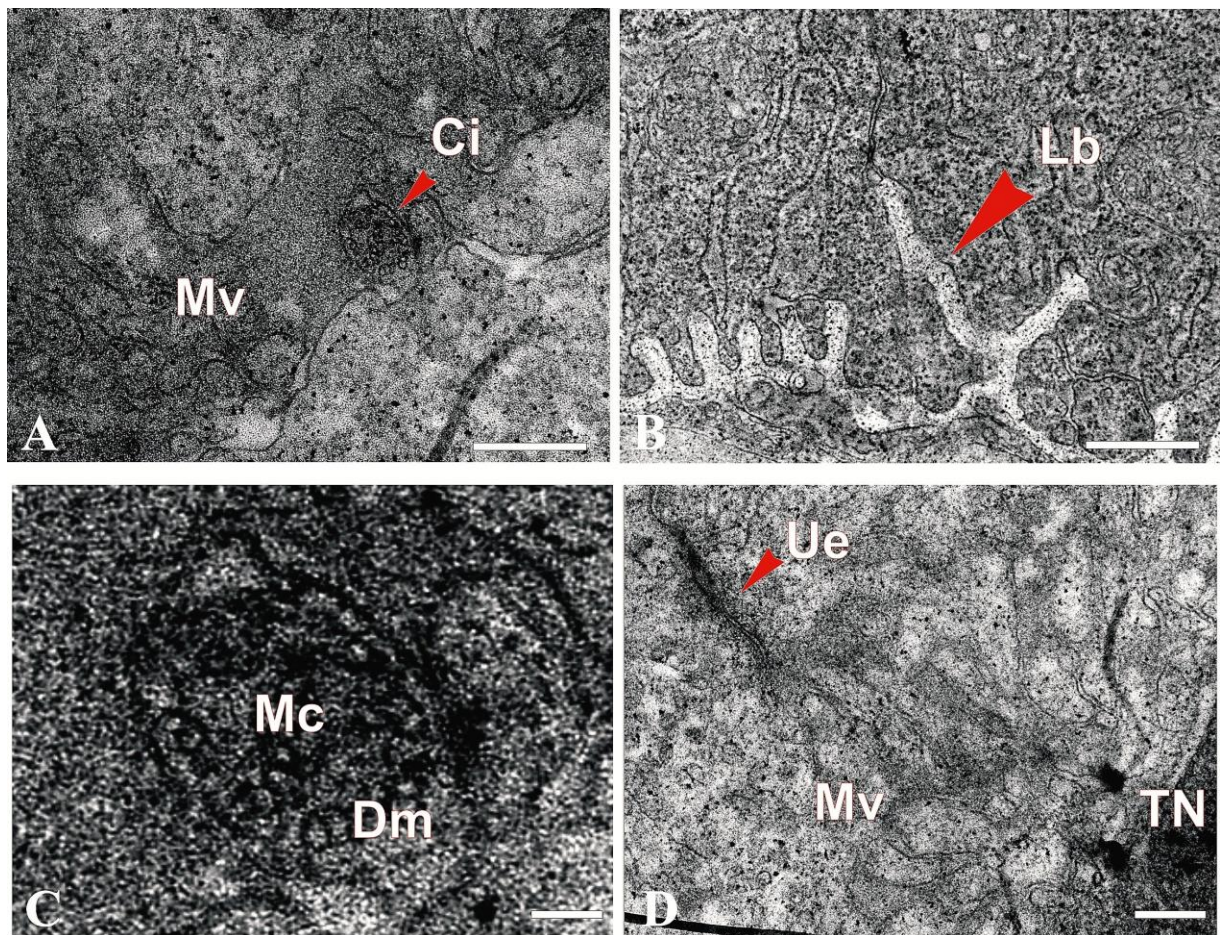


Figura 15- Características de las células del plexo coroideo en la larva de 5df. **(A)** Detalle del espacio ventricular mostrando la presencia de microvellosidades (Mv) y un cilio (Ci) en el dominio apical de la membrana del epitelio coroideo. **(B)** Detalle de la lámina basal con notable plegamiento acompañado por invaginaciones de la membrana celular en su dominio basal. **(C)** Detalle de la sección transversal de un cilio mostrando doblete de microtúbulos periféricos (Dm) y microtúbulos centrales (Mc). **(D)** Complejos de unión entre las membranas laterales en la porción apical de células del epitelio coroideo. TN, tejido nervioso; Ue, unión estrecha. Barras de calibración: 1µm (A,B); 200nm (C); 500nm (D).

Análisis inmunohistoquímico

El objeto de este análisis fue tratar de identificar el tipo de filamento intermedio observado en las imágenes de ultraestructura asociados a las células del epitelio coroideo. Resultados previos en el Laboratorio de Biología Celular indican que no se trataría de filamentos de proteína ácida fibrilar glial (M. Folgueira, comunicación personal), por lo que podría tratarse de filamentos de vimentina. Para tratar de la naturaleza de los filamentos intermedios observados, se hizo uso de un anticuerpo monoclonal contra vimentina de mamífero (cerdo) que se había utilizado previamente para evidenciar filamentos de vimentina en el encéfalo de otro teleosteo (Arochena et al., 2004). Sin embargo, el resultado en el pez cebra fue negativo (Figura 16), no observándose inmunoreactividad positiva frente a la vimentina. En cualquier

caso, este resultado no excluye de un modo definitivo la presencia de vimentina en las células del epitelio coroideo, ya que la ausencia de inmunoreactividad puede deberse a diversos factores derivados de la metodología utilizada. Por un lado, el anticuerpo primario monoclonal empleado podría no tener reacción cruzada con la vimentina del pez cebra. A pesar de que la vimentina es una proteína con una notable homología de secuencia entre especies (homología del 71% entre la vimentina de *Danio rerio* y la vimentina de *Sus scrofa domesticus*), especialmente de su dominio central, pequeños cambios de conformación del epitopo podrían afectar al reconocimiento del anticuerpo por el antígeno. Otra posibilidad es que el protocolo empleado no fuera el adecuado o que el anticuerpo usado no funcionara por estar dañado. Sería deseable repetir el protocolo modificando la metodología y/o el anticuerpo, y realizando controles positivos sobre un tejido del que se tenga constancia de la presencia de este filamento intermedio.

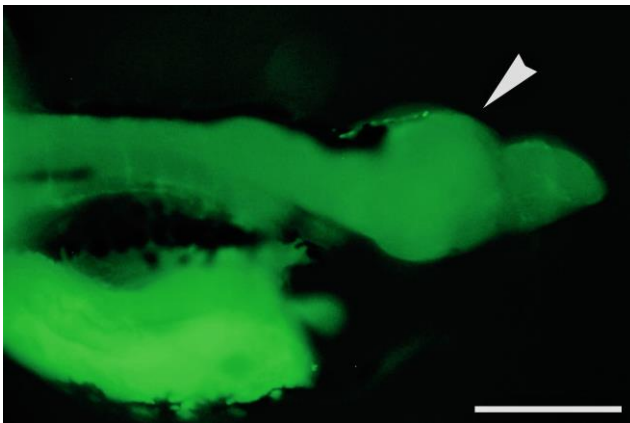


Figura 16- Micrografía obtenida con microscopio de fluorescencia de una vista lateral del cerebro de una larva de 5 dpf de pez cebra. Se observa la ausencia de inmunofluorescencia contra vimentina en el plexo coroideo anterior (punta de flecha). Barra de calibración: 20µm.

CONCLUSIONES

- 1- El análisis estructural y ultraestructural efectuado en el pez cebra (*Danio rerio*) ha permitido caracterizar las células del PC anterior, formado por un epitelio monoestratificado asociado a una red vascular. Sus características se encuentran conservadas en otras especies de teleósteos y amniotas. Existe un elevado grado de homología con el PC de mamíferos, que hace del pez cebra un posible modelo para el estudio de las patologías relacionadas con este órgano.

- 2- A diferencia de lo descrito recientemente por algunos autores que designan el PC anterior como estructura diencefálica, nuestros resultados confirman la naturaleza telencefálica y derivada (especializada) de la tela coroidea telencefálica.
- 3- Las diferencias estructurales observadas entre el PC adulto y el de las larvas de 5 dpf sugieren que en los estadios tempranos del desarrollo el PC es una estructura que actuaría como barrera funcional, desarrollando de modo más claro sus funciones secretoras o de reciclaje del LCR posteriormente.
- 4- La presencia de capilares fenestrados asociados al plexo coroideo en el pez cebra sugieren que en esta región las funciones propias de la barrera hematoencefálica son llevadas a cabo por las células del epitelio coroideo.

Conclusions

- 1- The structural and ultrastructural analysis carried out in zebrafish (*Danio rerio*) has allowed characterizing the cells of the anterior choroid plexus, formed by a monostratified epithelium associated with a vascular network. Its characteristics are conserved in other species of teleosts and amniotes. There is a high degree of homology with the choroid plexus of mammals, which makes of zebrafish a possible model for studying pathologies related to this organ.
- 2- Unlike recently described by some authors who designated the anterior choroid plexus as a diencephalic structure, our results confirm its telencephalic nature, being derived (specialized) from the telencephalic tela choroidea.
- 3- The structural differences observed between the choroid plexus of the adult and that of the 5 dpf larva suggest that during the early stages of development, the choroid plexus acts as a functional barrier, developing later its secretory or recycling functions of the CSF.
- 4- The presence of fenestrated capillaries associated with the choroid plexus in zebrafish suggest that in this region the functions of the blood-brain barrier are carried out by the cells of the choroidal epithelium.

BIBLIOGRAFÍA

- Amano Y, Díaz L. Introducción a la microscopia electrónica principios – aplicaciones. 3ª Ed. Ecuador: Instituto Nacional De Investigación En Salud Pública INSPI; 2015.
- Arochena M, Anadón R, Díaz-Regueira S. 2004. Development of vimentin and glial fibrillary acidic protein immunoreactivities in the brain of gray mullet (*Chelon labrosus*), an advanced teleost. *J Comp Neurol* 469:413-436.
- Beitz E. Aquaporin. 1ª Ed. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2009.
- Bloch O, Auguste K, Manley G, Verkman A. Accelerated progression of haolon - induced hydrocephalus in aquaporin-4- deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006; 26 (12): 1527-1537.
- Brent R, Balciunas D, McCarra1 J, Young E, Xiong T, Spahn A, et al. Development and Notch signaling requirements of the zebrafish choroid plexus. *Plos One.* 2008; 3: 1-10
- Balusu S, Brkic M, Libert C, Vandenbroucke R. The choroid plexus-cerebrospinal fluid interface in Alzheimer’s disease: more than just a barrier. *Neural Regeneration Research.* 2016; 11: 534-537.
- Chakraborty C, Sharma A, Sharma G, Lee S. Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity. *J Nanobiotechnol.* 2016; 14: 1-13.
- Carter K, Woodley C, Brown R. A review of tricaine methanesulfonate for anesthesia of fish. *Rev Fish Biol Fisheries.* 2011; 21: 51–59.
- Chivian E, Bernstein A. Preservar la vida. 1ª Ed. México: Cfe; 2015.
- Cserr H. Physiology of the choroid plexus. *Physiological Reviews.* 1971; 61: 273-307.
- Detrich W, Westerfield M, Zon L. Essential zebrafish methods. 1ª Ed. U.S.A: ELSEVIER; 2009.
- Dohrmann G. The choroid plexus: A historical review. *Brain Research.* 1970; 8: 197-218.
- Del Biggio M. The ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia.* 1995; 14 (1): 1-13.
- D’Angelo B, Joakim, Sandberg M, Mallard C. Expression of the Nrf2-system at the blood -CSF barrier is modulated by neonatal inflammation and hypoxia -ischemia. *J Inherit Metab Dis.* 2013; 36 (3): 479–490.

- Duvernoy H, Risold P. The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization *Brain Res Rev.* 2007; 56 (1): 119-47.
- Dziegielewska K, Habgood M, Saunders N. Development of the choroid plexus. *Microsc Res Tech.* 2001; 52 (1): 5-20
- Fame R, Chang J, Hong A, Santiago N, Sive H. Directional cerebrospinal fluid movement between brain ventricles in larval zebrafish. *BioMed Central.* 2016; 13 (11): 2-12.
- Folgueira M, Bayley P, Navratilova P, Becker T, Wilson S, Clarke J. Morphogenesis underlying the development of the everted teleost telencephalon. *Neural Development.* 2012; 7 (32):1-13.
- García-Lecea M, Kondrychyn I, Fong S, Rui Ye F, Kozrh V. *In vivo* analysis of choroid plexus morphogenesis in zebrafish. *Plos One.* 2008; 3: 1-12.
- González I, Castañeyra L, Castañeyra M, González J, Carmona E. Transporte del β -amilode a través de las barreras cerebrales y su posible implicación en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. *Majorensis* 2014; 10: 7-15.
- Henson H, Parupalli C, Bensheng J, Taylor M. Functional and genetic analysis of choroid plexus development in zebrafish. *Frontier in Neuroscience.* 2014; 8: 1-19.
- Insausti I, Cabada T, Caballero C, Zazpe I, Bacaicoa M, Olier J. Xantogranuloma sintomático del ventrículo lateral. A propósito de un caso. *Neurocirugía.* 2009; 20: 278-281.
- Jansen W, Weger R, Woutersen H. The Saccus Dorsalis of the Rainbow Trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Cell Tiss. Res.* 1976; 167: 467-491.
- Johansson P. The choroid plexuses and their impact on developmental neurogenesis. *Frontier in neuroscience.* 2014; 8: 1-9.
- Kimmel C, Ballard W, Kimmel S, Ullmann B, Schilling T. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics.* 1995; 203: 253-310.
- Karimy J, Duran D, Hu J, Gavankar C, Gailard J, Bayri Y, et al. Cerebrospinal fluid hypesecretion in pediatric hydrocephalus. *Neurosurg Focus.* 2016; 41 (5):1-11.
- Kaur C, Rathnasamy G, Ang Ling E. The Choroid Plexus in Healthy and Diseased Brain. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2016; 75 (3): 198-213.
- Korzh V. Development of brain ventricular system. *Cell. Mol. Life Sci.* 2018; 75:375–383.

- Kalueff A, Stewart A, Gerla R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol Sci.* 2014; 35 (2): 63–75.
- Langenbacher A, Dong Y, Shu X, Choi J, Nicoll D, Goldhaber J, et al. Mutation in sodium–calcium exchanger 1 (NCX1) causes cardiac fibrillation in zebrafish. *PNAS.* 2005; 102: 699-704.
- Loch-Neckel G, Koepp J. La barrera hematoencefálica y la administración de medicamentos en el sistema nervioso central. *Rev Neurol.* 2010; 51 (3): 165-174.
- Lowery L, Sive H. Initial formation of zebrafish brain ventricles occurs independently of circulation and requires the *nagie oko* and *snakehead/atp1a1a.1* gene products. *Development.* 2005; 132 (9): 2057-2067.
- Martínez M. Estudio de la función absorbente de los plexos coroideos meningoencefálicos. *Anales de Medicina y Cirugía.* 1974; 55 (20): 103-109.
- Matthews M, Varga Z. Anesthesia and euthanasia in zebrafish. *ILAR Journal.* 2012; 53 (2): 192-204.
- Milan DJ, Jones I L, Ellinor P, MacRae C. In vivo recording of adult zebrafish electrocardiogram and assessment of drug-induced QT prolongation. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* 2006; 291: 269-273.
- Neuwelt E, Bauer B, Franhlke C, Fricker G, Ladecola C, Janigro D, et al. Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology. *Nat Rev Neurosci.* 2011; 12 (3): 169–182.
- Nazar N, Nazar D. Hidrocefalia: patogenia y fisiopatología. *Revista Médica Hondur.* 1985; 53: 203-212.
- Neman J, Chen T. The choroid plexus and cerebrospinal fluid: Emerging roles in CNS development maintenance, and disease progression. 1a Ed. USA: ELSEVIER; 2016.
- Obermüller-Wilén H, Fine Structure and Histochemistry of the Choroid Plexus of the Teleost *Leuciscus rutilus*. *Acta Zool.* 1973; 54: 1-8.
- Obermüller-Wilén H, Feinstruktur des Saccus dorsalis bei den Plötzen, *Leuciscus rutilus*. *Acta Zool.* 1971; 52: 103-115.
- Orellana P. Errores neurorradiológicos frecuentes en TC y RM. *Revista Chilena de Radiología.* 2003; 9 (2): 93-103.
- Oshio K, Watanabe, Song Y, Verkman A, Manley G. Reduced cerebrospinal fluid production and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel Aquaporin-1. *The FASEB Journal.* 2005; 19 (1): 76-78.

- Pérez C, Capella M, Martínez O, García G. Tumores de plexo coroideo en la infancia: experiencia en el hospital Sant Joan de Déu Neurocirugía. 2016; 27 (2): 58-66.
- Pérez I, Espinosa A. Dinámica del líquido cefalorraquídeo y barrera hematoencefálica. Arch Neurocienc . 2015; 20 (1): 52-56.
- Peters A, Palay S, Webster H. The fine structure of the nervous system. 3ª Ed. USA Oxford University Press:1991.
- Plattner A, Hentschel J. Biología celular. 4a Ed. España: Panamericana; 2011.
- Praetorius J, Nielsen S. Distribution of sodium transporters and aquaporin-1 in the human choroid plexus. Cell Physiology. 2006; 291: 59–67.
- Redzic z, Segal M. The structure of the choroid plexus and the physiology of the choroid plexus epithelium. Adv Drug Deliv Rev. 2004; 56 (2): 1695-1716.
- Redolar D. Cerebro y adicción. 1ª Ed. España: EDITORIAL UOC; 2008.
- Schatten G. Current topics in developmental biology. Volume 71. USA: Elsevier; 2005.
- Sanberg C, Sanberg P. Cell therapy, stem cells and brain repair. 1a Ed. USA: Humana Press; 2006.
- Swiderski R, Agassandian K, Ross J, Bugge K, Cassell M, Yeaman C. Structural defects in cilia of the choroid plexus, subfornical organ and ventricular ependyma are associated with ventriculomegaly. Fluids and Barriers of the CNS. 2012; 9 (22): 1-13.
- Sinagra A, Pérez, Acuña M. Tercer ventrículo. Endoneuroanatomía de las estructuras adyacentes. Revista argentina de anatomía online. 2010; 1(1): 16-20.
- Taylor MR, Hurley JB, Van Epps, HA, Brockerhoff SE. A zebrafish model for pyruvate dehydrogenase deficiency: rescue of neurological dysfunction and embryonic lethality using a ketogenic diet. Proc. Natl. Acad. Sci. 2004; 101: 4584-4589.
- Turner M, Ullmann J, Kay A. A method for detecting molecular transport within the cerebral ventricles of live zebrafish (*Danio rerio*) larvae. J Physiol. 2012; 590 (10): 2233–2240.
- Villalobos D. Medicina traslacional, ¿moda o necesidad? Medicina Buenos Aires 2014; 74: 170-172.
- Wolburg H, Paulus W. Choroid plexus: Biology and pathology. Acta Neuropathologica. 2010; 119: 75–88.
- Wijnholds J, Lange E, Scheffer G, Jan van den Berg D, Mol, C, Van der Valk M, et al. Multidrug resistance protein 1 protects the choroid plexus epithelium and contributes

to the blood-cerebrospinal fluid barrier. *The Journal of Clinical Investigation*.2000; 105:279-285.

- Wang D, Nykanen M, Yang N, Winlaw D, North K, Verkman AS. Altered cellular localization of aquaporin-1 in experimental hydrocephalus in mice and reduced ventriculomegaly in aquaporin-1 deficiency. *Mol Cell Neurosci*. 2011; 46 (1): 318-324.
- Welsch U. *Histología*. 2ª Ed. España; Panamericana; 2008.
- Zappaterra M, Lehtinen M. The cerebrospinal fluid: regulator of neurogenesis, behavior, and beyond. *Cell Mol Life Sci*. 2012; 69: 1-10.