

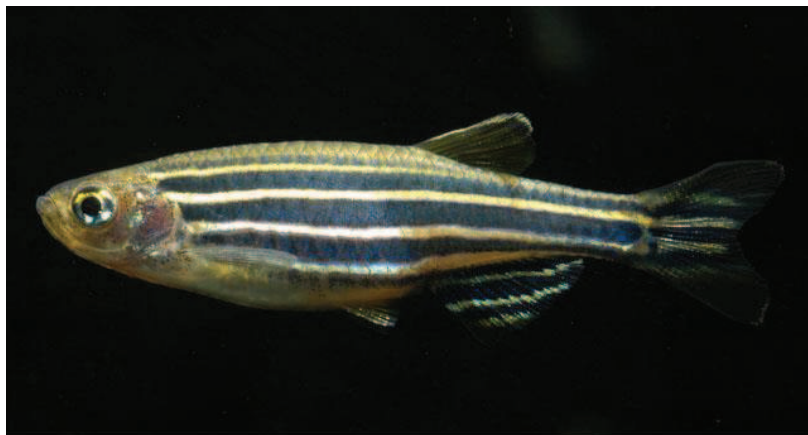
Facultad de Ciencias
Grado en Biología
Departamento de Biología
Área de Biología Celular

Trabajo Fin de Grado

**Estudio de la localización y distribución de la proteína Hu en el
diencéfalo de pez cebrá adulto (*Danio rerio*)**

**Estudo da localización e distribución da proteína Hu no diencéfalo de
peixe cebrá adulto (*Danio rerio*)**

**Study of the location and distribution of the Hu protein in the
diencephalon of adult zebrafish (*Danio rerio*)**



María González Suárez

Directora: M^a Luz Díaz Prado

Codirector: Ibán Lamas Criado

Junio 2019



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias
Grado en Biología
Departamento de Biología
Área de Biología Celular

Estudio de la localización y distribución de la proteína Hu en el diencéfalo de pez cebra adulto (*Danio rerio*)

Estudo da localización e distribución da proteína Hu no diencéfalo de peixe cebra adulto (*Danio rerio*)

Study of the location and distribution of the Hu protein in the diencephalon of adult zebrafish (*Danio rerio*)

Trabajo de Fin de Grado que presenta la alumna de Biología María González Suárez bajo la dirección de Dña M^a Luz Díaz Prado y D. Ibán Lamas Criado.

M^a LUZ
DÍAZ
PRADO
32.789.579C

Firmado digitalmente por M^a
LUZ DÍAZ PRADO 32.789.579C
Nombre de reconocimiento
(DN): cn=M^a LUZ DÍAZ PRADO
32.789.579C, o=Biología
Celular e Molecular,
ou=Universidade de A Coruña,
email=luz.diaz@udc.es, c=ES
Fecha: 2019.06.19 14:06:28
+02'00'

Fdo. M^a Luz Díaz Prado

LAMAS
CRIADO
IBAN -
32688489S

Firmado digitalmente por
LAMAS CRIADO IBAN -
32688489S
Nombre de reconocimiento
(DN): c=ES,
serialNumber=32688489S,
sn=LAMAS CRIADO,
givenName=IBAN, cn=LAMAS
CRIADO IBAN -32688489S
Fecha: 2019.06.19 14:03:27
+02'00'

Fdo. Ibán Lamas Criado

A Coruña, 20 de Junio de 2019.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. El pez cebra (<i>Danio rerio</i>)	2
1.1.1. Distribución y hábitat	2
1.1.2. Dieta	3
1.1.3. Desarrollo y reproducción	3
1.2. Sistema Nervioso Central.....	3
1.3. Técnicas inmunohistoquímicas.....	4
1.4. Proteína Hu.....	6
2. OBJETIVOS.....	7
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	7
3.1. Obtención de los ejemplares	7
3.2. Procesamiento del material biológico.....	7
3.2.1. Fijación por perfusión.....	7
3.2.2. Postfijación por inmersión.....	8
3.2.3. Conservación	8
3.2.4. Inclusión en parafina	8
3.2.5. Inclusión en Tissue-Tek.....	9
3.2.6. Seccionado del tejido.....	9
3.3. Procesamiento inmunohistoquímico	10
3.3.1. Técnica inmunoenzimática: peroxidasa	10
3.3.2. Inmunofluorescencia	12
3.4. Observación de las secciones y procesamiento de imágenes.....	12
4. RESULTADOS.....	13
5. DISCUSIÓN	20
6. CONCLUSIONES.....	23
ANEXO I.....	24
7. BIBLIOGRAFÍA.....	25

RESUMEN

En el presente trabajo se ha estudiado la localización y distribución de la proteína HuC/D en el diencéfalo del pez cebra (*Danio rerio*). Esta proteína de unión al ARN ha permitido la detección de somas neuronales en el encéfalo de este teleosteo gracias al empleo de técnicas inmunohistoquímicas indirectas e inmunofluorescencia, revelando una abundante expresión positiva a la HuC/D en las diferentes regiones y principales núcleos que conforman el diencéfalo.

Palabras clave: encéfalo, diencéfalo, técnicas inmunohistoquímicas, proteínas Hu, teleosteo, *Danio rerio*.

RESUMO

No presente traballo estudouse a localización e distribución da proteína HuC/D no diencéfalo do peixe cebra (*Danio rerio*). Esta proteína de unión ao ARN permitiu a detección de somas neuronais no encéfalo deste teleosteo grazas ao emprego de técnicas inmunohistoquímicas indirectas e inmunofluorescencia, revelando unha abundante expresión positiva á HuC/D nas diferentes rexións e principais núcleos que conforman o diencéfalo.

Palabras clave: encéfalo, diencéfalo, técnicas inmunohistoquímicas, proteínas Hu, teleosteo, *Danio rerio*.

SUMMARY

In the present work, we have studied the location and distribution of the HuC/D protein in the zebrafish diencephalon (*Danio rerio*). This RNA binding protein has allowed the detection of neuronal somas in the brain of this teleost, thanks to the use of indirect immunohistochemical techniques and immunofluorescence, revealing an abundant positive expression of HuC/D in different regions and main nuclei that form the diencephalon.

Key words: encephalon, diencephalon, immunohistochemistry techniques, Hu proteins, teleost, *Danio rerio*.

1. INTRODUCCIÓN

En el presente trabajo se estudiarán las poblaciones neuronales que presentan inmunorreactividad a la proteína Hu en el diencéfalo del pez cebra adulto (*Danio rerio*). Se ha elegido a esta especie debido a su condición de organismo modelo.

1.1. El pez cebra (*Danio rerio*)

El pez cebra o *Danio rerio* es un **pez teleósteo** de pequeño tamaño (<120 mm de longitud total) que pertenece a la familia de los **ciprínidos** (Figura 1). Su cuerpo es fusiforme y con un patrón característico de franjas horizontales. Además presentan dimorfismo sexual y establecen jerarquías de dominancia (Spence, Gerlach, Lawrence, & Smith, 2008).

Según el listado de especies amenazadas de la IUCN se trata de una especie de preocupación menor.

TAXONOMÍA	
Reino	Animalia
Filo	Chordata
Clase	Actinopterygii
Orden	Cypriniformes
Familia	Ciprínidos
Género	<i>Danio</i>
Especie	<i>Danio rerio</i>

Figura 1. Taxonomía del pez zebra (Vishwanath, 2010).

1.1.1. Distribución y hábitat

Se distribuye en el **sur y sureste asiático**, ocupando zonas de agua dulce poco profundas y de flujo lento. Soporta un margen amplio de temperaturas (Spence et al., 2008).

1.1.2. Dieta

Son **omnívoros** y se alimentan principalmente de zooplancton e insectos y estos últimos en su mayoría son especies o formas larvarias acuáticas. Además se cree que desempeñan un papel en el control de mosquitos (Spence et al., 2008).

1.1.3. Desarrollo y reproducción

El pez cebra es una **especie anual que cría durante todo el año** y cuyo desove está ligado a las altas temperaturas y a la disponibilidad de alimentos. Es por eso que, en los individuos en libertad, el desove coincide antes de la temporada del monzón; y sin embargo, los ejemplares que habitan en acuarios se reproducen todo el año (Froese & Binohlan, 2019). La determinación del sexo en esta especie depende de la disponibilidad de alimento y la tasa de crecimiento, siendo hembras aquellos individuos de crecimiento más rápido. Además, existen comportamientos de cortejo y territoriales pero no hay cuidado parental de la puesta (Spence et al., 2008).

1.2. Sistema Nervioso Central

El **Sistema Nervioso Central** está formado por la **médula espinal** y el **encéfalo**. La médula espinal se encuentra en la parte más caudal y es la responsable del movimiento y el encéfalo se encuentra rostral a esta (Amaral & Strick, 2013). El encéfalo de peces teleósteos está dividido, de la parte rostral (anterior) a la caudal (posterior), en 5 partes (Figura 2):

- **Telencéfalo.** Es el responsable del olfato y se encuentra en el cerebro anterior (Holden, Layfield & Matthews, 2012).
- **Diencéfalo.** Está involucrado en la homeostasis y el control endocrino y se localiza entre el telencéfalo y el mesencéfalo (Holden et al., 2012). En él se distinguen 5 divisiones principales dispuestas dorsoventralmente: el epítalamo, tálamo dorsal, tálamo ventral, el tubérculo posterior y el hipotálamo (Nüsslein-Volhard & Dahm, 2002). También pertenecen al diencéfalo el área preóptica (región intermedia entre el telencéfalo y el diencéfalo), el sinencéfalo (comprendido entre el diencéfalo dorsal y el

mesencéfalo) y parte del pretecho (Herget, Wolf, Wullimann, & Ryu, 2014).

- **Mesencéfalo.** Es el responsable de la visión.
- **Metencéfalo** o cerebro posterior. Mantiene el tono muscular y el equilibrio durante la natación y está asociado al cerebelo.
- **Mielencéfalo** o tronco cerebral. Región más caudal del encéfalo que se continúa con la médula espinal. Recibe la entrada de todos los nervios sensoriales, excepto los craneales (Holden et al., 2012).

Tanto el metencéfalo como el mielencéfalo forman lo que llamamos rombencéfalo.

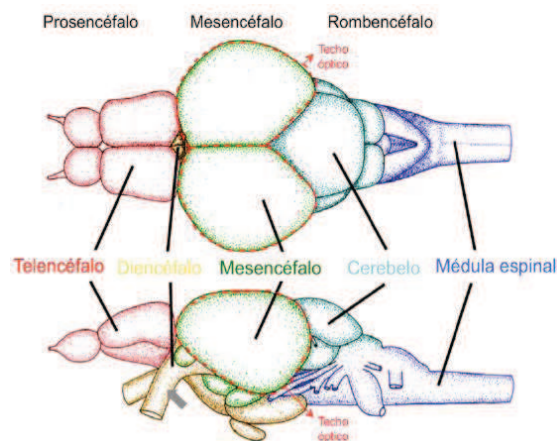


Figura 2. Esquema del encéfalo de pez cebra (*Danio rerio*) (Wullimann, Rupp & Reichert, 1996).

1.3. Técnicas inmunohistoquímicas

Las **técnicas inmunohistoquímicas** son las responsables de la **detección y localización** de un determinado **antígeno mediante el uso de anticuerpos** (glicoproteínas también llamadas inmunoglobulinas) que se unen a él de forma específica. Un antígeno es una sustancia reconocida como extraña por nuestro organismo, desencadenando una respuesta inmune. En el presente estudio se empleará un anticuerpo monoclonal [aquel que reconoce un único epítipo (“región del antígeno reconocida por el anticuerpo”), (Montuenga, Esteban, & Calvo, 2014)].

Generalmente estas técnicas se pueden clasificar en: métodos directos y métodos indirectos (Figura 3). En los primeros, el antisuero primario (“antisuero específico frente al antígeno que se quiere localizar”) está marcado, mientras que en los segundos no lo está y es detectado posteriormente a través de un antisuero secundario que sí está marcado.

Existe una clasificación de estas técnicas según el marcador empleado, para poder observar si ha ocurrido la reacción antígeno-anticuerpo. Las moléculas más utilizadas como marcadores y empleadas en este trabajo son:

- **Enzimas.** Reciben el nombre de técnicas inmunoenzimáticas y se trata mayoritariamente de métodos indirectos. Se suele emplear la peroxidasa y la fosfatasa alcalina que se revelan gracias al uso de sustratos histoquímicos y cromógenos adecuados, de los que se obtienen productos coloreados e insolubles que pueden ser observados al microscopio óptico.
- **Fluorocromos o moléculas fluorescentes.** Reciben el nombre de técnicas de inmunofluorescencia. Absorben la luz a una determinada longitud de onda y posteriormente emitirán a una longitud de onda mayor. Para poder observar la muestra es necesario un microscopio de epifluorescencia (Montuenga et al., 2014).

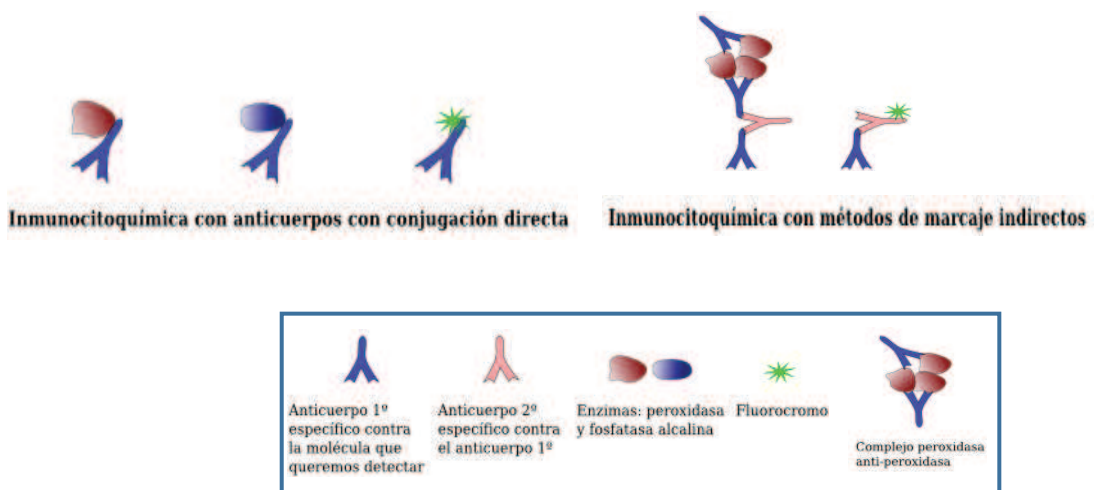


Figura 3. Representación de métodos inmunohistoquímicos (Técnicas histológicas, 2019).

1.4. Proteína Hu

Las proteínas Hu son una familia de proteínas de unión al ARN (RBPs). De sus miembros, **HuR** se expresa en diferentes tejidos como el adiposo, intestinal, bazo, testículo y mama (González Castañeda, 2015), mientras que **HuB**, **HuC** y **HuD** se encuentran únicamente en las neuronas (Hinman & Lou, 2008).

En ratones, se ha visto que los diferentes constituyentes de esta familia expresan distintas proteínas en las neuronas, que evocan una gran diversidad funcional (Okano & Darnell, 1997) y además, “afectan al metabolismo post-transcripcional del ARN, desde el empalme hasta la traducción”. Presentan un papel importante por ejemplo en la **memoria** y la **plasticidad neuronal**. En ratones, HuC está implicado en el aprendizaje espacial, sin embargo, la sobreexpresión de HuD en ratones transgénicos se asocia a un deterioro de la memoria (Hinman & Lou, 2008). Además, HuD estimula la diferenciación de las neuronas y el crecimiento de los axones neuronales (Perrone-Bizzozero & Bird, 2013). HuR por su parte, se relaciona con la respuesta al estrés celular. Además se ha correlacionado la presencia de anticuerpos anti-Hu con enfermedades inmunitarias neurodegenerativas (Senties-Madrid & Vega-Boada, 2001), lo que evidencia que estas proteínas son necesarias para el **desarrollo y funcionalidad neuronal** (Okano & Darnell, 1997).

Las proteínas Hu estabilizan el ARNm. La unión específica de estas proteínas al ARNm y la consiguiente modificación de la expresión de este, es lo que se postula como responsable de las funciones biológicas de estas proteínas. Se unirán a elementos ricos en AU (Adenina y Uracilo) y también preferirán secuencias ricas en Uracilos. Presentan tres sitios de reconocimiento de ARN que comparten más del 90% de la secuencia aminoacídica con el resto de miembros de la familia, además de determinadas secuencias que les permiten desplazarse entre el núcleo y el citoplasma (Hinman & Lou, 2008).

2. OBJETIVOS

Los objetivos planteados en el presente estudio son:

- Estudiar **presencia/ausencia** de poblaciones neuronales Hu positivas en el diencefalo del pez cebra adulto.
- Estudiar **topográficamente** las poblaciones neuronales inmunorreactivas al Hu (Hu-ir) en el diencefalo del pez cebra adulto.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Obtención de los ejemplares

Para la realización de este estudio se han empleado 11 ejemplares de pez cebra adulto, obtenidos de un suministrador comercial.

3.2. Procesamiento del material biológico

Los ejemplares son anestesiados con dosis subletales de sal de **metanosulfonato de 3-aminobenzoato de etilo** (A5040-25G, Sigma-Aldrich) diluido con agua de acuario (0,1 g/L), para posteriormente ser procesados:

3.2.1. Fijación por perfusión

Tras ser anestesiados, los individuos son fijados mediante fijación química para conservar los tejidos de la forma más fiel posible a su estado *in vivo*. Se emplea **paraformaldehído al 4%** en tampón fosfato (PB 0,1M pH 7,4) (ANEXO I) mediante perfusión vascular: se realiza una incisión en el ventrículo con una cánula para llegar a la aorta e introducir el fijador en el torrente sanguíneo.

3.2.2. Postfijación por inmersión

Una vez fijados, se seccionan las cabezas de los animales y se levanta la tapa ósea del cráneo para realizar una postfijación por inmersión, en el mismo fijador utilizado anteriormente. Pasadas 24 horas, se descerebran (Figura 4) (en el caso de los bloques de parafina se trabaja con la cabeza entera) y se realizan 2 lavados de media hora con tampón fosfato para eliminar el exceso de fijador.

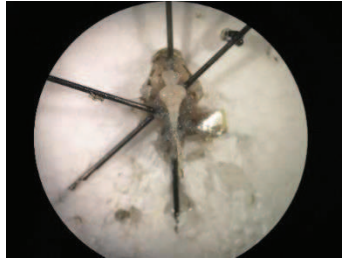


Figura 4. Fotografía del proceso de extirpación del encéfalo.

3.2.3. Conservación

Los encéfalos cuando van a ser utilizados para su inclusión en parafina (36114-4V, VWR Chemicals) serán conservados en etanol de 70° y a temperatura ambiente; mientras que en el caso de la inclusión en Tissue-Tek (4583, Sakura) para su procesamiento en el criostato, se conservarán en metanol de 100° en el congelador.

3.2.4. Inclusión en parafina

Antes de la realización de los bloques de parafina se requieren una serie de pasos:

- Deshidratación. Debido a que la parafina es hidrófoba y los tejidos tienen gran cantidad de agua, es necesario deshidratarlos. Para eso se realizan baños en alcohol de concentración creciente durante un mínimo de 40 minutos cada uno: un baño de alcohol de 80°, dos en alcohol de 96° y tres en alcohol de 100°.
- Aclarado en baños de xilol I y II, durante 20 minutos cada uno.
- Infiltración en parafina. Las cabezas se sumergen en parafina, que ha sido fundida. Permanecen en parafina I (4-6 horas), parafina II (toda la noche) y parafina III (2 horas) en el interior de una estufa a 60°.

- Realización de los bloques. Se introducen las cabezas en orientación vertical en un molde con parafina fundida y se deja solidificar a temperatura ambiente.

3.2.5. Inclusión en Tissue-Tek

En este caso, como los bloques van a ser congelados es necesario crioprotegerlos para que no se formen cristales que dañen el tejido. Para ello se sumergen los encéfalos en soluciones de sacarosa en tampón fosfato de concentración creciente: sacarosa al 10% (2-4 horas), al 20% (4 horas) y al 30% (toda la noche). Posteriormente, se hace un cuarto baño durante 2-4 horas con 50% sacarosa al 30% y 50% Tissue-Tek, para que infiltre bien en el tejido, y a continuación, ya se realizan los bloques. En un recipiente con **2-metilbutano al 99%** (126470010, Acros organics) se introduce el molde que contiene Tissue-Tek y el encéfalo; esto se hace con el objetivo de que se congele de forma homogénea desde el exterior al interior. Tras esto, se añade **nitrógeno líquido** y se obtiene el bloque.

3.2.6. Seccionado del tejido

El seccionado del tejido se hace de forma transversal y a 12 μm de grosor, independientemente del tipo de bloque. Lo que cambia es el método de seccionado:

- **Microtomo de rotación o de Minot** (LKB Bromma). Es el empleado para los bloques de parafina y consiste en su desplazamiento hacia una cuchilla situada perpendicularmente a ellos, gracias a la rotación producida por una manivela (Montuenga et al., 2014).

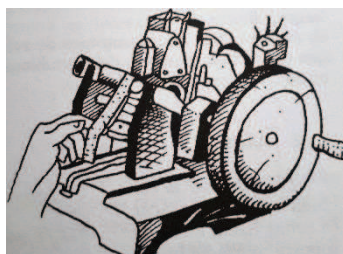


Figura 5. Representación básica de un microtomo de rotación (Torres Seco, 2002).

- **Criostato** (Microm HM500-MV). Se emplea en los bloques de Tissue Tek y sigue el mismo mecanismo con la diferencia de que se encuentra en el interior de una cámara a una temperatura de aproximadamente -20°C.

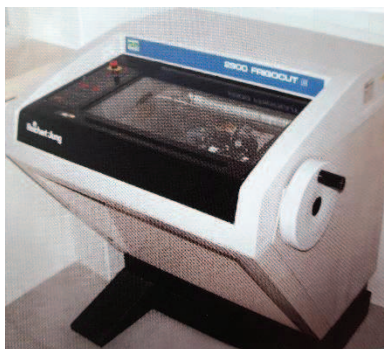


Figura 6. Fotografía de un modelo de criostato (Montuenga et al., 2014).

Los cortes se recogieron en portaobjetos previamente gelatinizados para una mejor adherencia.

3.3. Procesamiento inmunohistoquímico

En primer lugar hay que eliminar el medio de inclusión de las muestras y en el caso de la parafina se hace mediante cuatro baños de xileno, de 5 minutos cada uno, seguidos de una rehidratación de las secciones en baños de 5 minutos en concentraciones de alcohol decrecientes: dos baños de alcohol a 100° y uno a 96° y a 80°; si se trata de Tissue-Tek, solamente son necesarios dos baños de 10 minutos cada uno, en tampón fosfato salino (PBS 0,01M pH 7,4) (ANEXO I). A continuación, el procedimiento es similar aunque con algunas diferencias en ambos casos:

3.3.1. Técnica inmunoenzimática: peroxidasa

- Realización de 2 lavados en PBS durante 10 minutos cada uno.
- **Recuperación antigénica** en tampón cítrico-citrato sódico 0,1 M pH 6 en una cubeta en el interior de un baño termostático a 90°- 95°C durante 30 minutos. Este paso hace visibles los lugares del antígeno y que por tanto, reaccione mejor.

- Dejar atemperar unos 20 minutos.
- De nuevo, 2 lavados con PBS durante el mismo tiempo que en la anterior ocasión.
- Tratamiento con **peróxido de hidrógeno al 3%** en PBS durante media hora y a temperatura ambiente. Esto permite eliminar la peroxidasa que está ya presente en el tejido y evitar falsos positivos durante el revelado.
- Lavado en PBS durante 10 minutos.
- Lavado otros 10 minutos con **PBS-Tritón al 0,01%**. El Tritón es un detergente que permeabiliza las membranas de forma que el anticuerpo puede penetrar y unirse al antígeno (Montuenga et al., 2014).
- Incubación de los portaobjetos con suero normal de cabra, **NGS** (G6767, Sigma-Aldrich), diluido (1:10) en PBS durante 1 hora, en una cámara húmeda y a temperatura ambiente.
- Incubación de los portaobjetos con la solución en PBS del **anticuerpo primario** (1:500) de ratón anti-proteína neuronal humana, **Hu C/D** (A21271, Invitrogen), en cámara húmeda y a temperatura ambiente hasta la mañana siguiente.
- Lavado en PBS y posteriormente en PBS-Tritón, ambos durante 10 minutos.
- Incubación de los portaobjetos durante una hora del **anticuerpo secundario** diluido (1:100) en PBS: inmunoglobulina de cabra anti-ratón marcada con peroxidasa de rábano **GAM-HRP** (A0168-1 mL, Sigma-Aldrich). La incubación se produce en una cámara húmeda y a temperatura ambiente.
- Tras dos lavados de 10 minutos en PBS, se revela la actividad peroxidasa con una disolución de diaminobencidina, **DAB**, (D5637-56, Sigma-Aldrich) al 0,06% y peróxido de hidrógeno al 0,005% en PBS durante aproximadamente 5 minutos. Posteriormente se realizan 2 lavados de PBS de 10 minutos. La DAB formará un **precipitado de color marrón** en aquellos lugares donde esté presente el anticuerpo secundario marcado con la peroxidasa.
- Los pasos finales consisten en una deshidratación de las secciones en concentraciones de alcohol de graduación creciente (80°, 96° y 100° (I y

II)) durante 5 minutos cada baño y un aclarado en xilol mediante cuatro baños de 5 minutos cada uno; para finalmente realizar el montaje con Eukitt (resina sintética).

- El resultado puede observarse al **microscopio óptico** tras un previo secado en una estufa a 40°C.

3.3.2. Inmunofluorescencia

El procedimiento es muy similar al de la peroxidasa pero con una serie de diferencias. El tratamiento con peróxido de hidrógeno es sustituido por una solución de **borohidruro de sodio** 0,1 M en PBS a temperatura ambiente durante media hora. Este compuesto permite eliminar la fluorescencia endógena, evitando así falsos positivos, y previamente a este paso se requerirán tres baños de PBS de 5 minutos cada uno. Otra diferencia es el anticuerpo secundario utilizado, en este caso, se ha empleado **GAM-fluoresceína** (F2761, Invitrogen), que emitirá fluorescencia en color verde. Tanto estos pasos como los siguientes deben hacerse en oscuridad para que no disminuya la intensidad de la fluorescencia. En la inmunofluorescencia no serán necesarios los pasos de deshidratación y aclarado; además, tras el montaje las muestras serán conservadas en el refrigerador y protegidas de la luz hasta su observación mediante el microscopio de fluorescencia.

3.4. Observación de las secciones y procesamiento de imágenes

Las secciones se observaron con un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 90i) y se fotografiaron con una cámara digital (Olympus DP71) acoplada a él. Para el procesamiento de las imágenes y elaboración de plantillas, se emplearon los programas CorelDraw X8 y Corel PHOTO-PAINT X8.

4. RESULTADOS

El presente estudio se centra en la descripción del diencéfalo de pez cebra adulto mediante técnicas inmunohistoquímicas basándose en el atlas del encéfalo del pez cebra de Wullimann et al. (1996). Los métodos empleados permiten el estudio y detección de las agrupaciones de somas neuronales. Los resultados obtenidos se muestran esquemáticamente en la Figura 7.

LISTADO DE ABREVIATURAS

A	Núcleo anterior talámico	Hc	Zona caudal del hipotálamo periventricular	PPa	Parte anterior del núcleo preóptico parvocelular
APN	Núcleo pretectal accesorio	Hd	Zona dorsal del hipotálamo periventricular	PPd	Parte dorsal del núcleo periventricular pretectal
ATN	Núcleo tuberal anterior	Hv	Zona ventral del hipotálamo periventricular	PPp	Parte posterior del núcleo preóptico parvocelular
CIL	Núcleo central del lóbulo inferior	LH	Núcleo hipotalámico lateral	PPv	Parte ventral del núcleo periventricular pretectal
CM	Cuerpo mamilar	LR	Receso lateral del ventrículo diencefálico	PTN	Núcleo tuberal posterior
CO	Quiasma óptico	P	Núcleo talámico posterior	PVO	Órgano paraventricular
CP	Núcleo talámico posterior central	PCN	Núcleo paracomisural	SC	Núcleo supraquiasmático
CPN	Núcleo pretectal central	PGa	Núcleo preglomerular anterior	TGN	Núcleo gustativo terciario
DIL	Núcleo difuso del lóbulo inferior	PGl	Núcleo preglomerular lateral	TLa	Toro lateral
DP	Núcleo talámico posterior dorsal	PGm	Núcleo preglomerular medial	TPM	Tracto pretectomamilar
FR	Fascículo retroflexo	PM	Núcleo preóptico magnoelular	TPp	Núcleo periventricular del tubérculo posterior
Had	Núcleo dorsal del habénula	PMg	Parte gigantocelular del núcleo preóptico magnoelular	VM	Núcleo talámico ventromedial
Hav	Núcleo ventral del habénula	PO	Núcleo pretectal posterior	VL	Núcleo talámico ventrolateral

En la parte más rostral del diencefalo, el área preóptica, se observa un grupo de células en la región ventral que se caracterizan por su intensa inmunorreactividad y que se localizan en el núcleo preóptico parvocelular anterior (PPa) (Figuras 7A y 8A). Estas células están bastante agrupadas alrededor del ventrículo diencefálico. Este núcleo (PPa) será reemplazado por el núcleo preóptico parvocelular posterior (PPp) (Figuras 7B, 7C, 8B, 8C, 9A y 9C), que estará acompañado en posición ventrolateral por el núcleo supraquiasmático (SC) (Figuras 7C, 8C, 9A y 9C), que presenta somas más dispersos y con un marcaje ligeramente menor. Dorsalmente a PPp emerge el núcleo preóptico magnocelular (PM) (Figuras 7B, 8B y 9A) cuyas neuronas están intensamente marcadas y muy agrupadas; de él surgiría más caudalmente el gigantocelular (PMg) (Figura 7C) sin embargo, en el presente estudio el marcaje ha sido negativo. Destacar la presencia del quiasma óptico (CO) (Figuras 7C y 7D) en posición ventral a la región preóptica anterior.

Más caudalmente, en el epitálamo, se encuentran los núcleos de la habénula dorsal (Had) (Figuras 7D, 7E y 9B) y ventral (Hav) (Figuras 7C, 7D, 7E y 9B). En el primero las células se distribuyen de forma bastante agrupada, mientras que en el Hav están en menor número y de forma más aislada. Bajo la porción caudal de esta última surge el tálamo dorsal, que está constituido por un núcleo anterior (A) (Figuras 7D, 7E, 7F y 8C) y más caudalmente, por el núcleo posterior talámico dorsal (DP) (Figuras 7G y 8I) y el núcleo posterior talámico central (CP) (Figuras 7G, 8F y 9G). Ventralmente se sitúa el tálamo ventral, donde se diferencian los núcleos ventromedial (VM) y ventrolateral (VL) (Figuras 7C, 7D, 7E, 7F, 8C, 9B y 9E, en ambos casos) pudiéndose observar una mayor compactación de los somas en VM.

En el tubérculo posterior, entre el tálamo ventral y el hipotálamo se diferencian el núcleo periventricular del tubérculo posterior (TPp) (Figuras 7E, 7F, 7G, 7H, 8E, 8F y 9F) y el núcleo tuberal posterior (PTN) (Figuras 7G, 7H, 8G, 9I, 10B y 10D) así como el órgano paraventricular (PVO) (Figuras 7H, 9J, 10A, 10B, 10C y 10D). En ellos las neuronas están muy marcadas y agrupadas, salvo en el caso de PTN, en el que lo están en menor medida. Siguiendo una secuencia rostrolateral-caudomedial, son visibles núcleos que han migrado y entre los que se aprecian: los núcleos preglomerulares anterior (PGa) (Figuras 7F y 8E), lateral (PGl) (Figuras 7F, 7G, 7H, 8E, 8H, 9H y 10A) y medial (PGm) (Figuras 7G, 7H, 8H, 9H, 9J, 10A, 10C

y 10E). En posición ventral a PGM se sitúa el núcleo gustativo terciario (preglomerular) (TGN) (Figuras 7H, 10C y 10E) y en la región ventrolateral al núcleo preglomerular caudal (que no se observa en este estudio), se localiza el conocido como cuerpo mamilar (CM) (Figuras 9K, 10G, 10H y 10I). También se encuentran en el tubérculo posterior: el núcleo talámico posterior (P) (Figuras 7H, 10A y 10C) y el toro lateral (TLa) (Figuras 7H, 10E).

La región hipotalámica presenta en su parte ventral zonas inmunorreactivas en el núcleo periventricular (Hv) (Figuras 7D, 7E, 7F, 7G, 7H, 8E, 8G, 8H, 9H, 9J y 10A) que se extiende más rostralmente. Lateralmente a este, se encuentran el núcleo anterior (ATN) (Figuras 7E, 7F, 7G y 9H) y el núcleo hipotalámico lateral (LH) (Figuras 7G, 7H, 8H, 9H, 9I y 10A). Más caudalmente, en la región hipotalámica dorsal, se forman recesos ventriculares laterocaudales pareados (LR) (Figura 10C) a los que rodean masas de células periventriculares (Hd) (Figuras 7G, 7H, 8G, 9H, 9I, 9J, 10A, 10B, 10C, 10F, 10H y 10I). De estas masas migran células que forman el núcleo difuso de células pequeñas (DIL) (Figuras 7H, 9K, 10F, 10H y 10I) y el núcleo central de células más grandes (CIL) (Figuras 9K, 10F, 10H y 10I) del lóbulo inferior. Son neuronas que se encuentran bastante solitarias y no tan marcadas, especialmente las que forman parte de DIL. Rostralmente, un grueso Hv situado ventralmente al núcleo tuberal posterior del tubérculo posterior, inicia la región hipotalámica caudal. Esta región, más caudalmente, consiste en recesos posteroventriculares pareados y rodeados por núcleos periventriculares (Hc) (Figura 10G).

En el sinencéfalo se observa inmunorreactividad en los núcleos del pretecho periventricular (PPd/PPv) (Figuras 7G y 8I) y el paracomisural (PCN) (Figura 7G).

Por último, en el pretecho, unas células más pequeñas y desordenadas forman el núcleo pretectal posterior (PO) (Figuras 7E, 7F y 8D). Dorsalmente a ese PO surge el núcleo pretectal central (CPN) (Figuras 7E, 7F y 8D) y en posición dorsolateral al PO, el núcleo pretectal accesorio (APN) (Figuras 7E, 7F y 8D). Es importante nombrar la presencia del tracto pretecto-mamilar (TPM) (Figuras 7E, 7F, 7G y 7H) que recorre PO hasta llegar al cuerpo mamilar; y la presencia del tracto habenulo-interpeduncular (FR) (Figuras 7D, 7E, 7G, 7H y 8I).

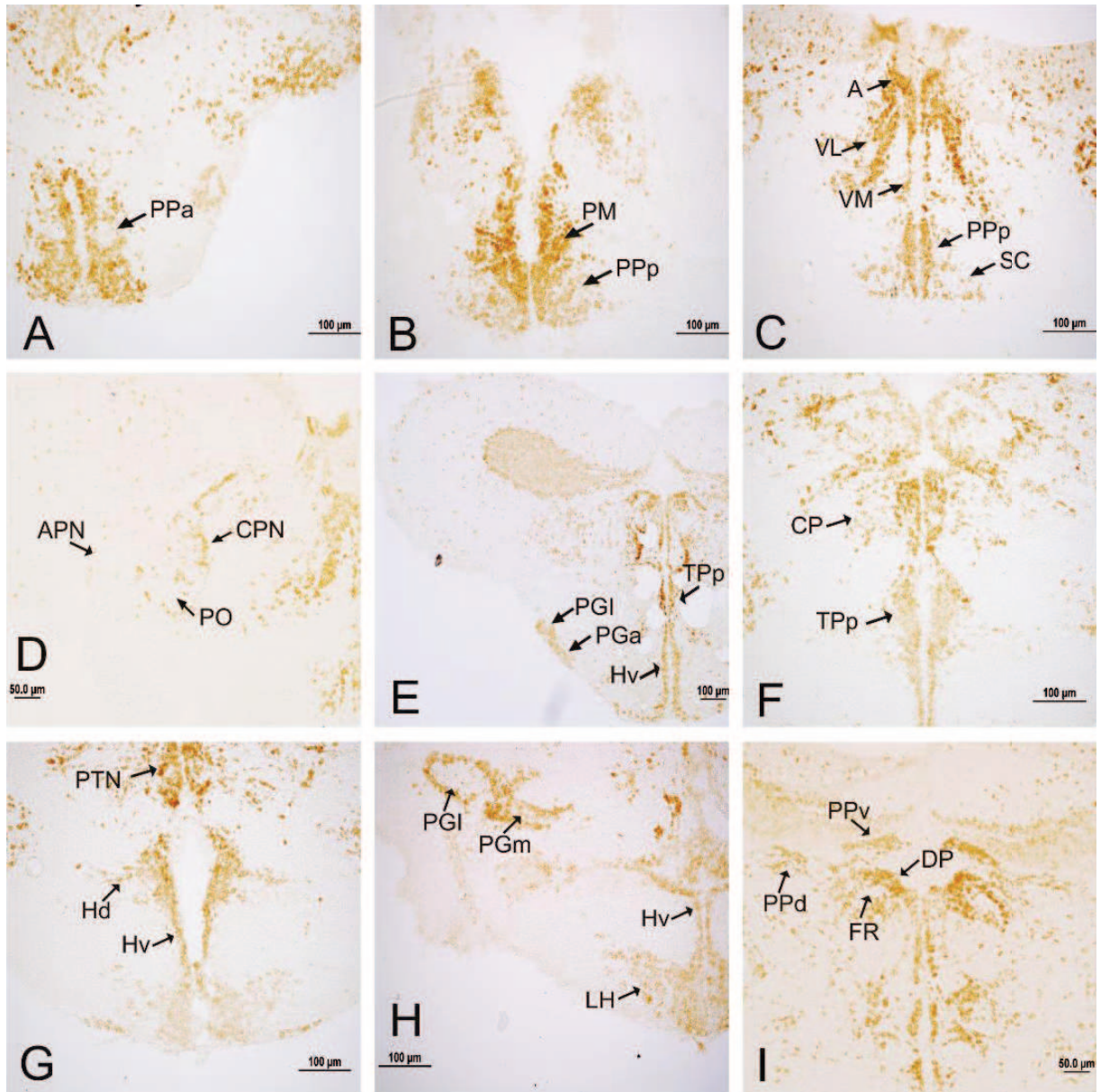


Figura 8 (A-I). Microfotografías de secciones transversales de encéfalo de pez cebra adulto (*Danio rerio*) mostrando la distribución en el diencefalo de los somas neuronales inmunorreactivos a la Hu.

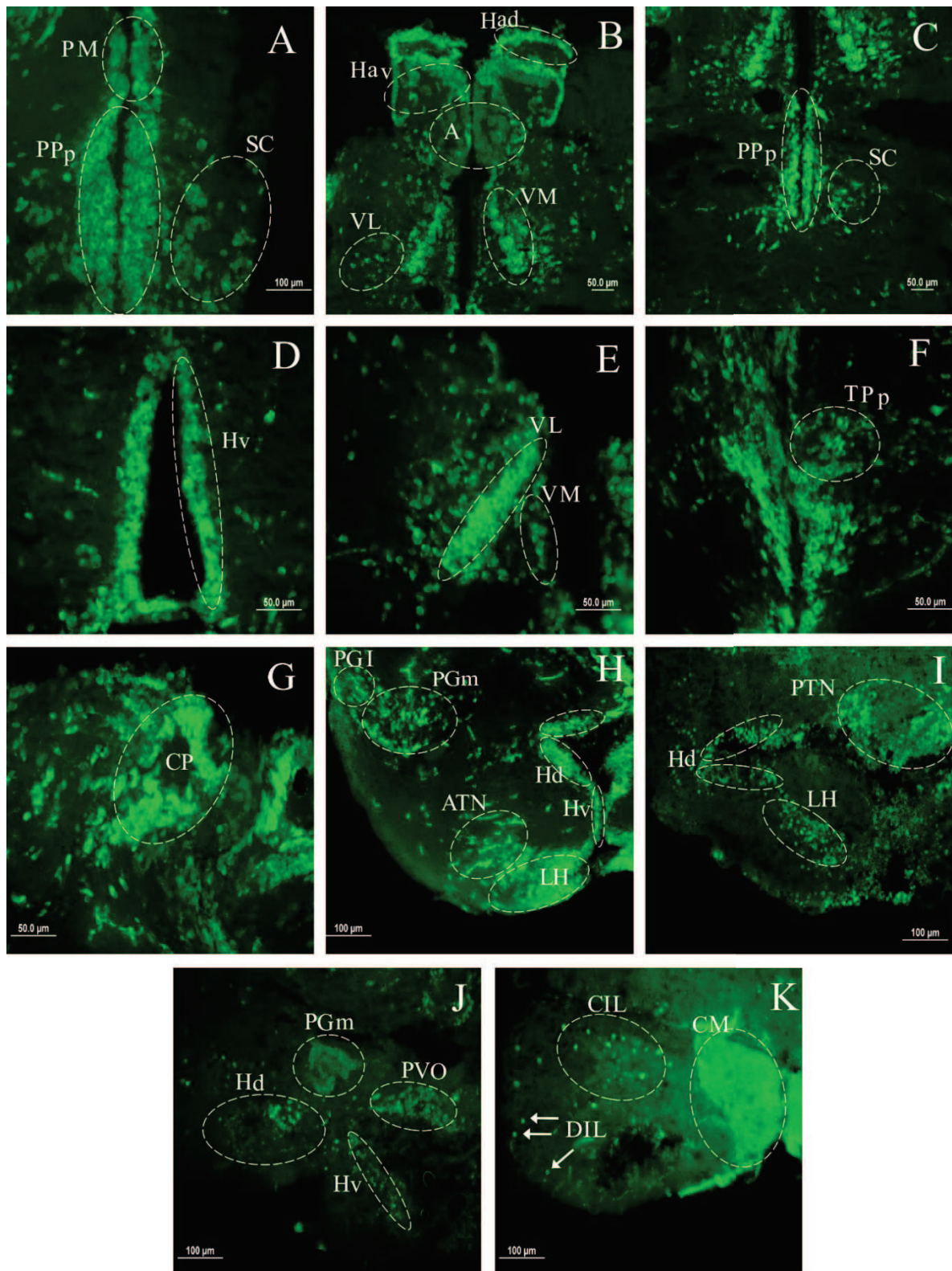


Figura 9 (A-K). Microfotografías con fluorescencia de secciones transversales de diencéfalo de pez cebra adulto (*Danio rerio*) mostrando los somas de las neuronas inmunorreactivas a la Hu.

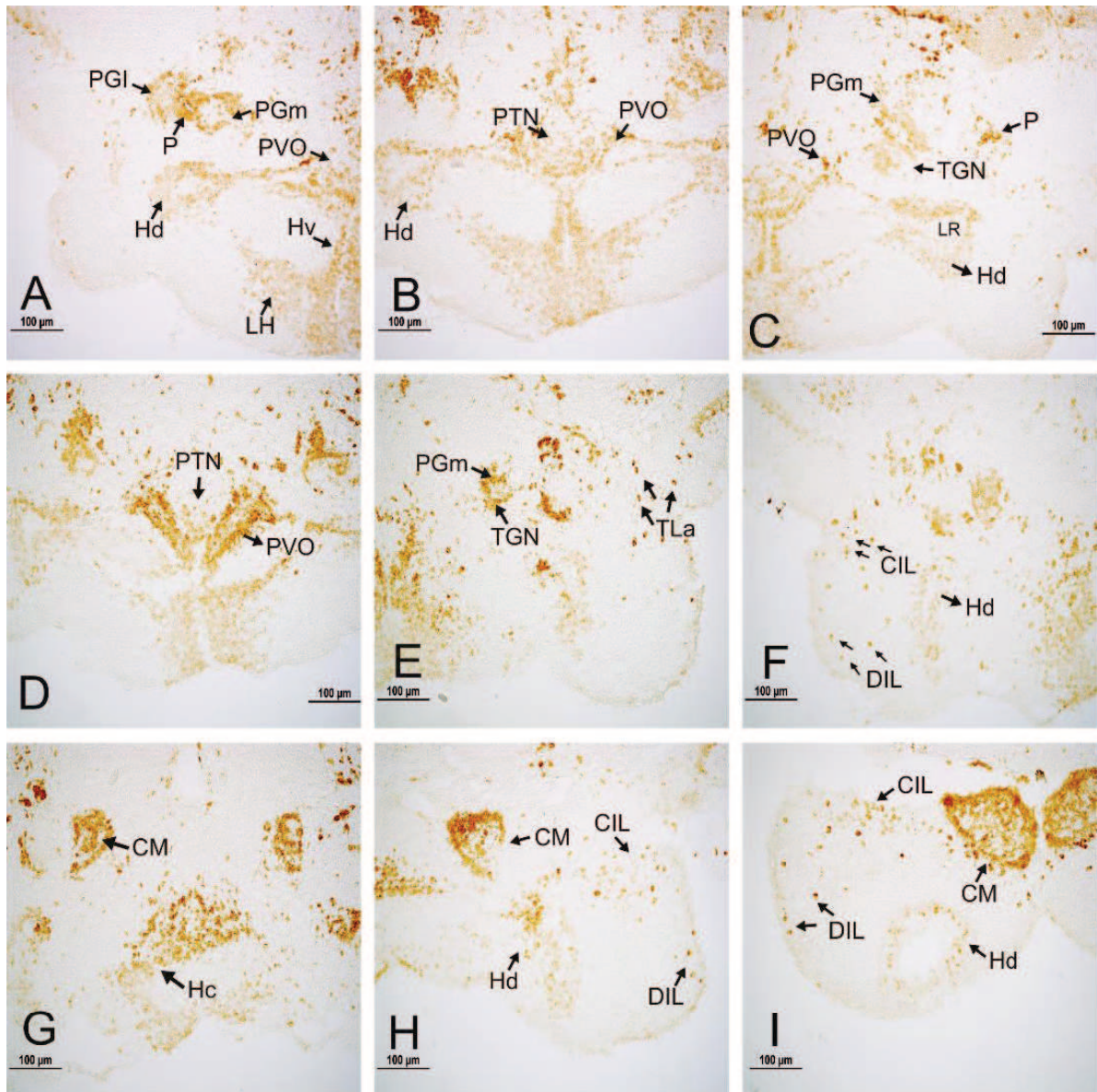


Figura 10 (A-I). Microfotografías de secciones transversales de encéfalo de pez cebra adulto (*Danio rerio*) mostrando la distribución en el diencefalo de los somas neuronales inmunorreactivos a la Hu.

5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos tras la realización de las técnicas inmunohistoquímicas en el diencéfalo del pez cebra para la localización de las proteínas Hu, muestran una gran expresión neuronal en los núcleos principales de esta subdivisión encefálica. En el área preóptica, los núcleos preóptico parvocelular anterior (PPa) y posterior (PPp), núcleo supraquiasmático (SC) y núcleo preóptico magnocelular (PM) presentaron inmunorreactividad para la HuC/D. Todos estos núcleos descritos por Wullimann et al. (1996) en el pez cebra y anteriormente por Braford & Northcutt (1983) en peces actinopterigios, parecen estar implicados en el comportamiento sexual y en la mediación de determinadas conductas agresivas, de hecho, esta región preóptica recibe gran cantidad de aferencias procedentes de la retina y acaban en el núcleo parvocelular posterior y en núcleo supraquiasmático, mientras que aquellas aferencias procedentes de los bulbos olfatorios terminan de manera casi exclusiva en el núcleo preóptico parvocelular anterior. Cabe destacar, que el principal núcleo del área preóptica, el núcleo preóptico magnocelular (PM), está íntimamente relacionado con la actividad de la hipófisis presentando sus células la capacidad de producir y liberar determinados nonapéptidos (Holmqvist & Ekström, 1991, 1995).

En el epitálamo la expresión de la HuC/D en los núcleos dorsal y ventral de ambas habénulas, permite el estudio topográfico de ambos núcleos rostro-caudalmente a diferencia de lo observado en el pez cebra por Castro, Becerra, Manso, & Anadón (2006). En dicho estudio la inmunorreactividad para la calretinina, es bastante tenue y se localiza en una banda entre la parte dorsal y ventral, para la colina-acetiltransferasa (ChAT) en neuronas de la zona medioventral y para el neuropéptido Y (NPY) sólo determinadas neuronas de la zona ventrolateral de la habénula izquierda.

El tálamo constituye las paredes laterales del diencéfalo y ocupando una región ventral con respecto al epitálamo. La región talámica de peces teleósteos muestra un grado de desarrollo mayor que el observado en peces ciclóstomos así como en anfibios urodelos, debido a que presenta una gran diferenciación en núcleos neuronales, la mayor parte de ellos relacionados con el sistema visual, como ocurre en la región preóptica anteriormente mencionada. Esta relación con el sistema visual es debida a que tanto el tálamo dorsal como el ventral muestran una relación con la

integración de impulsos sensoriales hacia el telencéfalo ya que presentan conexiones recíprocas con los núcleos del telencéfalo ventral (Vd y Vv) en el pez cebra (Rink & Wulliman, 2002, 2004).

En un estudio realizado en otro teleósteo (Lamas, Anadón, & Díaz-regueira, 2007) la técnica inmunohistoquímica de doble marcaje para la Hu y el dipéptido carnosina, permitió identificar las poblaciones neuronales inmunorreactivas a la carnosina (Car-ir) por primera vez en el encéfalo de un pez, mostrando una amplia expresión dentro de la región talámica así como en la zona del tubérculo posterior, demostrando la gran utilidad de dicha técnica para identificar poblaciones neuronales.

Al igual que en el estudio realizado en el mágil anteriormente mencionado, en el tubérculo posterior del pez cebra, los principales núcleos tanto periventriculares, que forman el tubérculo posterior periventricular, así como una serie de núcleos migrados, que sólo están presentes en peces (Braford & Northcutt, 1983) presentan inmunorreactividad para la HuC/D. Cabe destacar la inmunorreactividad observada en los núcleos preglomerulares, relacionados con la integración de la información acústica y macanosensorial, así como en el órgano paraventricular, considerada como una especialización del epéndimo situado en el límite con el hipotálamo (Braford & Northcutt, 1983). En este órgano paraventricular, desde sus células parten largos tractos de fibras tirosina hidroxilasa-positivas, lo cual sugiere que este núcleo es en gran medida, responsable de la inervación dopaminérgica del cerebro de teleósteos (Braford & Northcutt, 1983).

Dentro del hipotálamo, el núcleo tuberal está implicado en la regulación neuroendocrina de la adenohipófisis así como la liberación de la hormona del crecimiento en los actinopterigios (Peter & Fryer, 1983), y junto con el núcleo preóptico magnocelular, forman los dos centros neurosecretorios “por excelencia” dentro de la subdivisión diencefálica. Ambos núcleos presentan neuronas Hu-ir, con lo que se podría sugerir la utilización del doble marcaje para la HuC/D y otra sustancia objeto de estudio, lo cual permitiría poder localizar e identificar la presencia de neuronas neurosecretoras en el sistema nervioso del pez cebra.

Es conocido que las proteínas Hu juegan un importante papel en la plasticidad y en la diferenciación neuronal, tanto en el Sistema Nervioso Central como en el

Sistema Nervioso Periférico, al asegurar el control post-transcripcional de RNAs que codifican múltiples proteínas (Glisovic, Bachorik, Yong, & Dreyfuss, 2008).

Un reciente estudio ha analizado la expresión proteica de HuB, HuC y HuD en neuronas sensoriales del ganglio de la raíz dorsal (tanto en somas como en neuritas) de ratones macho adultos a los que se indujo diabetes (Mustăciosu et al., 2019). Así, se ha descrito un aumento de la expresión de HuB y una disminución de la expresión de HuD en los ratones diabéticos comparados con los ratones control.

Los peces teleósteos son intolerantes a la glucosa, presentando una hiperglucemia constante similar a la de pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Este hecho hace que los peces cebra sean adecuados para el estudio y el diagnóstico de esta enfermedad crónica. Además, la insulina que secretan es muy sensible a la glucosa y sus niveles en sangre son comparables a los descritos en mamíferos (Wright, Bonen, Michael Conlon, & Pohajdak, 2000). A pesar de ello, en los peces teleósteos, la insulina no regula adecuadamente los niveles circulantes de glucosa y ésta puede provocar disminución de la insulina (Moon, 2001). Por todo ello, los peces teleósteos son utilizados como modelos de estudio de pacientes insulino dependientes con diabetes mellitus tipo 1.

6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos han permitido establecer las siguientes conclusiones:

- Se ha observado la presencia de poblaciones neuronales inmunorreactivas a la proteína HuC/D en el diencefalo del pez cebra adulto.
- La presencia de la proteína HuC/D en los somas neuronales de los núcleos del diencefalo de *Danio rerio*, confirma su utilidad como marcador topográfico en esta subdivisión encefálica.

CONCLUSIÓNS

Os resultados obtidos permitiron establecer as seguintes conclusións:

- Observouse a presenza de poboación neuronais inmunorreactivas á proteína HuC/D no diencefalo do peixe cebra adulto.
- A presenza da proteína HuC/D nos somas neuronais dos núcleos do diencefalo de *Danio rerio*, confirma a súa utilidade como marcador topográfico nesta subdivisión encefálica.

CONCLUSIONS

The results obtained have led to the following conclusions:

- The presence of immunoreactive neuronal populations to the HuC/D protein has been observed in the diencephalon of adult zebrafish.
- The presence of HuC/D protein in neuronal bodies in diencephalic nuclei of *Danio rerio*, confirms its usefulness as a topographic marker in this brain subdivision.

ANEXO I

Preparación de soluciones:

- **Tampón fosfato (PB) 0,1M pH 7,4 (1L).** Se prepara en probeta a partir de:
 - Fosfato monosódico 0,2M (95 mL). Obtenido a partir de 27,598 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1 \text{ H}_2\text{O}$ completando hasta llegar al litro con agua destilada.
 - Fosfato disódico 0,2M (405 mL). Obtenido a partir de 71,623 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ completando hasta llegar al litro con agua destilada.
 - Agua destilada (500 mL).

- **Tampón fosfato salino (PBS) 0,01M pH 7,4 (1L).** Se prepara en probeta a partir de:
 - Fosfato monosódico 0,2M (9,5 mL)
 - Fosfato disódico 0,2M (40,5 mL)
 - NaCl (8,76 g)
 - KCl (0,2 g)
 - Agua destilada (hasta llegar a 1L)

- **Paraformaldehído al 4% en PB 0,1M pH 7,4 (1L).** En una campana de extracción de gases, se mezclan 500 mL de agua destilada (calentada a 75°-80°C) con 40 g de paraformaldehído y un par de gotas de NaOH 1N, hasta que la solución quede transparente. Por último, tras enfriar la solución, se añaden 500 mL de tampón fosfato (PB) 0,2M pH 7,4.

7. BIBLIOGRAFÍA

Libros/artículos científicos

- Amaral, D.G., & Strick, P.L. (2013). The organization of the central nervous system. En: E.R. Kandel, J.H.Schwartz, T.M. Jessell, S.A. Siegelbaum, & A.J. Hudspeth (Eds.). *Principles of neural science* (pp. 338–355).
- Braford M.R., & Northcutt R.G. (1983). Organization of the diencephalon and pretectum of the ray-finned fishes. En: R.E. Davis, & R.G. Northcutt. *Fish Neurobiology. II. Higher brain areas and functions* (pp. 117-163). Ann Arbor: University of Michigan Press.
- Castro, A., Becerra, M., Manso, M. J., & Anadón, R. (2006). Calretinin immunoreactivity in the brain of the zebrafish, *Danio rerio*: Distribution and comparison with some neuropeptides and neurotransmitter- synthesizing enzymes. I. Olfactory organ and forebrain. *Journal of Comparative Neurology*, 494(3), 435–459. DOI:10.1002/cne.20782
- Glisovic, T., Bachorik, J. L., Yong, J., & Dreyfuss, G. (2008). RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS letters*, 582(14), 1977–1986. DOI:10.1016/j.febslet.2008.03.004
- González Castañeda, C. A. (2015). *Pronóstico e/ou diagnóstico da proteína HuR e do DNA circulante no cancro gástrico e de mama*. (Trabajo de fin de máster, Universidade da Coruña). Recuperado de: <https://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/14812>
- Herget, U., Wolf, A., Wullimann, M. F., & Ryu, S. (2014). Molecular neuroanatomy and chemoarchitecture of the neurosecretory preoptic-hypothalamic area in zebrafish larvae. *Journal of comparative neurology*, 522(7), 1542–1564. DOI:10.1002/cne.23480
- Hinman, M. N., & Lou, H. (2008). Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cellular and molecular life sciences*, 65(20), 3168–3181. DOI:10.1007/s00018-008-8252-6
- Holden, J.A., Layfield, J., & Matthews, J.L. (2012). Central nervous system. En J.A. Holden, L. J. Layfield, & J.L. Matthews. *The zebrafish: atlas of macroscopic and microscopic anatomy* (pp. 122–124). Cambridge: Cambridge University Press.
- Holmqvist, B. I., & Ekström, P. (1991). Galanin-like immunoreactivity in the brain of teleosts: Distribution and relation to substance P, vasotocin, and isotocin in the atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Comparative Neurology*, 306(3), 361–381. DOI:10.1002/cne.903060302

- Holmqvist, B. I., & Ekström, P. (1995). Hypophysiotrophic systems in the brain of the Atlantic salmon. Neuronal innervation of the pituitary and the origin of pituitary dopamine and nonapeptides identified by means of combined carbocyanine tract tracing and immunocytochemistry. *Journal of Chemical*. 8(2), 125–145. DOI:10.1016/0891-0618(94)00041-Q
- Lamas, I., Anadón, R., & Díaz-Regueira, S. (2007). Carnosine-like immunoreactivity in neurons of the brain of an advanced teleost, the gray mullet (*Chelon labrosus*, Risso). *Brain Research*, 1149, 87–100. DOI:10.1016/J.BRAINRES.2007.02.070
- Montuenga, L., Esteban, F. J., & Calvo, A. (2014). *Técnicas en histología y biología celular*. Barcelona: Elsevier Masson.
- Moon, T. W. (2001). Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 129(2–3), 243–249. DOI:10.1016/S1096-4959(01)00316-5
- Mustăciosu, C. C., Banciu, A., Rusu, C. M., Banciu, D. D., Savu, D., Radu, M., & Radu, B. M. (2019). RNA-binding proteins HuB, HuC, and HuD are distinctly regulated in dorsal root ganglia neurons from STZ-sensitive compared to STZ-resistant diabetic mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 1965. DOI:10.3390/ijms20081965
- Nüsslein-Volhard, C., & Dahm, R. (2002). *Zebrafish: a practical approach*. . Oxford: Oxford University Press.
- Okano, H. J., & Darnell, R. B. (1997). A hierarchy of Hu RNA binding proteins in developing and adult neurons. *The Journal of Neuroscience*, 17(9), 3024–3037. DOI:10.1523/JNEUROSCI.17-09-03024.1997
- Perrone-Bizzozero, N., & Bird, C. W. (2013). Role of HuD in nervous system function and pathology. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, 5S(2), 554–563. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23277068>
- Peter, R.E. & Fryer, J.N. (1983). Endocrine functions of the hypothalamus of actinopterygians. En: R.E. Davis, & R.G. Northcutt. *Fish Neurobiology. II. Higher brain areas and functions* (pp.165-201). Ann Arbor: University of Michigan Press.
- Rink, E., & Wullimann, M. F. (2002). Connections of the ventral telencephalon and tyrosine hydroxylase distribution in the zebrafish brain (*Danio rerio*) lead to identification of an ascending dopaminergic system in a teleost. *Brain Research Bulletin*, 57(3–4), 385–387. DOI:10.1016/S0361-9230(01)00696-7
- Rink, E., & Wullimann, M. F. (2004). Connections of the ventral telencephalon (subpallium) in the zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Research*, 1011(2), 206–220. DOI:10.1016/J.BRAINRES.2004.03.027

- Senties-Madrid, H., & Vega-Boada, F. (2001). Paraneoplastic syndromes associated with anti-Hu antibodies. *The Israel Medical Association Journal : IMAJ*, 3(2), 94–103. Recuperado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11344832>
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83(1), 13–34. DOI:10.1111/j.1469-185X.2007.00030.x
- Torres Seco, F. (2002). *Manual de técnicas en histología y anatomía patológica*. Barcelona: Ariel.
- Vishwanath, W. (2010). *Danio rerio*. *The IUCN red list of threatened species 2010*: e.T166487A6219667. DOI:10.2305/IUCN.UK.2010-4.RLTS.T166487A6219667.en
- Wright, J. R., Bonen, A., Michael Conlon, J., & Pohajdak, B. (2000). Glucose homeostasis in the teleost fish tilapia: insights from Brockmann body xenotransplantation studies. *American Zoologist*, 40(2), 234–245. DOI:10.1093/icb/40.2.234
- Wullmann, M.F., Rupp, B., & Reichert, H. (1996). *Neuroanatomy of the Zebrafish Brain. A topological atlas*. Basel: Birkhäuser Verlag.

Webs

- Froese, R. & Binohlan. (2019). *Danio rerio* (Hamilton, 1822). *Zebra danio*. Recuperado de: <https://www.fishbase.se/summary/Danio-rerio.html>. Último acceso el 23 de abril de 2019.
- Técnicas histológicas: 5. Inmunohistoquímica. (2019). En: M. Megías Pacheco, P. Molist García & M.A. Pombal Diego. *Atlas de histología vegetal y animal*. Universidade de Vigo. Recuperado de: <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/5-inmuno.php>. Último acceso el 6 de mayo de 2019.