



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Celular y Molecular
Área de Biología Celular

Trabajo Fin de Grado

Estudio neuroanatómico de la región preóptica en el pez cebra



Sandra Palla Pérez

Directores: Antonio Manuel Castro Castro

Mónica Folgueira Otero

Julio 2014



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Celular y Molecular
Área de Biología Celular

Estudio neuroanatómico de la región preóptica en el pez cebra

Trabajo de Fin de Grado que presenta la alumna de Biología Sandra Palla Pérez bajo la dirección de D. Antonio Manuel Castro Castro y Dña. Mónica Folgueira Otero.

A Coruña, de Julio de 2014.

Fdo. Antonio Manuel Castro Castro

Fdo. Mónica Folgueira Otero

Estudio neuroanatómico de la región preóptica en el pez cebra

Resumen

La distribución de la proteína quinasa dependiente de ciclina-2 (Cdk2) ha sido estudiada en el encéfalo del pez cebra (adulto y etapas larvarias) mediante el empleo de técnicas inmunohistoquímicas con el fin de realizar un estudio neuroanatómico del área preóptica. Además se ha testado la efectividad del anticuerpo anti-Cdk2 como marcador de proliferación celular durante el desarrollo larvario. Los resultados obtenidos indican que el anticuerpo anti-Cdk2 reconoce varias poblaciones de neuronas totalmente diferenciadas tanto en el adulto como en la larva, concretamente en el núcleo preóptico magnocelular y en el cerebelo (células de Purkinje). Las células inmunorreactivas a la Cdk2 (Cdk2-ir) del núcleo preóptico magnocelular se caracterizan por presentar distintos tamaños, alcanzando sus axones mayoritariamente la neurohipófisis a través del tracto preóptico-hipofisario. Además, en el adulto, el anticuerpo también reconoce células de la glía. También se ha comparado el patrón de expresión de la Cdk2 con el de la calretinina, proteína citosólica ligante de calcio que reconoce distintas poblaciones en el área preóptica. Los resultados obtenidos revelaron que el anticuerpo frente a la calretinina reconoce células en el núcleo preóptico parvocelular y alguna célula en el preóptico magnocelular, sin que se observe colocalización con la Cdk2. Por tanto, los resultados obtenidos evidencian que el anticuerpo frente a la Cdk2 es un buen marcador de poblaciones del área preóptica.

Palabras clave: teleósteos, pez cebra, área preóptica, núcleo preóptico magnocelular, Cdk2, inmunohistoquímica.

Neuroanatomical study of the preoptic region in zebrafish

Summary

In order to perform a neuroanatomical study of the preoptic area, we have studied the distribution of the Protein-dependent kinase 2 (Cdk2) in the brain of zebrafish (adult and larval stages) by using immunohistochemical techniques. Furthermore, we have tested the effectiveness of anti-Cdk2 antibody as a marker for cell proliferation during larval development. Our results indicate that anti-Cdk2 antibody recognizes several populations of differentiated neurons both in the adult and larvae, particularly in the magnocellular preoptic nucleus and the cerebellum (Purkinje cells). Cdk2 immunoreactive cells (Cdk2-ir) in the magnocellular preoptic nucleus show different sizes; their axons reach mainly the neurohypophysis through the preoptic-pituitary tract. Furthermore, the antibody also recognizes glia in the adult. In addition, we compared the expression pattern of Cdk2 with that of calretinin, a calcium binding protein that recognizes different populations in the preoptic area. Our results revealed that calretinin antibody recognizes several cells in the parvocellular preoptic nucleus and some in the magnocellular preoptic nucleus; colocalization with Cdk2 was not observed. Therefore, our results show that Cdk2 antibody is a good marker for populations of the preoptic area.

Keywords: teleost, zebrafish, preoptic area, magnocellular preoptic nucleus, Cdk2, immunohistochemistry.

Índice

Introducción.....	1
1. El pez cebra como organismo modelo para el estudio del Sistema Nervioso.....	1
2. Sistema Nervioso Central de teleósteos.....	2
2.1 Región preóptica.....	2
3. Proteína Cdk2 como marcador biológico específico.....	3
Objetivos.....	5
Material y Métodos.....	6
1. Material biológico: obtención y procesamiento.....	6
2. Técnicas inmunohistoquímicas.....	6
2.1 Inmunohistoquímica con revelado enzimático para la detección de Cdk2 en secciones de encéfalo de pez cebra adulto.....	7
2.2 Doble inmunohistoquímica para Cdk2 y calretinina en secciones de encéfalo de pez cebra adulto.....	7
2.3 Inmunofluorescencia in toto con larvas de pez cebra de 5 dpf.....	8
3. Pruebas control.....	9
4. Obtención y procesamiento de las imágenes.....	9
Resultados.....	10
1. Patrón de expresión del anticuerpo Cdk2 en el encéfalo del pez cebra adulto.....	10
2. Estudio de colocalización para Cdk2 y calretinina.....	13
3. Patrón de expresión del anticuerpo Cdk2 en larvas de 5 dpf.....	14
Discusión.....	16
1. Consideraciones metodológicas.....	16
2. Núcleo preóptico magnocelular del pez cebra.....	17
3. Comparación de la región preóptica del pez cebra con otros vertebrados.....	17
Conclusiones.....	19
Agradecimientos.....	20
Bibliografía.....	21

Introducción

1. El pez cebra como organismo modelo para el estudio del Sistema Nervioso

El pez cebra (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) pertenece al género *Danio*, familia Cyprinidae, orden Cypriniformes, división Teleostei, clase Actinopterygii (Nelson, 2006). El pez cebra adulto tiene un cuerpo alargado de pequeño tamaño (5 cm como máximo), y se caracteriza por tener cinco franjas uniformes, azuladas y horizontales a cada lado del cuerpo que se extienden hasta el final de los radios de la aleta caudal (Figura 1). La aleta anal también posee unas distintivas franjas. Además, carecen de línea lateral. Las barbillas rostrales se extienden hasta el margen anterior de la órbita, y las barbillas maxilares terminan aproximadamente a la mitad del opérculo (Froese y Pauly, 2011). Son ovíparos con fecundación externa, y la puesta puede llegar a ser de hasta 300 huevos transparentes con un diámetro de 1mm aproximadamente.

El pez cebra se ha convertido en uno de los vertebrados más utilizados a la hora de hacer investigaciones sobre biología del desarrollo en los laboratorios. Esto se debe a que presenta las características necesarias para actuar como un “organismo modelo”: tiene un tamaño pequeño, es fácil de mantener, tiene un tiempo de generación corto, se puede criar en el laboratorio fácilmente y las hembras ponen muchos huevos con embriones transparentes, lo que permite observar fácilmente su desarrollo (Metscher y Ahlberg, 1999). En el laboratorio deben ser mantenidos en acuarios a una temperatura aproximada de 28,5°C y deben ser alimentados 1 o 2 veces al día (Westerfield, 2000).



Figura 1. Ejemplares de pez cebra, *Danio rerio*, donde podemos observar sus franjas azuladas horizontales a cada lado del cuerpo. Fuente: <http://www.arkive.org/zebra-danio/danio-rerio/>.

2. Sistema Nervioso Central de teleósteos

El sistema nervioso central de teleósteos está formado por el encéfalo y la médula espinal (Figura 2). En el encéfalo adulto se distinguen claramente las cinco estructuras o regiones surgidas durante la ontogenia a partir de la vesícula encefálica, y que rostro-caudalmente son: telencéfalo, diencefalo, mesencéfalo, cerebelo y bulbo raquídeo. Las dos primeras regiones encefálicas, telencéfalo y diencefalo, constituyen el cerebro anterior, mientras que el mesencéfalo y bulbo raquídeo forman el tallo o tronco cerebral. El diencefalo, considerado como un centro de interconexión entre las diferentes regiones encefálicas, se localiza entre el telencéfalo y el mesencéfalo, diferenciándose en el mismo las siguientes regiones: epitálamo, región talámica (dorsal, ventral y tubérculo posterior), pretecho, área preóptica e hipotálamo (Bergqvist, 1932; Braford y Northcutt, 1983).

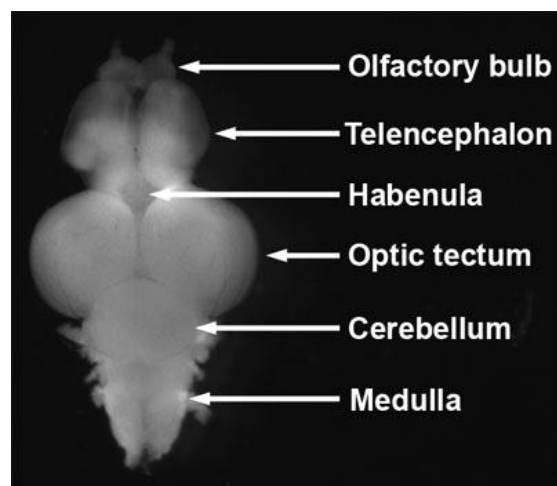


Figura 2. Visión dorsal del encéfalo aislado de un ejemplar adulto de pez cebra en el que se observa el bulbo olfatorio, el telencéfalo, la habénula, el techo óptico, el cerebelo y la médula espinal. Fuente: desconocida.

2.1 Región preóptica

La región preóptica se considera la división diencefálica más rostral, participando en el control del comportamiento sexual y la agresividad (Meek y Nieuwenhuys, 1998). Está localizada entre el quiasma óptico y la comisura anterior, y rodea el receso preóptico del ventrículo III. Esta región está fuertemente relacionada con el hipotálamo periventricular y tuberal, con el que comparte la inclusión del haz prosencefálico medial, además de la presencia de numerosas neuronas neuroendocrinas

hipofisiotróficas (Meek y Nieuwenhuys, 1998). La parte lateral de la región preóptica contiene numerosos tractos de fibras, mientras que los cuerpos neuronales se disponen próximos al ventrículo.

En la región preóptica de actinopterigios se pueden diferenciar cuatro núcleos (Braford y Northcutt, 1983; Meek y Nieuwenhuys, 1998): 1) el núcleo preóptico parvocelular anterior (localizado anteriormente al núcleo preóptico magnocelular); 2) el núcleo preóptico magnocelular (incluye la porción parvocelular, la porción magnocelular y la porción gigantocelular), 3) el núcleo preóptico parvocelular posterior (localizado caudoventralmente al núcleo preóptico magnocelular); y 4) el núcleo supraquiasmático (localizado caudoventralmente al núcleo preóptico parvocelular posterior, sobre el quiasma óptico).

El núcleo preóptico magnocelular está constituido por células neurosecretoras de gran tamaño que, entre otros, producen isotocina, vasotocina y encefalina (Meek y Nieuwenhuys, 1998). La zona ventral constituye la porción parvocelular, la parte dorsal la porción magnocelular, y la parte caudal la porción gigantocelular, que contiene las células de mayor tamaño (Braford y Northcutt, 1983). Las prolongaciones axónicas de estas neuronas constituyen el tracto preóptico-hipofisario, que recorre el suelo hipotalámico hasta alcanzar la neurohipófisis (Braford y Northcutt, 1983). Las neuronas del núcleo preóptico magnocelular no solo proyectan a la neurohipófisis, sino que también alcanzan otros territorios, como la médula espinal (Meek y Nieuwenhuys, 1998).

El área preóptica neurosecretora de los teleósteos se ha propuesto como homóloga al núcleo paraventricular de los mamíferos. Sin embargo, el núcleo paraventricular de los mamíferos está situado en un ala del hipotálamo y no en la región preóptica (Nieuwenhuys *et al.*, 2008; Herget *et al.* 2014).

3. Proteína Cdk2 como marcador biológico específico

Las quinasas dependientes de ciclinas (Cdks) son quinasas serina/treonina cuya actividad catalítica está modulada mediante interacciones con ciclinas e inhibidores de Cdks (CKIs) (Lim y Kaldis, 2013). La quinasa dependiente de ciclina-2 (Cdk2) es una proteína que participa en la regulación del ciclo celular eucariota (De Bondt *et al.*, 1993) y cuya actividad es regulada por fosforilación (Lim y Kaldis, 2013). Tiene como

función controlar las fases G1-S del ciclo celular en conjunto con las ciclinas cycE y cycA: la ciclina E se une a la Cdk2 en la fase G1 para que se produzca la transición G1/S, y posteriormente se produce la unión con la ciclina A para la progresión de la fase S (Lim y Kaldis, 2013).

La estructura de la proteína monomérica Cdk2 consta de un lóbulo N-terminal rico en β -hoja (lóbulo N), un lóbulo C-terminal rico en α -hélice (lóbulo C), y una hendidura profunda en la unión de ambos lóbulos que es el sitio de unión de ATP y la catálisis (Figura 3) (Pavletich, 1999).

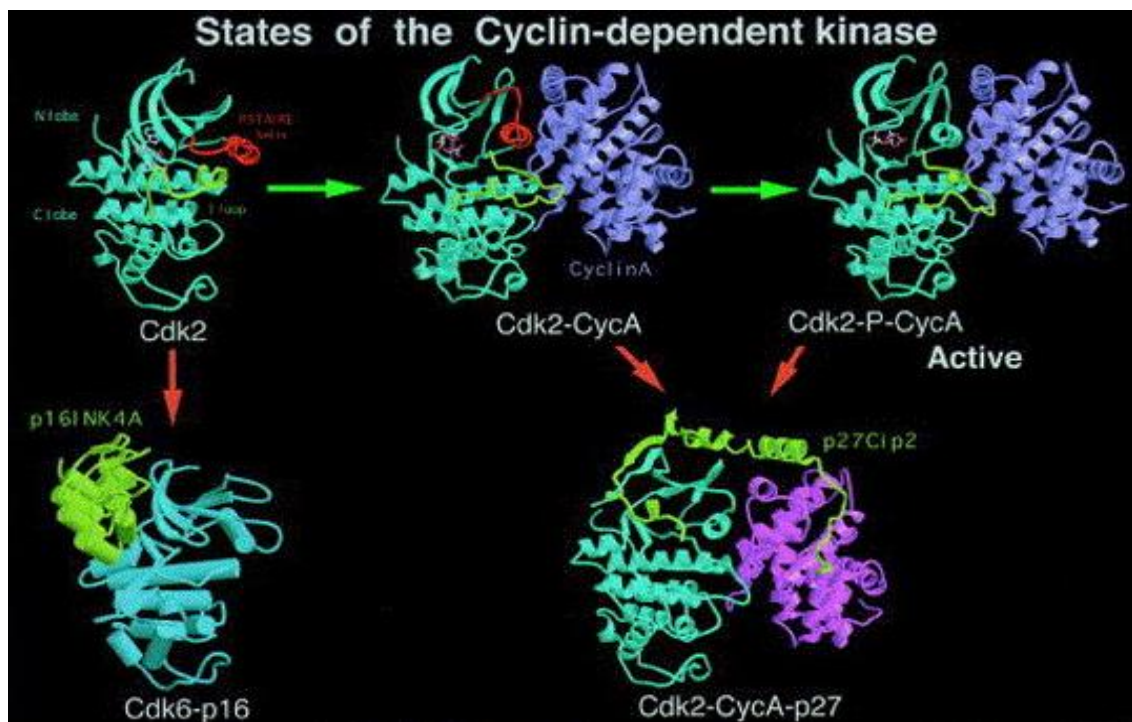


Figura 3. Estructura de la quinasa dependiente de ciclina en diferentes estados: no activada (Cdk2 monomérica), parcialmente activa (complejo Cdk2-ciclinaA), totalmente activada (complejo fosforilado Cdk2-ciclinaA), inhibida (complejo p27-Cdk2-ciclinaA), y no activable (complejo p16-Cdk6). En la estructura monomérica de Cdk2 se observan dos elementos reguladores: la hélice PSTAIRE (color rojo en la figura) y un bucle de regulación (color amarillo-verdoso). Fuente: Pavletich, 1999.

Objetivos

Resultados preliminares obtenidos en nuestro laboratorio en el adulto de pez cebra sugieren que el anticuerpo empleado en este estudio reconoce una o varias poblaciones de neuronas en el área preóptica. Esto parece indicar que el anticuerpo anti-Cdk2 no es un marcador para proliferación celular, sino un buen marcador de poblaciones del área preóptica.

El objetivo general de este trabajo consiste en realizar un estudio neuroanatómico de la región preóptica del pez cebra, tanto en estado adulto como en estados larvarios, mediante la utilización de técnicas inmunohistoquímicas empleando marcadores específicos (principalmente Cdk2, también calretinina). Se compararán los resultados obtenidos con los recogidos en la literatura, tanto en esta especie como en otros grupos de vertebrados.

Por lo tanto, los objetivos planteados son:

1. Testar el anticuerpo anti-Cdk2 como marcador de proliferación celular en etapas tempranas del desarrollo del pez cebra.
2. Estudiar la expresión del anticuerpo anti-Cdk2 tanto en el encéfalo adulto como en la larva del pez cebra mediante técnicas inmunohistoquímicas.
3. Realizar una descripción neuroanatómica detallada del área preóptica en el pez cebra.

Material y Métodos

1. Material biológico: obtención y procesamiento

Para llevar a cabo este estudio se han empleado 5 ejemplares adultos (nacidos en Julio de 2013) y 10 larvas [5 días post-fertilización (dpf)] de pez cebra, que han sido criados y mantenidos en condiciones adecuadas en el laboratorio.

Tras ser anestesiadas con metanosulfonato de triclaína (0,01% en agua dulce del acuario), las larvas fueron fijadas por inmersión en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1M pH 7,4 (TF) con sacarosa al 4%, mientras que los ejemplares adultos fueron profundizados transcárdicamente utilizando el mismo fijador (sin sacarosa).

Las cabezas de los individuos adultos se postfijaron por inmersión con paraformaldehído al 4% durante aproximadamente 20 horas a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo, las cabezas se lavaron con TF y se extrajo el encéfalo bajo un estereomicroscopio. Posteriormente se crioprotegieron en soluciones de sacarosa de concentración creciente (10%, 20% y 30%) en TF (1 hora en sacarosa 10%, 2 horas en sacarosa 20% y 18-20 horas en sacarosa 30% a 4°C).

Para proceder a su seccionado, se prepararon bloques con los encéfalos aislados en medio *OCT Compound Tissue-Tek* (Sakura) que se congelaron en 2-metilbutano (Sigma-Aldrich) enfriado en nitrógeno líquido. Los bloques se cortaron transversal o sagitalmente (14 µm de grosor) con un criostato HM500-M (Microm) y las secciones obtenidas fueron recogidas en portaobjetos gelatinizados.

2. Técnicas inmunohistoquímicas

Las técnicas inmunohistoquímicas consisten en la detección de antígenos utilizando anticuerpos específicos, revelando la unión antígeno-anticuerpo mediante algún sistema de visualización.

Para la inmunodetección de la Cdk2 se recurrió tanto a una técnica enzimática indirecta [basada en la unión específica entre la biotina y la estreptavidina acoplada a peroxidasa

de rábano (Hsu *et al.*, 1981)], como a una técnica de fluorescencia indirecta (Weller y Coons, 1954).

2.1 Inmunohistoquímica con revelado enzimático para la detección de Cdk2 en secciones de encéfalo de pez cebra adulto

Las secciones se lavaron con tampón fosfato salino 0,1M pH 7,4 (TFS) para eliminar el medio OCT (3 baños de 5 minutos cada uno), y posteriormente se trataron con borohidruro de sodio al 0,2% en agua destilada (45 minutos) para eliminar la posible autofluorescencia de los tejidos o la fluorescencia de fondo. Para bloquear las peroxidases endógenas propias de los tejidos, las secciones se trataron con peróxido de hidrógeno al 3% (en TFS, 30 minutos) y a continuación se lavaron con TFS (2 lavados de 5 minutos cada uno). Posteriormente, se incubaron con suero normal de cabra (1:100) en TFS con Triton-X100 al 0,3% (TFS-T) durante 1 hora en cámara húmeda, bloqueando de esta manera lugares inespecíficos que podrían ser reconocidos por el anticuerpo primario.

A continuación se procedió a la incubación con el anticuerpo primario; para este estudio se empleó un anticuerpo policlonal desarrollado en conejo frente a la Cdk2 (1:400; Aviva Systems Biology) en TFS-T con suero normal de cabra (1:100; Sigma-Aldrich) durante 24 horas a temperatura ambiente. Se lavaron las secciones con TFS (3 baños de 10 minutos) y se incubaron con el anticuerpo secundario cabra anti-conejo biotinilado (1:100; Dako) en TFS-T (1 hora a temperatura ambiente). Las secciones se lavaron con TFS (3 baños de 10 minutos) y se incubaron con estreptavidina unida a peroxidasa de rábano (2,5 µg/ml; Sigma-Aldrich). A continuación, las secciones se lavaron con TFS (3 baños de 10 minutos) y se incubaron con 3,3'-Diaminobencidina tetrahidrocloruro al 0,06% en TFS con peróxido de hidrógeno al 0,003%. Las secciones se lavaron de nuevo con TFS (3 baños de 10 minutos), se deshidrataron en batería de alcohol etanol de concentración creciente (80%, 96%, 100%; 5 minutos en cada uno), se aclararon en xileno y finalmente se montaron en *Eukitt*.

2.2 Doble inmunohistoquímica para Cdk2 y calretinina en secciones de encéfalo de pez cebra adulto

Las secciones se lavaron con TFS (3 baños de 5 minutos) y se trataron con borohidruro de sodio al 0,2% (30-45 minutos) para eliminar la posible autofluorescencia de los

tejidos o la fluorescencia de fondo. A continuación las secciones se lavaron con TFS (3 baños de 5 minutos) y se incubaron con suero normal de cabra (1:100; Sigma-Aldrich) en TFS-T (1 hora). Posteriormente se incubaron con una combinación de anticuerpos primarios: anticuerpo policlonal desarrollado en conejo contra la Cdk2 (1:400; Aviva Systems Biology) y anticuerpo monoclonal desarrollado en ratón anti-calretinina (1:500; Swant) en TFS-T con suero normal de cabra (1:100; Sigma-Aldrich) durante 24 horas a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron con TFS (3 baños de 10 minutos) y se incubaron con una combinación de anticuerpos secundarios: cabra anti-conejo unido a Alexa Fluor 488 (1:500; Invitrogen) y cabra anti-ratón Alexa Fluor 568 (1:500; Invitrogen) en TFS-T con suero normal de cabra (1:500; Sigma-Aldrich) durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras realizar varios lavados en TFS (3 lavados de 5 minutos), se procedió al montaje en glicerol al 50% en TF.

2.3 Inmunofluorescencia in toto con larvas de pez cebra de 5 dpf

Tras su fijación y lavados en TFS, se procedió a la disección de las larvas (eliminación de piel y ojos), para a continuación transferirlas a metanol 100% y mantenerlas a -20°C durante al menos 30 minutos. Posteriormente se procedió a la rehidratación de las larvas (metanol 50% en TFS seguido de lavado en TFS) y su tratamiento con borohidruro de sodio al 0,2% en agua destilada. Pasados 45 minutos, se realizaron 2 baños con TFS-T (5 minutos cada uno) y se procedió a la permeabilización con proteinasa K (Sigma-Aldrich) al 0,4% en TFS-T durante 20 minutos. Posteriormente se lavaron 3 veces con TFS-T y se postfijaron en paraformaldehído al 4% (20 minutos a temperatura ambiente). Se realizaron varios lavados con TFS-T (3 lavados de 5 minutos cada uno) y se procedió a la incubación con una solución de suero normal de cabra (1:100; Sigma-Aldrich) en dimetilsulfóxido al 1% en TFS-T (al menos 1 hora en agitación y a temperatura ambiente).

A continuación se incubó con el anticuerpo primario desarrollado en conejo contra la Cdk2 (1:400; Aviva Systems Biology) durante aproximadamente 20 horas a 4°C. Se procedió al lavado de las larvas con TFS-T (4 baños en agitación, 30 minutos cada uno). Posteriormente se incubaron con el anticuerpo cabra anti-conejo unido a Alexa Fluor 488 (1:500; Invitrogen) en TFS-T con suero normal de cabra (1:500; Sigma-Aldrich) durante 20 horas a 4°C. Tras realizar varios lavados en TFS (3 lavados de 5 minutos), se realizó una contratinción con el colorante nuclear Sytox Orange (1:10.000

en TFS, 15 minutos; Life Technologies), realizando posteriormente lavados en TFS (2 lavados de 20 minutos). Por último las larvas se transfirieron a glicerol 80% en TF (baños consecutivos de 25%, 50% y 80%) y se mantuvieron a 4°C en oscuridad hasta el momento de su montaje (agarosa 1% en glicerol 80%) para su observación.

3. Pruebas control

La especificidad de la inmunorreactividad se verificó mediante la omisión del anticuerpo primario durante el desarrollo del protocolo de inmunohistoquímica arriba indicado (apartado 2.1). Se apreció una ausencia total de inmunorreactividad a la Cdk2 en el cerebro del pez cebra.

4. Obtención y procesamiento de las imágenes

Las secciones se observaron y se fotografiaron con un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 90i) acoplado a una cámara digital (Olympus DP71). Los embriones se observaron y fotografiaron utilizando un microscopio de barrido láser confocal (Nikon A1R, Servicios de Apoyo a la Investigación, Universidad de A Coruña). Las fotografías obtenidas en el microscopio confocal se procesaron utilizando el paquete de análisis de imagen *Fiji*. Para el montaje de las figuras y realización de los esquemas se utilizó el software *CorelDraw Graphics Suite Version 12*.

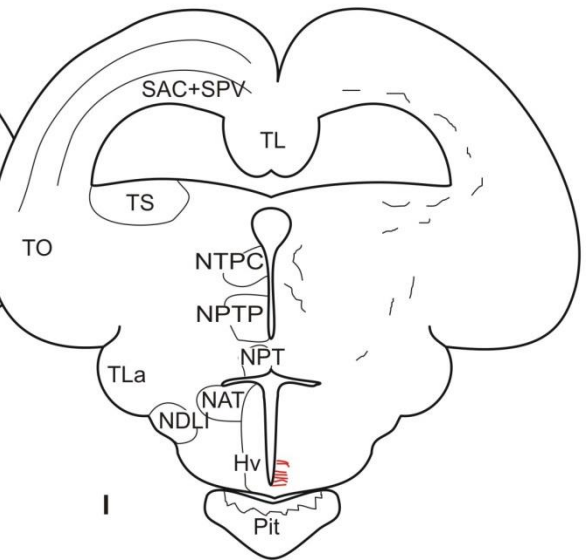
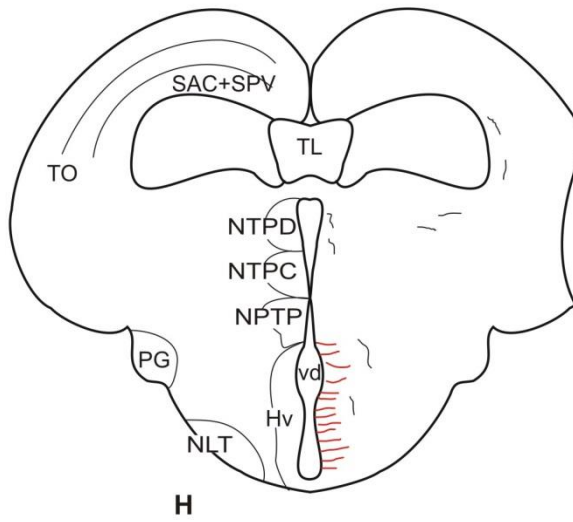
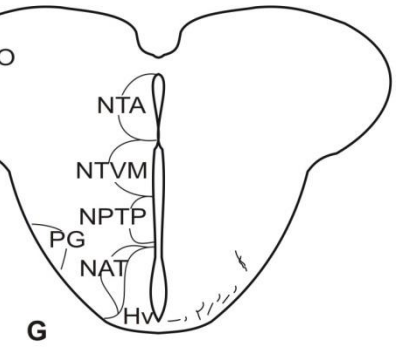
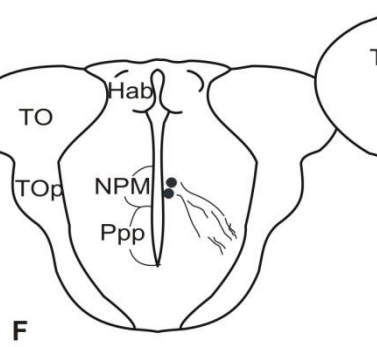
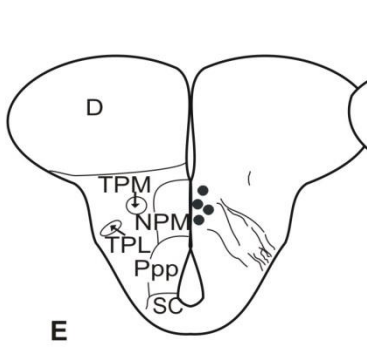
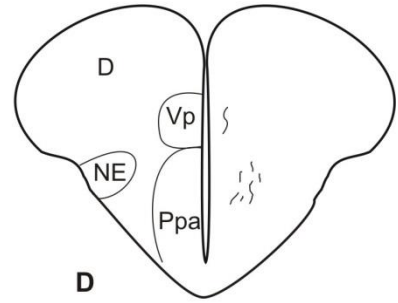
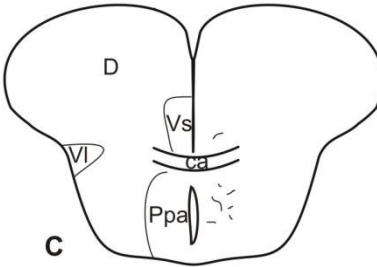
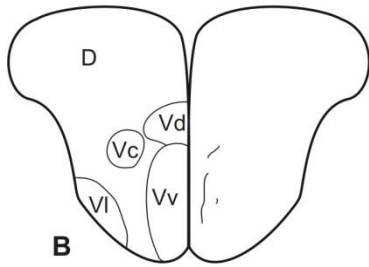
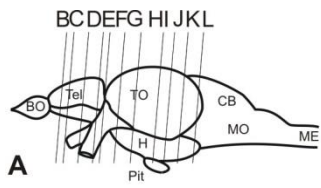
Resultados

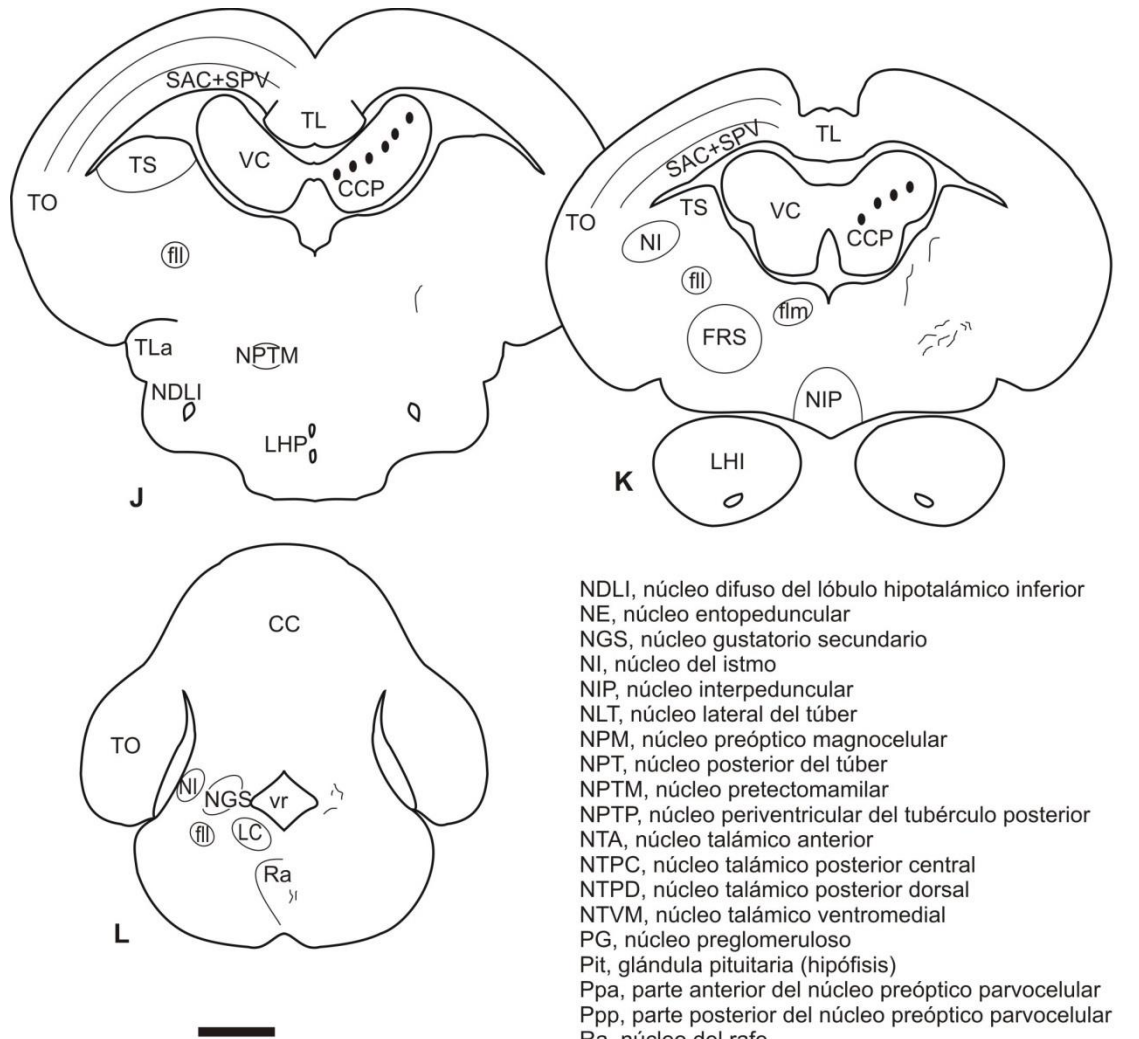
Los resultados obtenidos sugieren que el anticuerpo empleado reconoce varias poblaciones de neuronas totalmente diferenciadas en la región preóptica del encéfalo, tanto del adulto (Figuras 4, 5 y 6) como de la larva del pez cebra (Figura 7). Además, el presente estudio nos ha permitido describir ciertos aspectos de la neuroanatomía del área preóptica de esta especie, pudiendo así caracterizar los tipos celulares que conforman esta región y sus conexiones.

1. Patrón de expresión del anticuerpo Cdk2 en el encéfalo del pez cebra adulto

En el área preóptica del pez cebra se observan neuronas totalmente diferenciadas inmunorreactivas a la Cdk2 (Cdk2-ir) en el núcleo preóptico magnocelular. En secciones sagitales se puede observar la disposición del núcleo en el eje antero-posterior, presentando forma de “bumerán” (Figura 5A). Sus células muestran una morfología redondeada u ovalada y dos tamaños bien diferenciados (Figura 5): medianas, localizadas en porciones anteriores y ventrales, y grandes, en la porción caudal (Figura 5A detalle). Del cuerpo celular de dichas neuronas parte un axón que se dirige inicialmente perpendicular al ventrículo (Figura 4E-F y 5B-F), para después combarse ventralmente e integrar el tracto preóptico-hipofisario (Figura 5F), que alcanza la neurohipófisis (datos no mostrados). Algunas fibras alcanzan otros territorios encefálicos (Figura 4): el telencéfalo (subpalio), diencefalo (núcleo preóptico parvocelular, tálamo, tubérculo posterior e hipotálamo), mesencéfalo (el tegumento mesencefálico y estrato *album centrale* del techo óptico) y rombencéfalo (en el núcleo gustatorio secundario, la formación reticular superior y el rafe).

El anticuerpo empleado también revela la inmunoreactividad de células de la glía (Figuras 4H-I y 5F) en el hipotálamo ventral y de células de Purkinje tanto en la válvula como en el cuerpo cerebeloso (Figuras 4J-K y 5A). La morfología de estas células no se describe en detalle por estar fuera de los objetivos de este estudio.





- NDLI, núcleo difuso del lóbulo hipotalámico inferior
 NE, núcleo entopeduncular
 NGS, núcleo gustatorio secundario
 NI, núcleo del istmo
 NIP, núcleo interpeduncular
 NLT, núcleo lateral del túbulo
 NPM, núcleo preóptico magnocelular
 NPT, núcleo posterior del túbulo
 NPTM, núcleo pretegmentario
 NPTP, núcleo periventricular del tubérculo posterior
 NTA, núcleo talámico anterior
 NTPC, núcleo talámico posterior central
 NTPD, núcleo talámico posterior dorsal
 NTVM, núcleo talámico ventromedial
 PG, núcleo preglomeruloso
 Pit, glándula pituitaria (hipófisis)
 Ppa, parte anterior del núcleo preóptico parvocelular
 Ppp, parte posterior del núcleo preóptico parvocelular
 Ra, núcleo del rafe
 SAC, *stratum album centrale* del techo óptico
 SC, núcleo supraquiasmático
 SPV, *stratum griseum periventriculare* del techo óptico
 Tel, telencéfalo (hemisferios telencefálicos)
 TL, toro longitudinal
 TLa, toro lateral
 TO, techo óptico
 TOp, tracto óptico
 TPL, tracto prosencefálico lateral
 TPM, tracto prosencefálico medial
 TS, toro semicircular
 VC, válvula cerebelosa
 Vc, núcleo central del área ventral telencefálica
 vd, ventrículo diencefálico
 Vd, núcleo dorsal del área ventral telencefálica
 Vl, núcleo lateral del área ventral telencefálica
 Vp, núcleo postcomisural del área ventral telencefálica
 vr, ventrículo rombencefálico
 Vs, núcleo supraquisurales del área ventral telencefálica
 Vv, núcleo ventral del área ventral telencefálica

Listado de abreviaturas

- BO, bulbo olfatorio
 ca, comisura anterior
 CB, cerebelo
 CC, cuerpo cerebeloso
 CCP, capa de las células de Purkinje
 D, área dorsal telencefálica
 fil, fascículo longitudinal lateral
 flm, fascículo longitudinal medial
 FRS, formación reticular superior
 H, hipotálamo
 Hab, habénula
 Hv, hipotálamo ventral
 LC, *locus coeruleus*
 LHI, lóbulo hipotalámico inferior
 LHP, lóbulo hipotalámico posterior
 ME, médula espinal
 MO, *medulla oblongata*
 NAT, núcleo anterior del túbulo

Figura 4. Representación esquemática de secciones transversales a través del encéfalo del pez cebra adulto (*Danio rerio*), mostrando el patrón de distribución de neuronas (puntos gruesos), fibras (líneas oscuras) y células de la glía (líneas de color rojo) inmunorreactivas a la Cdk2 (B-L). En A se señala el nivel de dichas secciones. Barra de escala=660 μ m (A); 200 μ m (B-L).

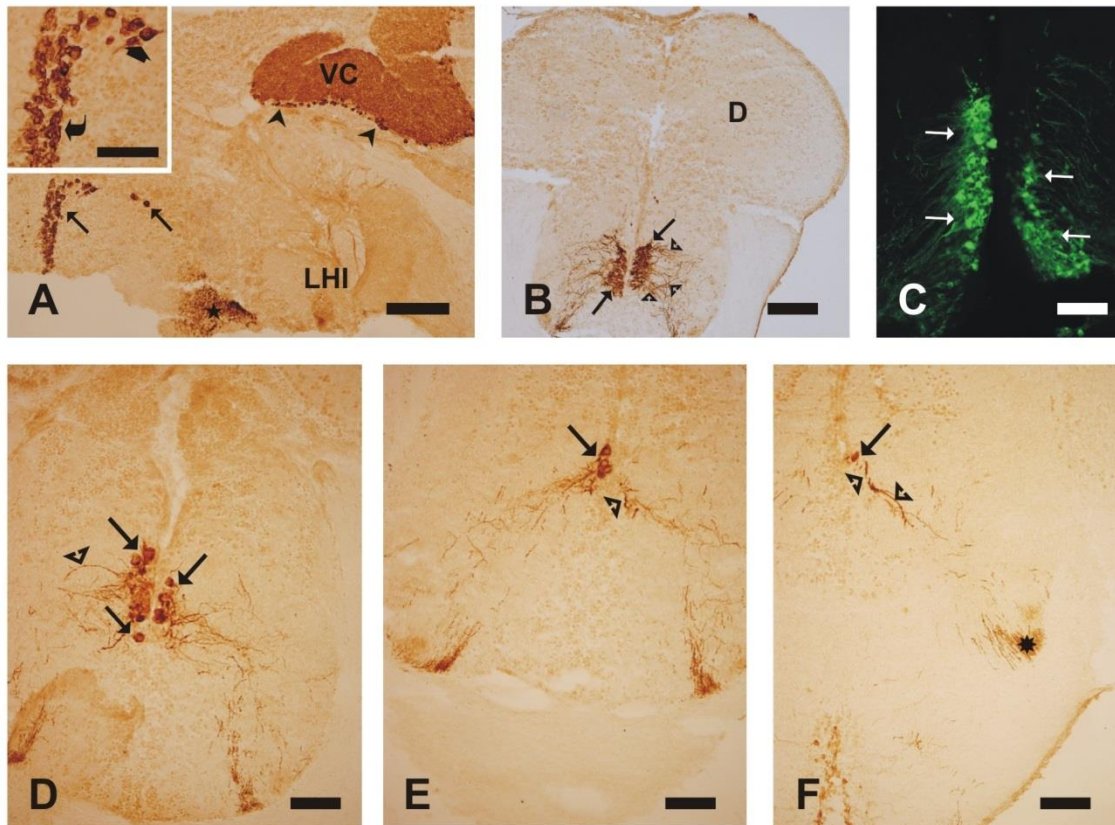


Figura 5. Estudio de la expresión de Cdk2. Fotomicrografías de secciones sagitales (A) y transversales (B-F) del encéfalo del pez cebra adulto, reveladas mediante métodos inmunoenzimáticos (A-B, D-F) e inmunofluorescentes (C). A: neuronas Cdk2-ir en el núcleo preóptico magnocelular (flechas), observándose la configuración espacial del núcleo en el eje antero-posterior y las características morfológicas de sus células. En el detalle se pueden apreciar los diferentes tamaños de células Cdk2-ir dentro de este núcleo: células Cdk2-ir de gran tamaño (flecha gruesa) y de menor tamaño (flecha curvada). A nivel caudal de la sección se observan células de Purkinje Cdk2-ir en el cerebelo (puntas de flecha). Detalle de las células del preóptico en el margen superior izquierdo, B-F: en el sentido antero-posterior, células de gran tamaño (flechas) del núcleo preóptico magnocelular que emiten fibras (puntas de flecha) que forman el tracto preóptico-hipofisario (asterisco en F) y discurren hacia la neurohipófisis (no mostrada). Hacia regiones caudales se reduce el número de células Cdk2-ir en dicho núcleo. Abreviaturas: D, área dorsal telencefálica; LHI, lóbulo hipotalámico inferior; VC, válvula cerebelosa. Barras de escala=125 μm (A), 50 μm (detalle, D-F), 75 μm (B-C).

2. Estudio de colocalización para Cdk2 y calretinina

La calretinina (Cal) es una proteína ligante de calcio que se utiliza ampliamente para estudios neuroanatómicos (Castro *et al.*, 2003, 2006). Estudios previos han mostrado la presencia de esta proteína en células del núcleo preóptico parvocelular y ciertas neuronas de la porción parvocelular del núcleo preóptico magnocelular. Los resultados obtenidos en el presente trabajo (Figura 6) revelan que aun existiendo coexpresión de ambas proteínas en el núcleo preóptico magnocelular del pez cebra (Figura 6A'' y B''), no parece existir colocalización a nivel neuronal (Figura 6B''). Se observa que las células inmunorreactivas a la calretinina presentan un soma de tamaño menor al

exhibido por las neuronas que expresan Cdk2 (Figura 6B''). Estos resultados parecen indicar que las células inmunorreactivas a la calretinina se podrían corresponder con la población parvocelular, mientras que las células Cdk2-ir podrían corresponderse con las poblaciones magnocelular y gigantocelular.

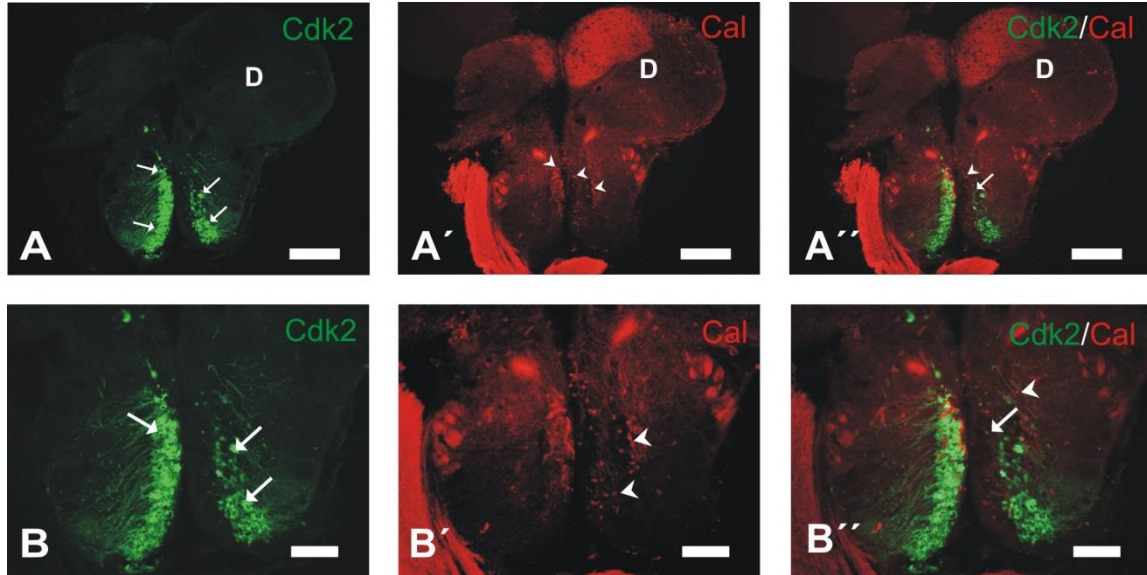


Figura 6. Estudio de colocalización de Cdk2 y Cal. Fotomicrografías de secciones transversales del encéfalo del pez cebra adulto. A-A'': expresión de Cdk2 (flechas en A), calretinina (puntas de flecha en A') y ambas sustancias (A'') en el cerebro anterior. B-B'': detalle de las neuronas del núcleo preóptico magnocelular, con neuronas de gran tamaño inmunorreactivas a la Cdk2 (flechas en B) y de menor tamaño inmunorreactivas a la calretinina (puntas de flecha en B'). En B'' se puede observar que no existe coexpresión a nivel neuronal de ambas sustancias. Abreviaturas: D, área dorsal telencefálica. Barras de escala=200 μ m (A-A''), 100 μ m (B-B'').

3. Patrón de expresión del anticuerpo Cdk2 en larvas de 5 dpf

Ya en este estadio temprano del desarrollo del pez cebra, se observa inmunoreactividad a la Cdk2 en neuronas del núcleo preóptico magnocelular (Figura 7). Los axones de estas células alcanzan la neurohipófisis (Figura 7A, A'', B, B'') a través del tracto preóptico-hipofisario primordial.

Los resultados obtenidos parecen indicar que la proteína Cdk2 no es un buen marcador de proliferación celular, ya que las células Cdk2-ir muestran características de neuronas bien diferenciadas (procesos celulares/axón conspicuos) tanto en la fase larvaria como adulta.

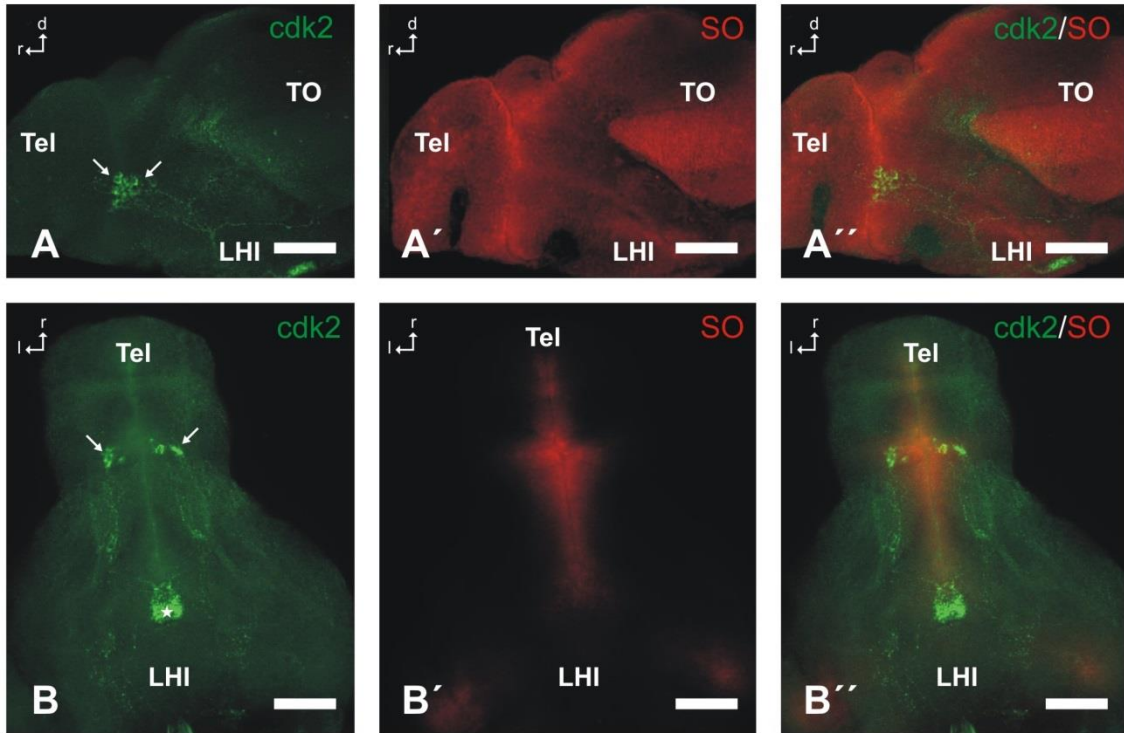


Figura 7. Expresión de la Cdk2 en larvas de pez cebra de 5dpf. Las imágenes son una proyección de varias secciones ópticas en Z obtenidas mediante microscopía de barrido confocal. A-A': visión lateral donde se observa un pequeño grupo de células diferenciadas inmunorreactivas a la Cdk2 (flechas en A) en el encéfalo de la larva contrateñido con el colorante nuclear fluorescente Sytox Orange (SO, A') para observar mejor la anatomía del encéfalo (en A'' Cdk2+Nissl mediante SO). B-B'': visión ventral en la cual se aprecia el mismo grupo neuronal Cdk2-ir (flechas en B) en el encéfalo de la larva contrateñido con el Sytox Orange (SO, B'; en B'' Cdk2+SO). Estrella en B indica la hipófisis. Abreviaturas: d, dorsal; l, lateral; LHI, lóbulo hipotalámico inferior; r, rostral; Tel, telencéfalo; TO, techo óptico. Barras de escala=50 μ m.

Discusión

1. Consideraciones metodológicas

El presente estudio confirma resultados previos obtenidos en el laboratorio de Biología Celular (comunicación personal con Dr. Antonio Castro y Dra. Mónica Folgueira). En este sentido, cabe destacar que es necesaria la utilización del borohidruro de sodio para que la técnica inmunohistoquímica realizada funcione correctamente. Este compuesto se utiliza para eliminar la posible autofluorescencia de los tejidos y la fluorescencia que aportan los fijadores que contienen aldehídos en su estructura (glutaraldehído, paraformaldehído, etc.) (Ahrens y Dudley, 2011). Además, nuestros resultados parecen mostrar que permite la “recuperación antigénica”, es decir, provoca cambios de conformación en los epítomos de manera que quedan accesibles y se puedan unir de manera específica al anticuerpo.

El anticuerpo utilizado detecta varias poblaciones de células en la región preóptica, pero no parece ser un buen marcador de proliferación celular. Esto podría deberse fundamentalmente a dos razones: a) el anticuerpo anti-Cdk2 no se está uniendo realmente a la Cdk2, o bien b) la Cdk2 tiene una función desconocida, pero no implicada directamente en el avance de la célula en el ciclo celular, lo que justificaría su presencia en neuronas totalmente diferenciadas.

Así mismo, se pudo observar que el anticuerpo reconoce poblaciones de células en otras regiones encefálicas distintas al preóptico, tales como células de la glía en el hipotálamo ventral y células de Purkinje en el cerebelo.

También se testó la efectividad del anticuerpo anti-Cdk2 en etapas larvarias del desarrollo del pez cebra, en las que los fenómenos de proliferación celular son mucho más abundantes. Sin embargo, el patrón de expresión de la Cdk2 fue igual al obtenido en el adulto, encontrándose en poblaciones de neuronas diferenciadas y no en células en proliferación.

La utilización de la calretinina como marcador complementario en nuestro estudio se justifica debido a su utilidad inmunocitoquímica para la caracterización de poblaciones

neuronales en el encéfalo de distintas especies de peces actinopterigios, tales como la trucha común (Castro *et al.*, 2003) o el pez cebra (Castro *et al.*, 2006). Además, se ha comprobado que la calretinina se expresa tempranamente en poblaciones neuronales específicas, manteniéndose esta expresión a lo largo del desarrollo y en la etapa adulta (Castro *et al.*, 2003). Es por ello que el conocimiento de estas poblaciones puede ayudar en la comparación de cerebros en desarrollo y adultos (Castro *et al.*, 2006) y, como en nuestro caso, para realizar un estudio de colocalización con la Cdk2.

2. Núcleo preóptico magnocelular del pez cebra

En la región preóptica del pez cebra se observan numerosas células Cdk2-ir en el núcleo preóptico magnocelular, tanto en la porción magnocelular como en la gigantocelular. Estas células se caracterizan por tener un gran tamaño y presentar unos axones muy largos. Además, no se observa inmunorreactividad en el núcleo parvocelular. Esta región parece expresar múltiples enzimas y sustancias neuroactivas, como la tirosina hidroxilasa (Kaslin y Panula, 2001) o ChAT (Clemente *et al.*, 2004) y la hormona liberadora de la tirotrópina (Díaz *et al.*, 2002).

Herget y colaboradores (2014) estudiaron la anatomía y el desarrollo del núcleo preóptico en la larva del pez cebra mediante el empleo de diferentes marcadores. Entre otras sustancias, estudiaron la expresión de la arginina y la oxitocina, lo cual les permitió localizar las neuronas neurosecretoras dentro del núcleo preóptico. La expresión de estos marcadores parece restringirse al núcleo preóptico magnocelular, tanto en la larva como en el adulto (Herget *et al.*, 2014), y por lo tanto, en la misma región donde se observa expresión de Cdk2. Sin embargo, la posible colocalización de estas sustancias con la Cdk2 no ha podido ser confirmada.

3. Comparación de la región preóptica del pez cebra con otros vertebrados

El núcleo preóptico magnocelular del pez cebra adulto ha sido considerado homólogo al núcleo paraventricular de los mamíferos en base a estudios realizados con varias hormonas (Forlano y Cone, 2007). Sin embargo, el núcleo paraventricular de los mamíferos está situado en un ala del hipotálamo y no en la región preóptica (Herget *et al.*, 2014). Además, esta homología no se aprecia en los estadios larvarios debido a que la diferenciación nuclear y los límites citoarquitectónicos son muy difíciles o imposibles

de identificar dado que la distribución celular y el tamaño de los somas son mucho más homogéneos en comparación con estadios juveniles más tardíos (Herget *et al.*, 2014).

La citoarquitectura del área preóptica también ha sido estudiada en los esturiones utilizando técnicas de Nissl y Bielschowsky (Rustamov, 2006). En los esturiones, pertenecientes al grupo de los actinoptergios al igual que el pez cebra, esta región se ha identificado como una de las más grandes en el diencéfalo de estos peces. En la misma, se han identificado ocho núcleos diferentes (Rustamov, 2006): núcleo preóptico microcelular anterior, núcleo supraquiasmático, núcleo preóptico accesorio, núcleo intraquiasmático, núcleo preóptico magnocelular, núcleo preóptico microcelular posterior, núcleo preóptico caudal, y núcleo entopeduncular. Este elevado grado de diferenciación de la región preóptica del esturión (Rustamov, 2006) no ha podido ser observado en el presente estudio en el pez cebra.

Conclusiones

Los resultados obtenidos han permitido establecer las siguientes conclusiones:

1. El anticuerpo anti-Cdk2 no parece ser un buen marcador de proliferación celular, ni en los adultos ni en las larvas de pez cebra, ya que las células Cdk2-ir presentan características de neuronas diferenciadas. Las dos causas que podrían explicar este fenómeno podrían ser: que el anticuerpo no se une realmente a Cdk2, o bien que, aunque sí se está uniendo, Cdk2 tendría otras funciones fuera del ciclo celular, lo que explicaría su presencia en células diferenciadas.
2. El anticuerpo anti-Cdk2 reconoce dos poblaciones de neuronas diferenciadas en el núcleo preóptico magnocelular, revelando asimismo células de la glía en el hipotálamo ventral y células de Purkinje en la válvula y en el cuerpo cerebeloso.
3. Las células Cdk2-ir detectadas en el núcleo preóptico magnocelular se caracterizan por presentar una morfología redondeada u ovalada y dos tamaños diferentes, siendo medianas en las porciones anteriores y ventrales, y grandes en la porción caudal. Los axones de estas neuronas integran el tracto preóptico-hipofisario que alcanza la neurohipófisis. Por otro lado, las células inmunorreactivas a la calretinina parecen corresponderse con la población parvocelular, presentando un soma de menor tamaño en comparación con el exhibido por las neuronas que expresan Cdk2.

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría dar las gracias en especial a mis directores del Trabajo Fin de Grado, D. Antonio Manuel Castro Castro y Dña. Mónica Folgueira Otero, por todo lo que han me han enseñado y ayudado durante estos meses de trabajo. También me gustaría dar las gracias a todo el personal del laboratorio de Biología Celular (profesores, becarios, estudiantes) tanto por su compañía dentro del laboratorio como por la ayuda prestada en todo momento.

Bibliografía

- Ahrens MJ, Dudley AT. Chemical pretreatment of growth plate cartilage increases immunofluorescence sensitivity. *J Histochem Cytochem.* 2011; 59(4):408-418.
- Bergqvist H. Zur Morphologie des Zwischenhirns bei niederen Wirbeltieren. *Acta Zool.* 1932; 13:57-304.
- Braford MR, Northcutt RG. Organization of the diencephalon and pretectum of the ray-finned fishes. En Davis RE, Northcutt RG, editors. *Fish Neurobiology. Volume 2.* Michigan: The University of Michigan Press; 1983. p. 121-24.
- Castro A, Becerra M, Manso MJ, Anadón R. Distribution and development of calretinin-like immunoreactivity in the telencephalon of the brown trout, *Salmo trutta fario*. *J Comp Neurol.* 2003; 467:254-269.
- Castro A, Becerra M, Manso MJ, Anadón R. 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. *J Comp Neurol.* 2006; 494:435-459.
- Clemente D, Porteros A, Weruaga E, Alonso JR, Arenzana FJ, Aijón J, Arévalo R. Cholinergic elements in the zebrafish central nervous system: histochemical and immunohistochemical analysis. *J Comp Neurol.* 2004; 474:75-107.
- De Bondt HL, Rosenblatt J, Jancarik J, Jones HD, Morgan DO, Kim SH. Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature.* 1993; 363:595-602.
- Díaz ML, Becerra M, Manso MJ, Anadón R. Distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH) immunoreactivity in the brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol.* 2002; 450(1):45-60.
- Forlano PM, Cone RD. Conserved neurochemical pathways involved in hypothalamic control of energy homeostasis. *J Comp Neurol.* 2007; 505:235-248.
- Froese R, Pauly D, editors. *Danio rerio* in FishBase, 2011 [citado 17 Julio 2014]. Disponible en: www.fishbase.org.

- Herget U, Wolf A, Wulliman MF, Ryu S. Molecular neuroanatomy and chemoarchitecture of the neurosecretory preoptic-hypothalamic area in zebrafish larvae. *J Comp Neurol*. 2014; 522:1542-1564.
- Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabelled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 1981; 29:577-580.
- Kaslin J, Panula P. Comparative anatomy of the histaminergic and other aminergic systems in zebrafish (*Danio rerio*). *J Comp Neurol*. 2001; 440(4):342-377.
- Lim S, Kaldis P. Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*. 2013; 140:3079-3093.
- Meek J, Nieuwenhuys R. Holostean and Teleosts. En Nieuwenhuys R, Ten Donkelaar HJ, Nicholson C, editors. *The central nervous system of vertebrates. Volume 2*. Springer; 1998. p. 898-900.
- Metscher BD, Ahlberg PE. Zebrafish in context: uses of a laboratory model in comparative studies. *Dev Biol*. 1999; 210:1-14.
- Nelson JS. *Fishes of the world*. 4th ed. Hoboken, NJ. John Wiley and Sons; 2006.
- Nieuwenhuys R, Voogd J, van Huijzen C. *The human central nervous system*. 4th ed. New York. Springer; 2008.
- Pavletich NP. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 Inhibitors. *J Mol Biol*. 1999; 287: 821-828.
- Rustamov, EK. Organization of diencephalon of the sturgeons: preoptic area. *J Evol Biochem Physiol*. 2006; 42(2):195-207.
- Weller TH, Coons AH. Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated *in vitro*. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1954; 86(4):789-794.
- Westerfield M. *The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio)*. 4th ed. Eugene, University of Oregon Press; 2000. Disponible en: <https://zfin.org/>.