



UNIVERSIDADE DA CORUÑA.

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Celular y Molecular

Área de Biología Celular

Estudio Inmunohistoquímico de la Expresión de Met/Leu encefalina en el Encéfalo del Pez Cebra

Laura Isabel Sinisterra Loaiza

Trabajo Fin de Grado

21 de Septiembre 2015

Directora: Mónica Folgueira Otero



UNIVERSIDADE DA CORUÑA.

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Celular y Molecular

Área de Biología Celular

Trabajo Fin de Grado

Estudio Inmunohistoquímico de la Expresión de Met/Leu encefalina en el Encéfalo del Pez Cebra

Trabajo de Fin de Grado que presenta la alumna Laura Isabel Sinisterra Loaiza bajo la dirección de Dra. Mónica Folgueira Otero.

A Coruña 14 de Septiembre del 2015

Fdo. Mónica Folgueira Otero.

Índice

| | |
|---|----|
| Resumen..... | 4 |
| Abstract..... | 5 |
| Introducción..... | 6 |
| 1. Met/Leu encefalina como marcador biológico | 6 |
| 2. Pez cebra como organismo modelo | 7 |
| 3. Sistema Nervioso Central del Pez Cebra | 8 |
| Objetivos | 10 |
| Material y Métodos | 11 |
| 1. Material biológico: obtención y procesamiento | 11 |
| 2. Técnicas inmunohistoquímicas: | 11 |
| 3. Observación de las muestras y procesamiento de las fotografías | 13 |
| Resultados | 14 |
| 1. Expresión de Met/Leu encefalina en el encéfalo del pez cebra | 14 |
| 2. Estudio de colocalización de Met/Leu encefalina y proteína quinasa dependiente de ciclina – 2 (Cdk2) mediante doble inmunofluorescencia | 18 |
| Conclusiones..... | 22 |
| Conclusion | 23 |
| Agradecimientos | 24 |
| Bibliografía | 25 |

Resumen

Las encefalinas son un tipo de opioides endógenos que parecen tener efectos analgésicos en el sistema nervioso central. Pese al interés del pez cebra como modelo experimental en neurociencia, la expresión de encefalinas en su sistema nervioso central prácticamente no se conoce. En el presente trabajo, hemos estudiado la expresión de Met/Leu encefalina en el encéfalo del pez cebra adulto mediante técnicas inmunohistoquímicas. Además, mediante doble inmunofluorescencia, hemos analizado la posible colocalización de la Met/Leu encefalina con la proteína quinasa dependiente de ciclina 2 (Cdk2), que es un marcador de poblaciones de la región preóptica del pez cebra. Nuestros resultados revelaron somas inmunoreactivos frente a la Met/Leu encefalina en la región preóptica de ciertos individuos de pez cebra, pero no en todos los especímenes estudiados. No hemos podido concluir si esta variabilidad se debe a las condiciones en que fueron mantenidos los peces. En todos los individuos estudiados observamos la presencia de fibras inmunoreactivas en diversas zonas del encéfalo, sobre todo en regiones anteriores del encéfalo o prosencéfalo. El estudio de doble inmunofluorescencia para Met/Leu encefalina y Cdk2 parece indicar que estos dos marcadores se expresan en poblaciones de neuronas diferentes.

Palabras claves: Met/Leu encefalina, pez cebra, inmunohistoquímicas, inmunofluorescencia

Abstract

Enkephalins are a type of endogenous opioids that seem to have analgesic effects on the central nervous system. Despite the interest of the zebrafish as a model in neuroscience, enkephalin expression in its central nervous system is almost not known. In this work, we studied the expression of Met/Leu-enkephalin in the brain of adult zebrafish by immunohistochemical techniques. We have also studied the possible colocalization of Met/Leu enkephalin with cyclin dependent kinase 2 (Cdk2), which is a marker cell populations in the preoptic area of zebrafish. Our results revealed immunoreactive somata against the Met/Leu enkephalin in the preoptic area of zebrafish in certain individuals studied but not all. We were unable to conclude whether this variability is due to the conditions in which fish were kept. In all subjects studied we observed the presence of immunoreactive fibers in various areas of the brain, especially in anterior regions or forebrain. The double immunofluorescence for Met/Leu enkephalin and Cdk2 suggests that these two markers are expressed in different populations of neurons.

Keywords: Met/Leu enkephalin, zebrafish, immunohistochemistry, immunofluorescence

Introducción

1. Met/Leu encefalina como marcador biológico

Las encefalinas son un tipo de péptidos opioides endógenos que fueron descubiertas en la década de los 70, cuando se buscaban compuestos con una función similar a la de la morfina (Purves, 2001). Existen más de 20 péptidos opioides, que se clasifican en endorfinas, encefalinas y dinorfinas. Cada una de estas clases se liberan en forma de un precursor (figura 1) que es procesado para dar distintos derivados (Álamo, 2005).

Las encefalinas derivan directamente del precursor proencefalina (figura 1), que tras ser procesada genera varias copias de Met – encefalina y una copia de Leu-encefalina (Purves, 2001; Rodríguez Díaz et al., 2011). La Met-encefalina (*Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH*) y la Leu-encefalina (*Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH*) únicamente se diferencian en el último aminoácido, metionina en un caso y leucina en el otro (Guyton y Hall, 1999; Levy *et al*, 2006), y se habla de Met/Leu encefalina para referirse en conjunto a ambas formas.

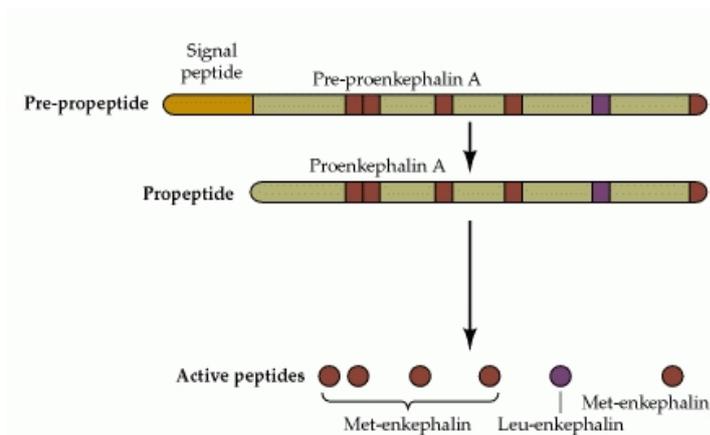


Figura 1. Procesamiento de la pre-proencefalina para la formación de Met- y Leu- encefalina. La maduración de la pre- proencefalina implica la ruptura de una secuencia señal (indicada en naranja) para generar la proencefalina. Posteriormente, el procesamiento proteolítico de dicho precursor da lugar a la formación de 5 moléculas de Met- encefalina y una de Leu- encefalina. Imagen tomada y modificada de Purves *et al.*(2001).

Los opioides endógenos son neurotransmisores que parecen tener efectos analgésicos, estando implicados en la percepción del dolor y en la respuesta al estrés (Takei *et al.*, 2006; Herget et al., 2011). De igual manera, se conoce que intervienen en procesos de tolerancia y dependencia a sustancias afines a ellos, como la morfina

(Purves, 2001). También parecen estar implicados en la regulación de las funciones respiratoria y cardiovascular, en procesos como la memoria y el aprendizaje, así como en alteraciones del sistema nervioso como la epilepsia (Escobar y Pimienta, 2006). Se ha visto que la aplicación de Met-enkefalina deprime la actividad de neuronas que están relacionadas con respuestas a estímulos nociceptivos (Levy, 2006).

2. Pez cebra como organismo modelo

El pez cebra (*Danio rerio*, familia *Cyprinidae*, orden *Cypriniformes*) es un pez teleosteo que se ha convertido en los últimos años en uno de los vertebrados más utilizados como organismo modelo (Talbot, 2000). Es una especie de pequeño tamaño cuyos individuos adultos suelen medir entre los 4 y 6 cm de largo. Presentan un cuerpo fusiforme con una única aleta dorsal (figura 2), dos pares de barbillones frontales y boca dirigida hacia arriba. En los laterales suelen presentar entre 5 y 9 franjas azuladas sobre fondo plateado, que comienzan en el opérculo y discurren longitudinalmente hasta el final de la aleta caudal (figura 2). Dichas franjas son las que dan origen al nombre común de la especie. Existe dimorfismo sexual, los machos tienen un tono dorado pálido en la parte ventral del cuerpo mientras que las hembras tienen un color más plateado. Son originarios de aguas tranquilas de Asia central, aunque también se encuentran en los ríos del norte de la India, norte de Pakistán, Nepal, Bután, Bangladesh y Myanmar (Moreno, 2013). Su reproducción es ovípara mediante fecundación externa y con un tiempo de generación corto. Una puesta puede llegar hasta los 300 huevos (Sardford, 1994). Los embriones del pez cebra son transparentes, lo que facilita la identificación y seguimiento del desarrollo de órganos.



Figura 2. Ejemplares adultos de pez cebra, donde se observa su coloración tanto en machos como en hembras y las líneas longitudinales características de la especie. (Imagen tomada de: http://vignette3.wikia.nocookie.net/reinoanimalia/images/c/c4/Pez_cebra_2.png/revision/latest?cb=20150607231442&path-prefix=es).

A mediados de los 90, el pez cebra se comenzó a utilizar como organismo modelo. Desde entonces, su utilización no ha hecho más que aumentar. Esto se debe fundamentalmente a sus características óptimas para la manipulación en el laboratorio (Maldonado, 2003): son baratos de mantener, entre otras razones debido a su pequeño tamaño. Alcanzan rápidamente la madurez sexual (3 meses tras la fertilización) y tienen numerosa prole (Rojas *et al.*, 2007). Además, en los últimos años se ha avanzado mucho en técnicas de mutagénesis, transgénesis y microscopía, convirtiendo al pez cebra en un modelo muy versátil y útil en diversas disciplinas, entre ellas la neurociencia (Nuñez, 2003).

3. Sistema Nervioso Central del Pez Cebra

El sistema nervioso central del pez cebra se divide, al igual que en el resto de vertebrados, en encéfalo y médula espinal (figura 3). A su vez, en el encéfalo se diferencian tres partes: 1) una anterior o prosencéfalo, la cual se subdivide en telencéfalo (rostral) y diencefalo (más caudal), 2) una porción media o mesencéfalo y 3) una porción posterior o rombencéfalo, que contiene el cerebelo y el bulbo raquídeo entre otras áreas (Butler, 2005; Fernadez, 2012). El telencéfalo incluye los bulbos olfativos (encargados del procesamiento de información olfativa), una porción dorsal o palio y una porción ventral o subpalio. En el diencefalo se diferencia el epitalamo, tálamo, pretecho, área preóptica e hipotálamo (Butler y Hodos 2005).

El área preóptica se sitúa alrededor del ventrículo diencefálico más rostral y puede ser subdividida en una serie de regiones o núcleos en base a la localización y tamaño de las células que lo componen. En el laboratorio de Biología Celular, Palla y colaboradores (2015) demostraron que la proteína quinasa dependiente de ciclina- 2 (Cdk2) es un buen marcador para una de las regiones del núcleo preóptico.

La expresión de las encefalinas en el sistema nervioso central del pez cebra no ha sido prácticamente estudiada. Únicamente Wullimann y colaboradores (2014) han descrito la presencia de proencefalina en la región preóptica de la larva del pez cebra.

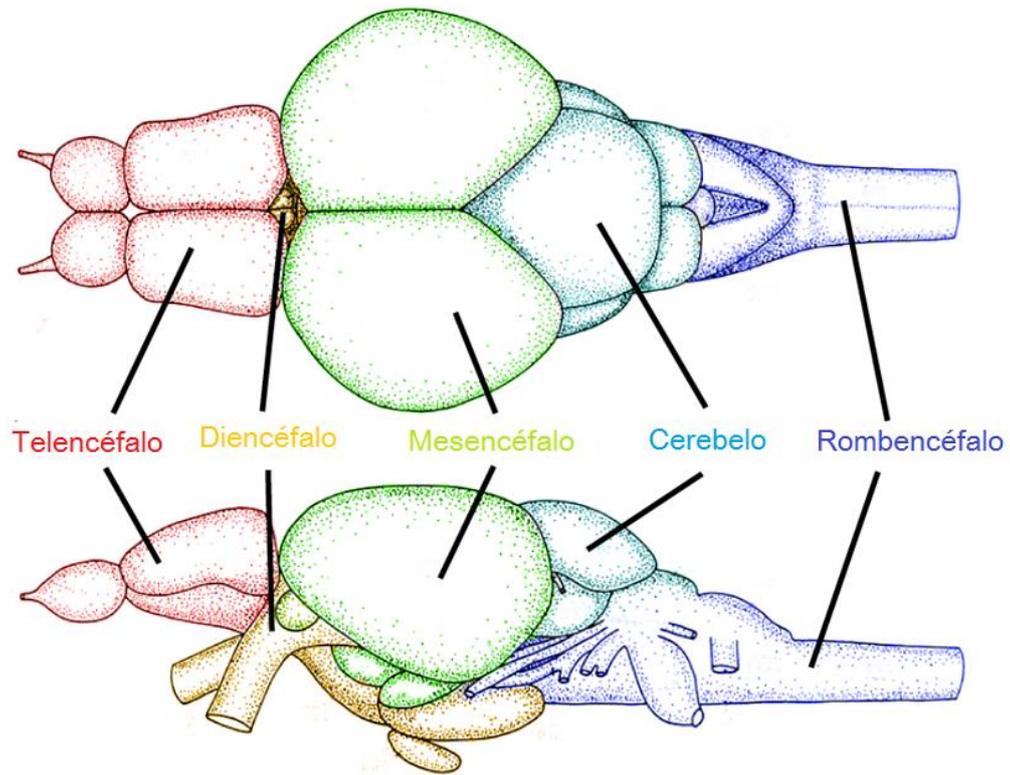


Figura 3. Vista dorsal (arriba) y lateral (abajo) de un encéfalo de de pez cebra adulto mostrando las distintas regiones que lo componen: telencéfalo, diencefalo, mesencéfalo, cerebelo y rombencéfalo. Imagen facilitada por Dr. David Raible, tomada y modificada de Wullimann *et al.* (2006).

Objetivos

Pese a la importancia de los péptidos opioides en la percepción del dolor y en otros procesos relevantes, su expresión en el sistema nervioso central del pez cebra no ha sido prácticamente estudiada. Por lo tanto, los objetivos planteados en este trabajo son:

1. Estudiar la expresión del neurotransmisor opioide Met/Leu encefalina en el encéfalo de pez cebra mediante pruebas inmunohistoquímicas.
2. Comparar la expresión de Met/Leu encefalina frente a al marcador de la región preóptica proteína quinasa dependiente de ciclina – 2 (Cdk2)

Material y Métodos

1. Material biológico: obtención y procesamiento

Para la realización de este estudio se emplearon en total 6 ejemplares adultos de pez cebra, 3 de ellos criados y mantenidos en el laboratorio de Biología Celular, siguiendo los estándares recomendados (14 horas luz /10 horas oscuridad, 28,5 °C) y los 3 restantes adquiridos en un establecimiento con venta al público.

Los ejemplares fueron anestesiados con metanosulfonato de tricaina al (0,01% en agua del acuario), a continuación fueron perfundidos transcardíacamente empleando paraformaldehído al 4%. Las cabezas de los individuos se mantuvieron en el mismo fijador durante 24 horas a temperatura ambiente.

Pasado este tiempo, se extrajo el encéfalo de cada ejemplar, trabajando bajo un estereomicroscopio. Los encéfalos se mantienen en una solución de tampón fosfato al 0,1M y pH 7,4 (TF) durante 24 horas, para eliminar los restos del fijador.

Los encéfalos se crioprotegieron en soluciones de sacarosa en concentraciones ascendentes (sacarosa al 10% durante 1 hora, al 20% durante 2 horas y al 30% durante 24 horas) a 4° C.

A continuación, se prepararon bloques que serán seccionados posteriormente. Para ello, los encéfalos aislados se impregnan en el medio *OCT Compound Tissue-Tek* y se congelan en 2-metilbutano enfriado en nitrógeno líquido. Los bloques fueron cortados transversal o longitudinalmente (12 µm de grosor) en un criostato (Microm), recogiendo las secciones en portaobjetos gelatinizados.

2. Técnicas inmunohistoquímicas:

Las técnicas inmunohistoquímicas consisten en detectar la presencia de un péptido o proteína en una célula o tejido utilizando un anticuerpo primario específico contra él. Por lo tanto estas técnicas están basadas en la unión específica antígeno – anticuerpo. Para la visualización de esta unión se utilizan diversos sistemas como la unión directa o indirecta del anticuerpo a una molécula fluorescente (inmunofluorescencia) o a enzimas que catalizan la producción de un precipitado coloreado (revelado enzimático).

En este trabajo, utilizamos un anticuerpo primario generado en ratón frente a la Met- y Leu-encefalina humana (sc-47705, de Santa Cruz Biotechnologies).

I. Inmunofluorescencia frente a met/leu - encefalina

Las secciones se lavaron con una solución de tampón fosfato salino 0,1M pH7,4 (TFS) durante 10 minutos. Posteriormente el tejido se incubó con borohidruro de sodio al 0,2 % en agua destilada durante 45 minutos para eliminar la posible autofluorescencia del propio tejido. Tras dos lavados de 10 minutos cada uno con la solución de TFS, incubamos las muestras con suero normal de cabra (1:10, Invitrogen) disuelto en TF con Tritón al 0,5% (PBST) durante 1 hora en cámara oscura y húmeda.

Posteriormente, se procedió a la incubación con el anticuerpo primario, ratón anti-Met/Leu encefalina (1:100) durante 24 horas en cámara oscura y húmeda. Transcurrido este tiempo, las secciones se lavaron dos veces durante 10 minutos con la solución de TFS y se incubaron con el anticuerpo secundario cabra anti-ratón unido a la molécula fluorescente Alexa Fluor 568 (1:500; Invitrogen). A continuación se lavaron por última vez con TFS (dos lavados de 10 minutos) y se procedió al montaje de las muestras con glicerina al 50%.

II. Inmunofluorescencia frente a Met/Leu encefalina con revelado enzimático.

Las secciones se lavaron con la solución de TFS durante 10 minutos. A continuación se incubaron con peróxido de hidrógeno al 3% durante 30 minutos. Este paso se realiza con el fin de bloquear las peroxidasas endógenas propias del tejido y que podrían generar un falso positivo. Posteriormente se realizaron dos lavados con TFS durante 10 minutos y se procedió a incubar con el suero normal de cabra (1:10, Invitrogen) durante 1 hora en cámara oscura. Seguidamente se incubó con el anticuerpo primario ratón anti Met/Leu encefalina (1:100) en TFST con suero normal de cabra (1:10), durante 24 horas en cámara oscura y húmeda.

Tras la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron dos lavados de 10 minutos y se incubó con el anticuerpo secundario cabra anti-ratón biotinilado durante 1 hora. Tras dos lavados de 10 minutos cada uno con TFS, se incubó con estreptavidina unida a peroxidasa de rábano (1:400, E2886, Sigma) durante 1 hora. Las secciones se lavan con TFS durante 10 minutos y se procede a revelar añadiendo sobre las

secciones una solución de diaminobencedina al 0,06% en TFS con peróxido de hidrógeno al 0,003%. Se para la reacción cuando se observa en las secciones la formación de un precipitado de color marrón.

Para finalizar, se realizan tres lavados de 10 minutos. Las secciones se deshidratan utilizando una batería de alcoholes etanol de concentración ascendente (80%, 96%, 100, 5 minutos en cada uno), se aclaran en Xileno (4 baños, 5 minutos) y se montan en *Eukitt* (Sigma).

III. Estudio de la colocalización de Met/Leu encefalina y proteína quinasa dependiente de ciclina – 2 (Cdk2) mediante doble inmunofluorescencia

Las secciones se someten a un primer lavado con solución de TFS. A continuación se incuban en una solución de borohidruro de sodio al 0,2 % (45 minutos). De nuevo se lavaron las muestras con TFS (2 baños de 10 minutos) y se incuban con suero normal de cabra (1:500) durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, se procede a incubar con un coctel de anticuerpos primarios: ratón anti- Met/Leu encefalina (1:100) y conejo anti- Cdk2 (1:400, ARP30331; Aviva Systems Biology) en cámara oscura y húmeda durante 24 horas. Las secciones se lavan con la solución de TFS (2 lavados de 10 minutos) y se incuban con los anticuerpos secundarios cabra anti- conejo Alexa Fluor 488 (1:500, Invitrogen) y cabra anti-catón Alexa Fluor 568 (1:500, Invitrogen). Para terminar se hace un último lavado con la solución de TFS y se procede al montaje con glicerina al 50%.

3. Observación de las muestras y procesamiento de las fotografías

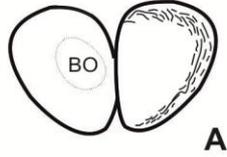
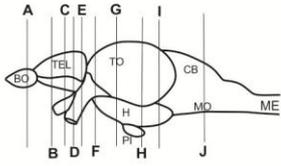
Las secciones se observaron y fotografiaron utilizando un microscopio de campo claro y fluorescencia (Nikon Eclipse 90i) el cual esta acoplado a una cámara digital (Olympus DP71). Para la realización de los esquemas y montaje de las fotografías realizadas se utilizó el software CorelDraw Graphics Suite X7.

Resultados

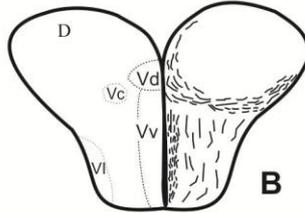
1. Expresión de Met/Leu encefalina en el encéfalo del pez cebra

Después de realizar las técnicas inmunohistoquímicas, observamos inmunoreactividad frente a la Met/Leu encefalina en fibras localizadas en distintas zonas del encéfalo. De rostral a caudal, se observan fibras dispersas en bulbo olfativo y en el palio, concentrándose más en el palio lateral, medial y ventrolateral (figura 4B). También se observaron fibras en el subpalio, fundamentalmente en el subpalio medial (figura 5C). En el diencéfalo, aparecen fibras inmunoreactivas a la Met/Leu encefalina en la región del preóptico, así como en zonas del epitálamo (habénula), del tálamo y del hipotálamo (figura 4F, 5E). En el rombencéfalo, se observan pocas fibras inmunoreactivas localizadas lateralmente al núcleo interpeduncular, en el núcleo gustatorio secundario y en la zona del rafe (figura 4L).

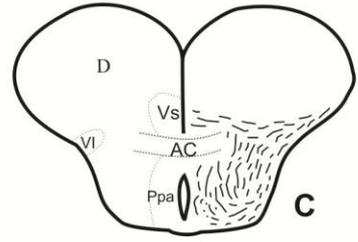
Se observan también somas inmunoreactivos frente a la Met/Leu encefalina localizados en la región preóptica (figura 4E-F, 5E-F). Pero en este caso, detectamos diferencias en función de la procedencia de los peces. Si bien se observaron dichos somas en los encéfalos que procedían de peces criados en el laboratorio, no fue así en los encéfalos que procedían de la tienda de animales. La región preóptica contiene varias poblaciones que se diferencian por el tamaño celular. Los somas detectados son relativamente grandes y con forma redonda u ovoide (figura 5F).



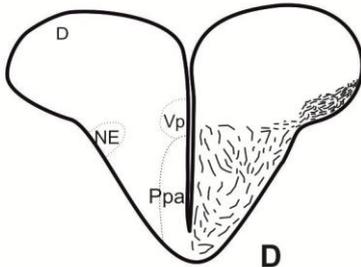
A



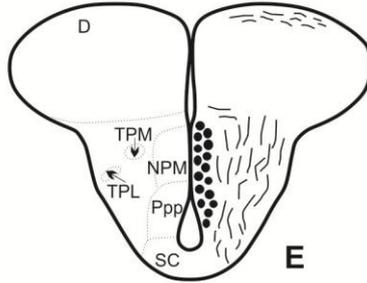
B



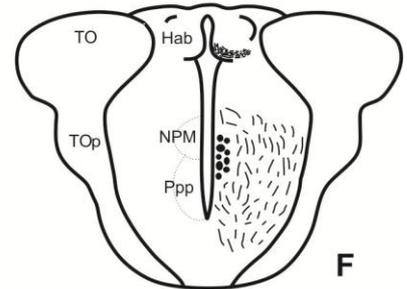
C



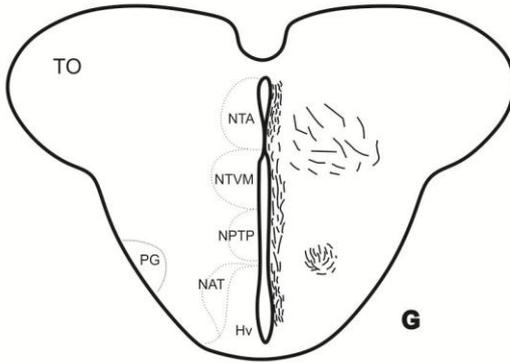
D



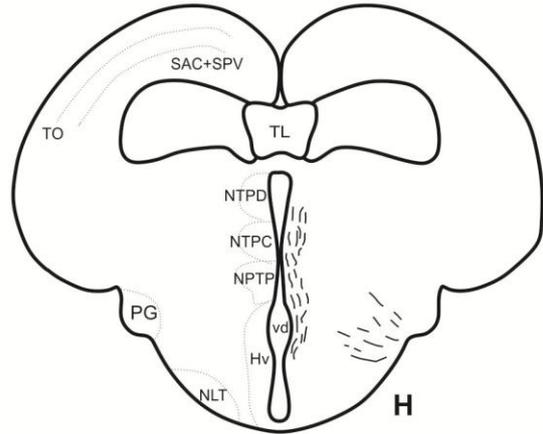
E



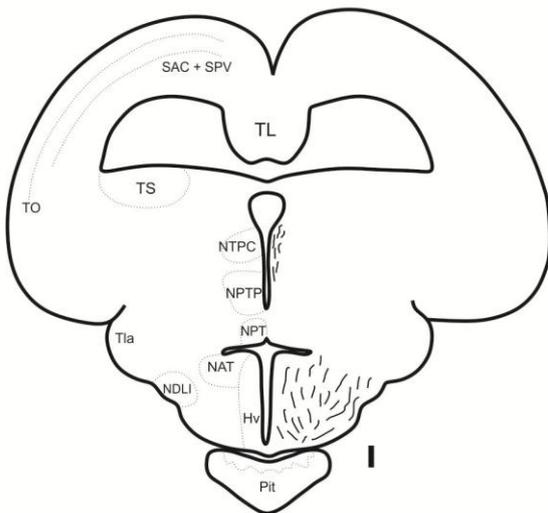
F



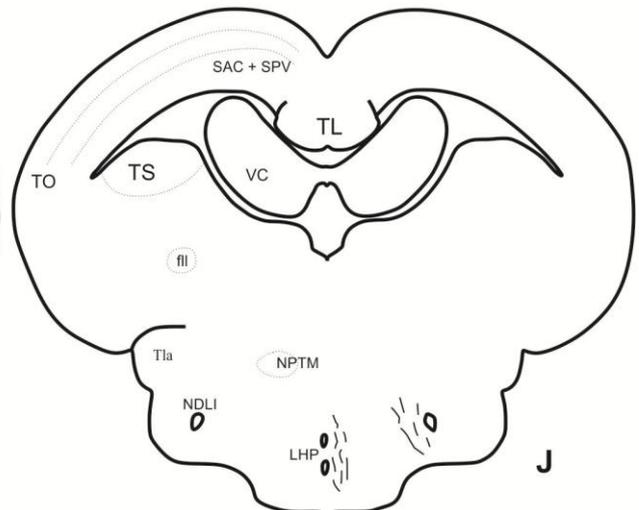
G



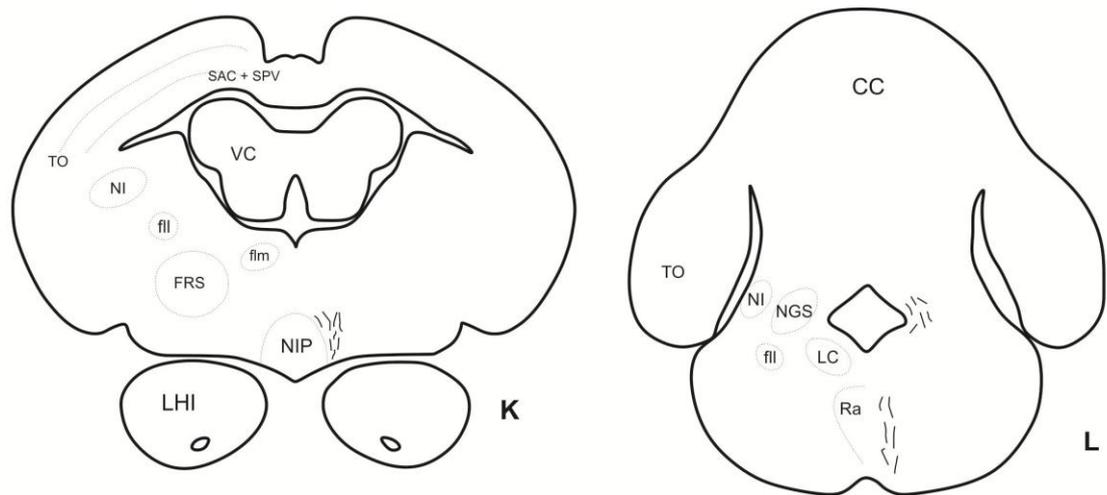
H



I



J



Listado de abreviaturas

| | |
|--|---|
| BO, bulbo olfatorio | NTPD, núcleo talámico posterior dorsal |
| ca, comisura anterior | NTVM, núcleo talámico ventromedial |
| CB, cerebelo | PG, núcleo preglomeruloso |
| CC, cuerpo cerebeloso | Pit, glándula pituitaria (hipófisis) |
| D, área dorsal telencefálica | Ppa, parte anterior del núcleo preóptico parvocelular |
| fil, fascículo longitudinal lateral | Ppp, parte posterior del núcleo preóptico parvocelular |
| flm, formación reticular superior | Ra, núcleo del rafe |
| H, hipotálamo | SAC, <i>stratum album centrale</i> del techo óptico |
| Hab, habénula | SC, núcleo supraquiasmático |
| Hv, hipotálamo ventral | SPV, <i>stratum griseum periventriculare</i> del techo óptico |
| LC, locus coeruleus | Tel, telencefalo (hemisferio telencefálicos) |
| LHI, lóbulo hipotalámico inferior | TL, toro longitudinal |
| LHP, lóbulo hipotalámico posterior | TLa, toro lateral |
| ME, medula espinal | TO, techo óptico |
| MO, medula oblongata | TOp, tracto óptico |
| NAT, núcleo anterior del túbulo | TPL tracto prosencefálico lateral |
| NDLI, núcleo difuso del loculo hipotalámico inferior | TPM, tracto prosencefálico medial |
| NE, núcleo entopeduncular | TS, toro semicircular |
| NGS, núcleo gustatorio secundario | VC, válvula cerebelosa |
| NI, núcleo del istmo | Vc, núcleo central del área ventral telencefálica |
| NIP, núcleo interpeduncular | vd, ventrículo diencefálico |
| NTL, núcleo lateral del túbulo | Vd, núcleo dorsal del área ventral telencefálica |
| NPM, núcleo preóptico magnocelular | VI, núcleo lateral del área ventral telencefálica |
| NPT, núcleo posterior del túbulo | Vp, núcleo postcomisural del área ventral telencefálica |
| NPTM, núcleo pretectomamilar | Vs, núcleo Supracomisural del área ventral telencefálica |
| NPTP, núcleo periventricular del tubérculo posterior | Vv, núcleo ventral del área ventral telencefálica |
| NTA, núcleo talámico anterior | |
| NTPC, núcleo talámico posterior central | |

Figura 4. Representación esquemática de secciones transversales de encéfalo de pez cebra adulto (*Danio rerio*), detallando el patrón de distribución de neuronas (puntos negros) y de fibras (líneas oscuras) inmunoreactivas para Met/Leu encefalina.

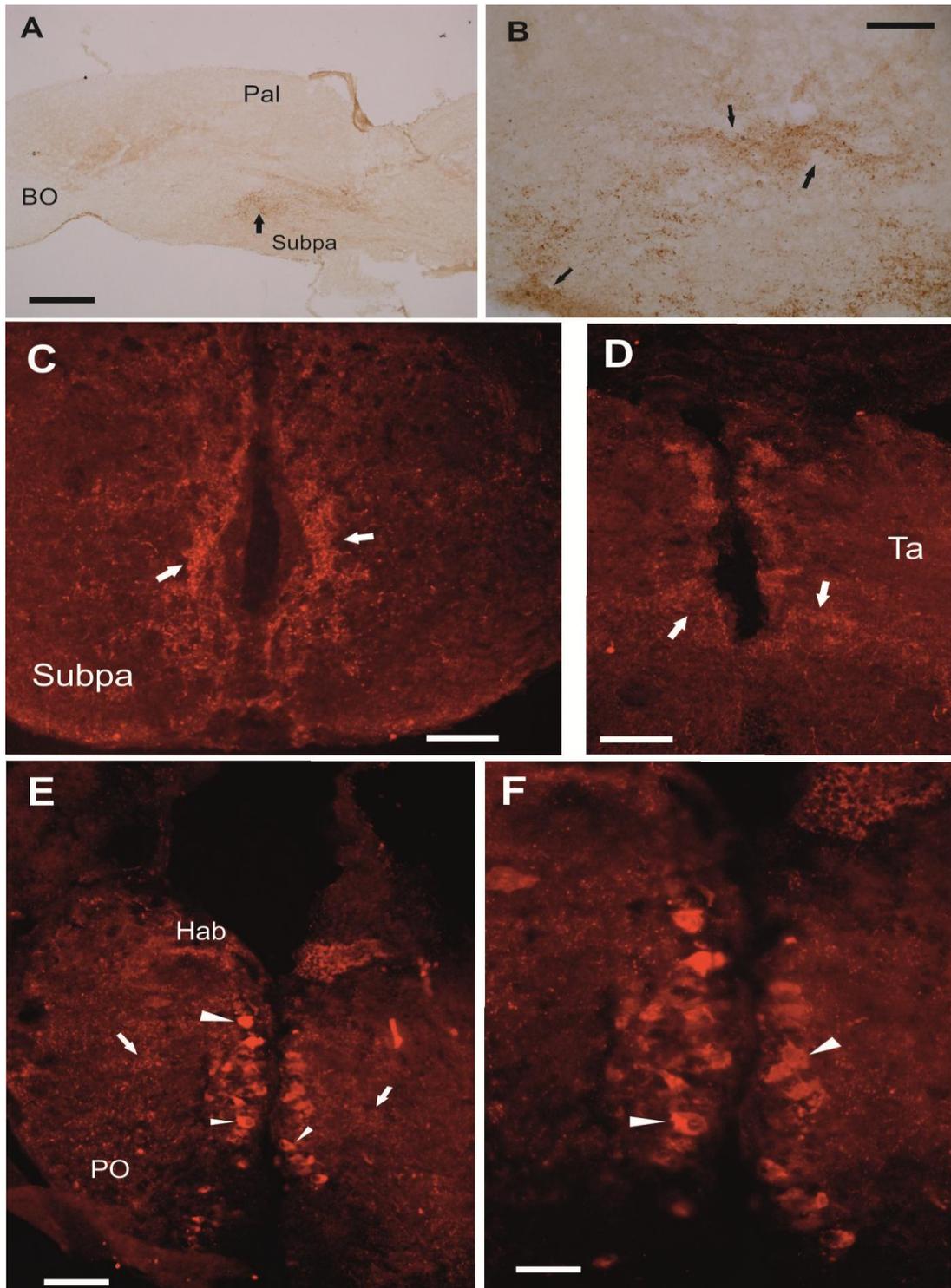


Figura 5. Estudio inmunohistoquímico de la expresión del marcador Met/Leu encefalina. Fotografías de secciones longitudinales (A-B) y transversales (C-F) del encéfalo del pez cebra adulto, reveladas mediante métodos enzimáticos (A-B) y métodos inmunofluorescentes (C-F). **A:** Acúmulo de fibras en la subpalio (flecha). **B:** Detalle del acúmulo de fibras del subpalio. **C:** Fibras en la zona media del subpalio (flechas). **D:** Fibras dispuestas en el tálamo (flecha). **E:** Somas de neuronas (cabezas de flecha) y fibras (flechas) dispuestos en la región del núcleo preóptico. **F:** Detalle de somas (cabezas de flecha) de neuronas en el preóptico. Abreviaturas: BO, bulbo olfativo; Hab, habénula; Pal, palio; PO, preóptico; Subpa, subpalio; Ta, tálamo. Barra de escala = 100 μ m (A, C, D, E), 50 μ m (B - F).

2. Estudio de colocación de Met/Leu encefalina y proteína quinasa dependiente de ciclina – 2 (Cdk2) mediante doble inmunofluorescencia

La quinasa dependiente de ciclinas - 2 (Cdk2) es una proteína esencial del ciclo celular eucariota (Li. *et al.*2015) y cuya actividad es regulada por fosforilación (Lim y Kaldis, 2013). Estudios previos realizados en el laboratorio de Biología Celular demostraron que el anticuerpo conejo anti-Cdk2 (Aviva Biosystems) es un buen marcador neuronas (tanto somas como en fibras) de la porción magnocelular núcleo preóptico del pez cebra (Palla *et al.*, 2014). Por tanto, estudiamos si la Met/Leu encefalina y la Cdk2 se localizan en las mismas estructuras.

Para realizar esta parte del estudio, utilizamos secciones de encéfalos de peces comprados en una tienda de animales (no se disponía de más peces en el laboratorio). Se observa inmunoreactividad positiva frente a la Cdk2 en somas localizados en el preóptico magnocelular (figura 6A'). No se observaron somas inmunoreactivos frente a la Met/Leu encefalina ni en el preóptico ni en otras regiones del encéfalo (figura 6A). Sí se observaron fibras inmunoreactivas para ambas moléculas, tanto la Met/Leu encefalina como la Cdk2. Sin embargo, el patrón de distribución de las fibras es en general diferente para ambas sustancias y no se observa colocación (figura 6A''). Estos resultados sugieren que ambas sustancias se expresan en poblaciones celulares diferentes.

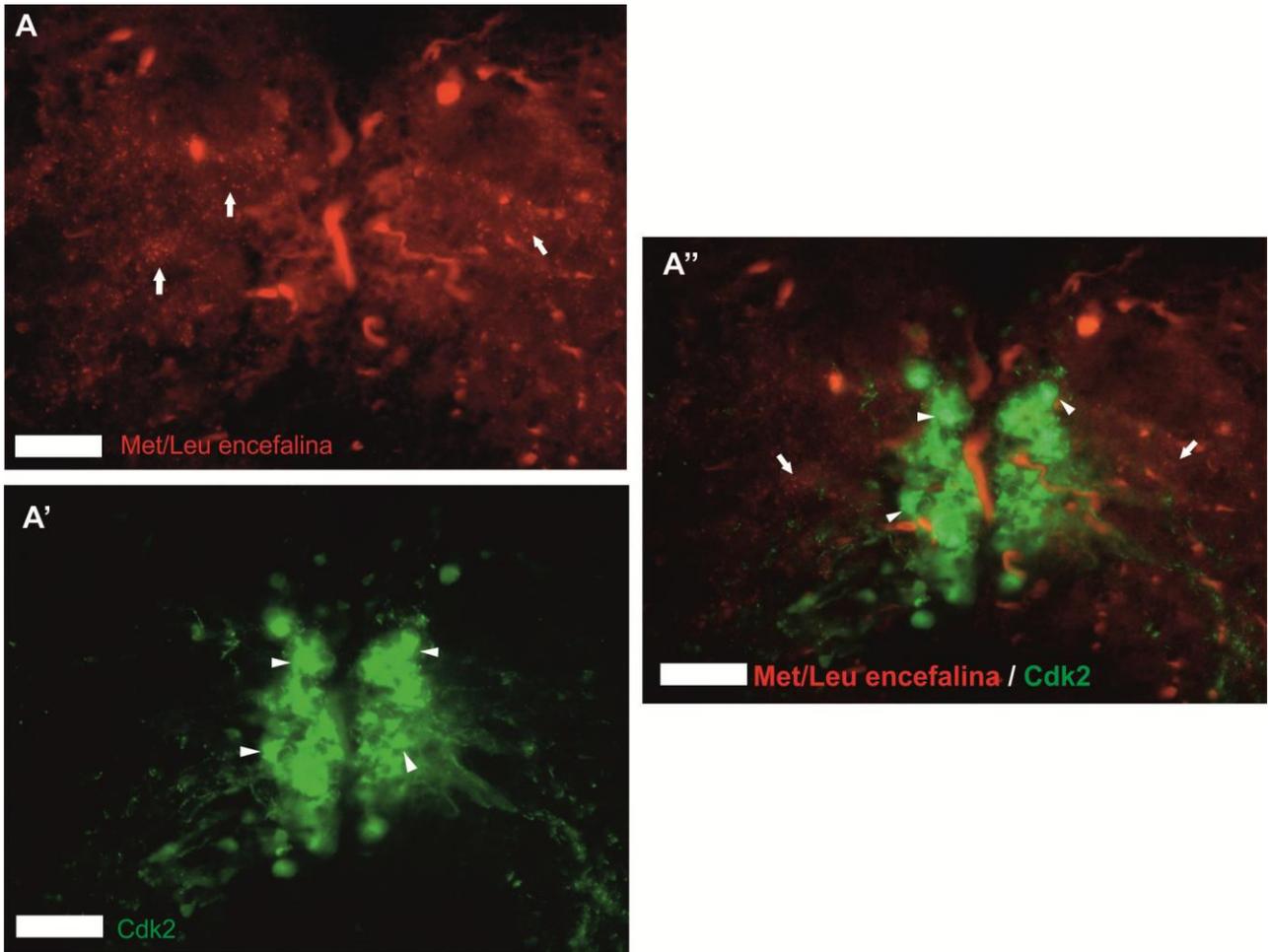


Figura 6. Estudio de colocalización de Met/leu encefalina y Cdk2. Fotografías de secciones transversales del encéfalo de pez cebra adulto. **A:** Expresión de Met/Leu encefalina, donde las flechas señalan las fibras encontradas. **A':** expresión de Cdk2 donde las cabezas de flechas señalan somas de neuronas y las flechas señalan fibras. **A'':** Fusión de los canales para la Met/Leu encefalina (rojo) y la Cdk2 (verde). Se observa que no hay colocalización de ambas sustancias. Barras de escala = 100 μ m (A- A'').

Discusión

En los últimos años, el pez cebra destaca como modelo experimental dentro del grupo de los vertebrados, siendo utilizado en numerosos estudios dentro de campos muy diversos, entre ellos la neurociencia. Sin embargo, pese a la importancia de las encefalinas en el procesamiento del dolor y otras funciones, prácticamente no existen trabajos sobre su expresión en el sistema nervioso central de dicho pez adulto. Únicamente un estudio en larvas de pez cebra ha demostrado la expresión de la proencefalina en la región preóptica medial (Wullimann *et al.*, 2013). Así mismo, un estudio realizado en larvas tardías de trucha, demostró somas inmunoreactivos a la Met encefalina también en el área preóptica, el hipotálamo y la pituitaria (Rodríguez *et al.*, 2011).

En nuestro trabajo, hemos observado somas inmunoreactivos a la Met/Leu encefalina en la región preóptica del pez cebra adulto, lo que concordaría con los resultados de otros autores (Rodríguez *et al.*, 2011; Wullimann *et al.*, 2013). Sin embargo, no observamos dichas células de forma consistente: sí se detectaron en las secciones de los encéfalos de peces criados en el laboratorio, pero no en las secciones de peces procedentes de la tienda de animales. Dado que los opioides endógenos parecen tener efectos analgésicos y que pueden estar implicados en la respuesta al estrés (Nuñez *et al.*, 2003), una hipótesis que se plantea es que pudiese existir una diferencia en el estado de los peces. Mientras que los peces procedentes del laboratorio de Biología Celular se encontraban en un ambiente controlado, desconocemos las condiciones en las que se mantenía a los peces en el establecimiento comercial. Sin embargo, para establecer alguna conclusión necesitaríamos realizar más estudios y comprobar si estos resultados se deben realmente a diferencias entre ambos peces o bien a algún problema a la hora de aplicar las técnicas inmunohistoquímicas.

Palla y colaboradores (2015) describieron el patrón de distribución de fibras que se originan en el preóptico magnocelular, pars magnocelular, en el encéfalo de pez cebra adulto utilizando el marcador Cdk2. Nuestro estudio de doble inmunofluorescencia para Met/Leu encefalina y Cdk2 no muestra colocalización de ambas moléculas en las mismas fibras, por lo que es indicativo de que Cdk2 y Met/Leu encefalina se expresa en poblaciones neuronales diferentes.

En nuestro trabajo, hemos observado fibras inmunoreactivas para la Met/Leu encefalina que alcanzan diversas regiones del encéfalo. Se detecta una mayor

densidad de fibras en la parte anterior del encéfalo, sobre todo en ciertas áreas del telencéfalo y del diencefalo, como preóptico, tálamo e hipotálamo. En general, el patrón de distribución de fibras coincide con lo observado por Rodríguez y colaboradores (2011) en larvas tardías de trucha.

En mamíferos, se ha encontrado actividad de las encefalinas en el telencéfalo ventral, donde parece que contribuyen a modular la sensación de dolor (Nuñez *et al.*, 2003). En el pez cebra también observamos expresión para Met/Leu encefalina en el telencéfalo ventral, por lo que podrían estar implicadas en la misma función en esta área.

Conclusiones

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo y de acuerdo a los objetivos planteados, se llega a las siguientes conclusiones:

1. Observamos fibras inmunoreactivas para la Met/Leu encefalina distribuidas por varias regiones del encéfalo de pez cebra adulto, sobre todo en ciertas áreas del prosencéfalo.
2. No observamos colocación de la Cdk2 y Met/Leu encefalina en el encéfalo del pez cebra adulto, lo que es indicativo de que ambas moléculas se expresan en poblaciones celulares diferentes.
3. Son necesarios más estudios para determinar si existe variabilidad en los niveles de expresión y localización de la Met/Leu encefalina en función de las condiciones en las que se mantiene a los individuos.

Conclusion

Based on the results obtained in this work and according to the planned objectives, we reach the following conclusions:

1. There are immunoreactive fibers to Met/ Leu enkephalin spread over various regions of the brain of adult zebrafish, especially in certain areas of the forebrain.
2. We did not observe colocalization of Cdk2 and Met/ Leu enkephalin in the brain of adult zebrafish, which is indicative that both molecules are expressed in different cell populations.
3. Further studies are necessary to determine if there is variability in expression levels and location of Met / Leu enkephalin depending on the conditions in which fish are maintained.

Agradecimientos

En primer lugar y especialmente, me gustaría dar las gracias a mi tutora de Trabajo de fin de Grado Dra. Mónica Folgueira Otero, por todo lo que me ha enseñado y ayudado durante este proceso. Y a todas las personas del laboratorio de Biología Celular que de un modo u otro prestaron ayuda y compañía durante el estudio.

También darles las gracias a mis padres, hermanas y familiares que me apoyaron durante todo la carrera de Biología y especialmente por motivarme para concluir esta etapa de la vida.

Bibliografía

- Álamo C; Cuenca E; Guerra JA; López-Muñoz F; Zaragoza F. (2005). Guía farmacología de analgésicos. Arán, Pag 19 – 20.
- Butler A; William H. (2005). Comparative Vertebrate Neuroanatomy. Second edition. Wiley. P 63 – 66.
- Escobar MI; Pimienta HJ. (2006). Sistema nervioso. Universidad del Valle, programa editorial. P: 183 – 184.
- Gonzales FG. (1999). Neuroendocrinología. Endocrinología y Metabolismo. 4 (2). P: 57-82.
- Guyton AC; Hall JE. (1999). Sensaciones somáticas: II. Dolor, cefalea y sensaciones de temperatura en tratado de fisiología medica. La habana: ciencias médicas. P: 666
- Haines DE. (2004). Principios de neurociencias. Madrid: Elsiver. P: 480.
- Li Y; Zhang J; Gao W; Zhang L; Pan Y; Zhang S; Wang Y. (2015). Insights on Structural Characteristics and Ligand Binding Mechanisms of CDK2. Int J Mol Sci. 24;169314-40.
- Lim S; Kaldis P. (2013). Cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. Development.; 140:3079-3093.
- Levy MN; Koeppen BM; Stanton BA. (2006). Principies of Physiology, cuarta edición. Elsevier. P: 53.
- Maceo PO; Ramos GK (2003). Sistemas opiáceos endógenos: encefalina y endorfinas. Multimed; 7 (2).
- Maldonado E. (2003). Experimentación en el pez cebra. Un modelo de Biología del Desarrollo. Mensaje bioquímico. Vol XXVII. México.
- Moreno FM. (2013). Mantenimiento en el laboratorio del pez cebra (*Danio rerio*). Universidad del país Vasco.
- Núñez GV; Gonzáles SR; Rodriguez RE. (2003). Characterization of zebrafish proenkephalin reveals novel opioid sequences. Molecular Brain Research. Vol 114 N° 1. P 31 – 39.
- Palla PS; Castro CA; Folgueira OM. (2014). Estudio neuroanatómico de la región preóptica en el pez cebra. Trabajo fin de grado. Universidad de la Coruña.
- Rojas-Muñoz A.; Bernad MA; Izpisúa BJ(2007). El pez cebra, versatilidad al servicio de la biomedicina. Investigación y Ciencia. P: 62 – 69.
- Sardford G. (1994). Guía completa para identificar escoger y mantener especies de aguas dulces y marinas. Quintet Publishing Limited. P: 37 – 38.
- Takei Y; Ando H; Tsutsui K. (2006). Handbok of hormones, comparative endocrinology for basic and clinical research. The japan sociely for Comparative endocrinology. P: 55 – 57.

Talbot WS; Hopkins N. (2000). Zebrafish mutations and functional analysis of the vertebrate genome. *Genes Dev.* 14 (7); P: 755 – 62.

Wulliman MF; Rupp B; Reichert H. (1996). Neuroanatomy of the zebra brain: a topological atlas. Berlin: Birkhäuser. P: 19.

Wullimann MF; Herget U; Wolf A; Ryu S. (2014). Molecular Neuroanatomy and Chemoarchitecture of the Neurosecretory Preoptic-Hypothalamic Area in Zebrafish Larve. *The Journal of Comparative Neurology: Research in Systems Neuroscience* 522:1542.