



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias
Departamento de Biología
Área de Biología Celular

Trabajo de Fin de Grado

Estudio de la expresión de la proteína Hu en el telencéfalo del pez cebra adulto
(*Danio rerio*)

Estudo da expresión da proteína Hu no telencéfalo do peixe cebra adulto (*Danio rerio*)

Study of the expression of Hu protein in the telencephalon of adult zebrafish (*Danio rerio*)



Antía Vázquez Araújo

Septiembre, 2019

Director Académico: Dr. Ibán Lamas Criado

Codirector: Dra. M^ª Luz Díaz Prado

Facultad de Ciencias
Departamento de Biología
Área de Biología Celular

Estudio de la expresión de la proteína Hu en el telencéfalo del pez cebra adulto (*Danio rerio*)

Estudo da expresión da proteína Hu no telencéfalo do peixe cebra adulto (*Danio rerio*)

Study of the expression of Hu protein in the telencephalon of adult zebrafish (*Danio rerio*)

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

Fdo. Ibán Lamas Criado

Fdo. M^a Luz Díaz Prado

A Coruña, 16 de Septiembre de 2019

ÍNDICE

Resumen	1
1. Introducción	2
1.1 Anatomía externa y fisiología del pez cebra.....	2
1.2 Sistema Nervioso Central: telencéfalo	3
1.3 Técnicas inmunohistoquímicas.....	6
1.4 Proteínas y anticuerpos Hu.....	7
2. Objetivos	8
3. Material y métodos	9
3.1 Procesamiento de las muestras.....	9
3.2 Bloques de Parafina.....	9
3.3 Bloques de Tissue Tek.....	10
3.4 Inmunodetección mediante enzimas: técnica de la inmunoperoxidasa.....	11
3.5 Inmunodetección mediante fluorocromos.....	12
3.6 Procesamiento de las imágenes.....	12
4. Resultados	13
5. Discusión	19
6. Conclusiones	22
ANEXO	24
7. Bibliografía	25

RESUMEN

En este trabajo se ha estudiado la expresión de la proteína HuC/D en el telencéfalo del pez cebra (*Danio rerio*) mediante el empleo de técnicas inmunohistoquímicas y de inmunofluorescencia. Estas técnicas han permitido observar una extensión generalizada de la proteína en la región telencefálica de dicho teleosteo; así como una variación en su densidad, dependiendo de la posición de las poblaciones neuronales.

Palabras clave: *Danio rerio*, proteína Hu, telencéfalo, técnicas inmunohistoquímicas, inmunofluorescencia.

RESUMO

Neste traballo estodiouse a expresión da proteína HuC/D no telencéfalo do peixe cebra (*Danio rerio*) mediante o emprego de técnicas inmunohistoquímicas e de inmunofluorescencia. Estas técnicas permitiron observar unha extensión xeralizada da proteína na rexión telencefálica do devantido teleosteo; así como unha variación na súa densidade, dependendo da posición das poboacións neuronais.

Palabras crave: *Danio rerio*, proteína Hu, telencéfalo, técnicas inmunohistoquímicas, inmunofluorescencia.

SUMMARY

In this work, the expression of the HuC/D protein in the zebrafish (*Danio rerio*) telencephalon was studied by using immunohistochemical and immunofluorescence techniques. These techniques have allowed to observe a widespread extent of the protein in the telencephalic region of said teleost; as well as a variation in its density, depending on the position of the neuronal populations.

Key words: *Danio rerio*, Hu protein, telencephalon, immunohistochemical techniques, immunofluorescence.

1. Introducción

1.1 Anatomía externa y fisiología del pez cebra

El pez cebra (*Danio rerio*) es una especie que pertenece al filo Chordata, subfilo Craniata, superclase Gnathostomata, clase Actinopterygii, subclase Neopterygii, división Teleostei, superorden Ostariophysi, orden Cypriniformes, superfamilia Cyprinoidea, familia Cyprinidae, subfamilia Danioninae y género *Danio* (Nelson, 2006).

Su distribución comprende el sur y este de Asia (Pakistán, Birmania, India y Nepal) (Figura 1). Suelen habitar lagos poco profundos, estanques y, por lo general, en lugares abiertos con agua relativamente clara y abundante vegetación en los márgenes (Spence *et al.* 2006).



Figura 1. Hábitat natural del pez cebra (*Danio rerio*). Comprende regiones del sur-este de Asia como Pakistán, Birmania, India y Nepal. Fuente: Kalueff *et al.* 2013.

Rara vez supera los 40mm de longitud, desde la boca hasta la aleta caudal. Presentan una forma fusiforme y el cuerpo está comprimido lateralmente. Poseen dos pares de barbos sensoriales y de 5 a 7 franjas longitudinales de color azul oscuro que se extienden desde el opérculo hasta la aleta caudal (Figura 2). La aleta anal también muestra unas franjas similares, mientras que la aleta dorsal tiene un borde superior de color azul oscuro, bordeado de blanco (Spence *et al.* 2008).

Se trata de un animal omnívoro que se alimenta de larvas de mosquito y de otras especies de insectos (zooplancton) y también de algas microscópicas (fitoplancton) (<http://seresmodelicos.csic.es/peix.html>. Última consulta: 02/04/2019).



Figura 2. Pez cebra (*Danio rerio*). Fuente: <http://seresmodelicos.csic.es/galeria/peix.html>. Última consulta: 02/04/2019.

En condiciones naturales la época de apareamiento se produce entre abril y agosto. Es una especie ovípara y la puesta de huevos ocurre en los márgenes de los ríos. Los huevos suelen eclosionar a los tres días de producirse la fertilización y, a los cinco o seis meses, los individuos llegan a la madurez reproductiva. En el laboratorio, las hembras pueden poner entre 200 y 300 huevos, el desarrollo embrionario tiene lugar en 24 horas y las larvas empiezan a alimentarse independientemente a los cinco días. (<http://seresmodelicos.csic.es/peix.html>. Última consulta: 02/04/2019).

El pez cebra se ha convertido en un organismo modelo en campos como farmacología (neurofarmacología), biología del desarrollo, neurofisiología y biomedicina. Ello se debe a su pequeño tamaño, la facilidad de crianza y mantenimiento, ya que su ciclo de vida es corto y las puestas se componen de cientos de huevos, que son ópticamente transparentes (Losada *et al.* 2012). Las hembras pueden aparearse cada 2-3 días y la fertilización es externa, por lo que los embriones vivos pueden ser manipulados a lo largo del desarrollo (Spence *et al.* 2008). Además, su utilidad en la neurociencia ha aumentado en los últimos años debido a su homología genética, fisiológica y en la morfología del Sistema Nervioso Central con los seres humanos (Kalueff *et al.* 2013).

1.2 Sistema Nervioso Central: Telencéfalo

El Sistema Nervioso Central está compuesto por el encéfalo y la médula espinal, ambos originados a partir de la diferenciación del tubo neural. A partir de la diferenciación de la parte anterior de éste surgen 3 vesículas encefálicas primarias: prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. A partir del prosencéfalo se diferencian dos regiones, que son el **telencéfalo** y el diencéfalo. El telencéfalo (Figura 3), objeto del presente estudio,

constituye la región más rostral del encéfalo, incluye la corteza cerebral y se encuentra dividido en dos hemisferios. El diencefalo se sitúa entre el telencéfalo y el mesencéfalo, en este último se encuentra el techo óptico. El rombencéfalo es la región más caudal del encéfalo y contiene el bulbo raquídeo, el cerebelo y el puente troncoencefálico, este último conecta el bulbo raquídeo y la médula espinal con estructuras superiores del encéfalo (Butler & Hodos, 2005).

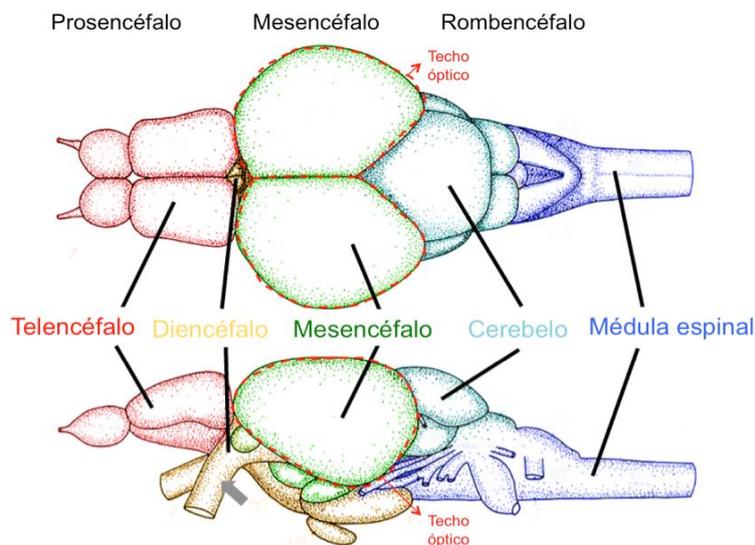


Figura 3. Vista dorsal y lateral de un encéfalo de pez cebra (*Danio rerio*), donde se muestra la morfología del encéfalo y algunas de sus regiones (de rostral a caudal): telencéfalo y diencefalo (ambas subdivisiones del prosencéfalo), mesencéfalo, cerebelo (parte del rombencéfalo) y médula espinal. Imagen cedida por Dr. Raible y a su vez adaptada de Wullimann *et al.* (1996).

El **telencéfalo** se asocia principalmente con el procesamiento de estímulos olfatorios (Rincón *et al.* 2016). El nervio olfatorio se extiende desde las fosas nasales hasta el telencéfalo. Su componente más rostral son los **bulbos olfatorios**, que se comunican con el resto del telencéfalo por las vías olfatorias mediales y laterales. Cada bulbo olfatorio está compuesto por cuatro láminas que están dispuestas concéntricamente. El resto del telencéfalo se divide en las **áreas telencefálicas ventrales y dorsales**, cada una de las cuales contiene varios núcleos neuronales y comisuras. En el centro del mismo se encuentra el ventrículo telencefálico (Holden *et al.* 2012).

-Bulbos olfatorios

Los bulbos olfatorios forman un par de protuberancias rostroventrales adyacentes al telencéfalo y están interconectadas mediante los tractos olfatorios medial y lateral. El tracto olfatorio lateral (LOT) penetra en la zona dorsal del telencéfalo, mientras que el

tracto olfatorio medial (MOT) penetra en el área ventral del mismo. Cada bulbo está formado por 4 láminas, concéntricas, nombradas desde la periferia: capa fibrosa (POF; presente solo en la parte rostroventral de los bulbos), capa glomerular (GL), capa celular externa (ECL) y capa celular interna (ICL) (Wullimann *et al.* 1996).

Los bulbos reciben y procesan señales de las narinas a través de los nervios olfatorios estando más desarrollados en peces que cazan por el olor como los mixinos (Obando *et al.* 2013).

-Área ventral telencefálica

El área ventral (V) se diferencia en núcleos localizados periventricularmente que están en contacto con el revestimiento endodimario medio del ventrículo. Distinguimos los núcleos dorsal (Vd), ventral (Vv), supracomisural (Vs) y postcomisural (Vp), Además de núcleos que han migrado desde el epéndimo: núcleo central (Vc), lateral (VI), endopeduncular dorsal (ENd) y entopeduncular ventral (ENv). Vd y Vv se encuentran en posición dorsal con respecto a la comisura anterior. Vd es contiguo caudalmente con Vs, que a su vez es contiguo con Vp (Wullimann *et al.* 1996).

En la zona rostral, el núcleo migrado del área ventral incluye Vc y VI. Mientras que el Vc se encuentra lateral a Vd, VI ha migrado a la periferia del encéfalo. Distinguimos una región neuropilar de células dispersas entre VI y Vd / Vv (Wullimann *et al.* 1996).

En la zona caudal del telencéfalo, el núcleo lateral del área ventral es reemplazado por un grupo de células entopedunculares. Estas forman bandas ventrales y dorsales de células empaquetadas a nivel de la comisura anterior. Mientras que la banda dorsal de las células entopedunculares desaparece más rostralmente, la banda ventral ubicada alrededor del haz lateral anterior se extiende hacia la región preóptica. ENd puede ser homólogo al núcleo intermedio del área ventral de otras especies, aunque no se observa una similitud morfológica con Vp, que es característico de otros teleósteos, en el pez cebra (Wullimann *et al.* 1996).

-Área dorsal telencefálica

Dorsalmente al área ventral telencefálica se encuentran las grandes masas celulares del área dorsal telencefálica (D). El revestimiento endodimario del ventrículo mediano no apareado (TelV) se extiende dorsalmente a Vd en la zona medial del área telencefálica dorsal (Dm) y se ubica en la periferia telencefálica. Una delgada tela corioidea que cubre la mayor parte de D encierra los ventrículos telencefálicos pareados (Wullimann *et al.* 1996).

A lo largo del eje anteroposterior del área dorsal distinguimos 4 masas celulares que rodean a una zona central (Dc): zona medial (Dm), dorsal (Dd), lateral (Dl) y posterior (Dp). El *Nucleus taeniae* (NT) se encuentra inmediatamente ventral a Dp. En las zonas más rostrales, así como en las más caudales del telencéfalo de pez cebra, las zonas mediales y laterales del área dorsal se fusionan sin un límite aparente (Wullimann *et al.* 1996).

Esta especie, al ser un pez actinoptergio, poseen un telencéfalo evertido dando lugar a hemisferios telencefálicos macizos; sin embargo, la mayoría de los vertebrados posee hemisferios telencefálicos tubulares originados por un proceso de evaginación (Nieuwenhuys *et al.* 1998).

1.3 Técnicas inmunohistoquímicas:

Las técnicas inmunohistoquímicas permiten la detección y la localización de un determinado antígeno tanto en órganos como *in situ* en secciones de tejido (caso del presente trabajo) mediante el uso de anticuerpos que se unen de forma específica a ese antígeno (Paz, 2015).

Estas técnicas pueden dividirse en dos tipos (Figura 4):

-Métodos directos: se usa un antisuero primario específico y marcado frente al antígeno a detectar y localizar.

-Métodos indirectos: se usa un anticuerpo primario que después es detectado por un anticuerpo secundario marcado, que es el caso de este estudio.

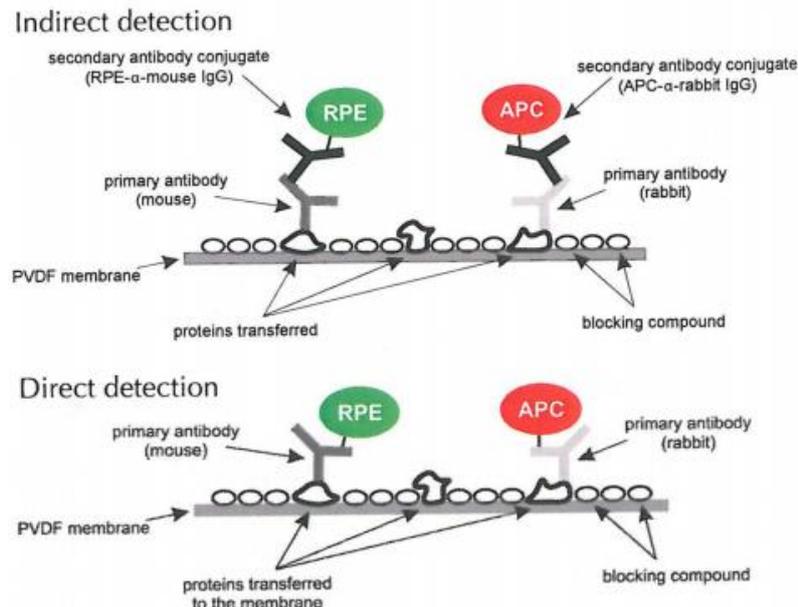


Figura 4. Técnicas inmunohistoquímicas para la detección y la localización de un determinado antígeno. En la parte superior de la imagen vemos el método indirecto y en la parte inferior, el método directo. Fuente: <http://www.ecogen.com/upfiles/A56009.pdf> (Última consulta: 04/04/2019).

Asimismo, como se indica en el Trabajo Fin de Grado de Paz (2015), *Estudio de la proliferación celular en el rombencéfalo y en la médula espinal del pez cebra adulto (Danio rerio)*, distinguimos varias técnicas de inmunodetección en función del marcador utilizado, pero las más utilizadas son las siguientes:

-Enzimas (método indirecto): las más usadas son la peroxidasa (HRP) y la fosfatasa alcalina. La HRP fue usada en este estudio combinada con el método de revelado del peróxido de hidrógeno-diaminobencidina (DAB). Esta técnica será explicada con más detalle en el apartado “Material y métodos”.

-Fluorocromos: que se conjugan con los anticuerpos primarios (método directo) o secundarios (método indirecto) y constituyen las llamadas técnicas de inmunofluorescencia. Su visualización requiere de un microscopio de epifluorescencia. Este método será explicado con más detalle en “Material y métodos”.

1.4 Proteínas y anticuerpos Hu

Las proteínas Hu son una familia de proteínas de unión al ARN que fueron detectadas por primera vez como dianas de autoanticuerpos en pacientes con encefalomielitis paraneoplásica. Estas proteínas son homólogos de ELAV (embryonic lethal abnormal vision), una proteína de unión al ARN en *Drosophila* (Perrone-Bizzozero & Bird, 2013).

Existen 4 proteínas Hu (HuR, HuB (a.k.a.Hel-N1), HuC y HuD), de las cuales 3 (HuB, HuC y HuD) son expresadas en neuronas, mientras que HuR se expresa de forma ubicua en todos los tejidos. Contienen tres dominios de unión al ARN (RBD), una región de 80 aminoácidos altamente conservada. Los RBD 1 y 2 en las proteínas Hu se unen a elementos ricos en AU que se encuentran en las 3'UTR de varios ARNm inestables que están involucrados en el crecimiento y la diferenciación celular. Estudios recientes indican que las proteínas Hu participan en varios aspectos de la regulación del ARNm, desde el procesamiento y la estabilidad del ARNm hasta la traducción (Perrone-Bizzozero & Bird, 2013).

Estas proteínas juegan un papel importante en el desarrollo del Sistema Nervioso. Se trata de uno de los primeros marcadores expresados en las neuronas. HuR está implicada en la proliferación celular y se encuentra en el núcleo. La expresión de HuD coincide con las primeras etapas de la diferenciación neuronal y se mantiene a través de la maduración de las neuronas. Diferentes estudios han demostrado que la sobreexpresión de HuB, HuC o HuD aumenta la tasa de diferenciación neuronal, así como un descenso en la expresión de las mismas lleva a la no producción de neuritas (prolongaciones de los somas neuronales) (Perrone-Bizzozero & Bird, 2013).

HuD y otras proteínas Hu participan en los mecanismos de plasticidad sináptica en el Sistema Nervioso Central, así como promueven la regeneración de los nervios periféricos. Además, se cree que HuD está implicada en trastornos neurodegenerativos (Carrasco *et al.* 2014) como la enfermedad de Parkinson y el Alzheimer, ya que esta proteína está asociada a la apoptosis de las neuronas dopaminérgicas, que mueren en la enfermedad de Parkinson y a la muerte neuronal en general (Perrone-Bizzozero & Bird, 2013).

Para este trabajo se ha usado el anticuerpo anti-HuC/D para la localización de las zonas que expresen Hu.

2. Objetivos

El análisis del encéfalo en teleósteos ha protagonizado numerosos estudios evolutivos, morfológicos, etc, debido a la elevada diversidad filogenética y adaptabilidad funcional, así como un alto grado de diversidad morfológica. En concreto el pez cebra (*Danio rerio*) se ha convertido en un organismo modelo para numerosos campos de investigación.

Los objetivos de este trabajo fueron los siguientes:

- Estudiar la presencia/ausencia de poblaciones neuronales inmunorreactivas a la proteína HuC/D en el telencéfalo del pez cebra adulto.
- Estudiar topográficamente las poblaciones neuronales inmunorreactivas a la HuC/D en el telencéfalo del pez cebra adulto, *Danio rerio*.

3. Material y métodos

3.1 Procesamiento de las muestras

Para este trabajo se emplearon 8 individuos adultos de pez cebra (*Danio rerio*).

Tras anestésarlos con metanosulfonato de 3-aminobenzoato de etilo (A5040-25G, Sigma-Aldrich), los peces fueron perfundidos transcárdialmente con el fijador Paraformaldehído al 4% en tampón fosfato, con el fin de reemplazar el líquido sanguíneo y así mantener la mayor proporción posible de células inalteradas como su estado *in vivo*. Tras la perfusión, se les cortó la cabeza, y éstas fueron introducidas en el mismo fijador durante 20-24 horas. Después de este tiempo, el encéfalo fue extraído de la mitad de las cabezas (Figura 5), ya que serán incluidos en Tissue Tek (4583, Sakura). Las cabezas restantes se mantuvieron enteras para ser incluidas en Parafina (36114-4V, VWR Chemicals).



Figura 5. Fotografía del proceso de extracción del encéfalo del pez cebra (*Danio rerio*).

3.2 Bloques de Parafina

Las cabezas deben ser deshidratadas con el fin de eliminar toda el agua posible de los tejidos. Fueron introducidas en baños sucesivos de etanol (80%, 96%, 100%) durante 40-60 minutos dependiendo del tamaño de las mismas y dos baños en Xileno (I y II) de 20 minutos cada uno. Tras la deshidratación fueron introducidas en 3 baños de Parafina, para eliminar el Xileno y que el tejido se impregne de parafina, en la estufa a 60 grados centígrados. El primer baño fue de 6 horas, el segundo, durante toda la noche y el tercero, durante un par de horas.

Para la preparación de los bloques, se colocan unos moldes sobre una placa calefactora, ya que la Parafina solidifica a temperatura ambiente. Colocando la cabeza con la boca

hacia abajo, en posición vertical, se coloca el soporte donde irá el bloque fijado y se añade un poco de Parafina encima para asegurar la correcta colocación del bloque. Se deja enfriar.

Estos bloques fueron cortados en el microtomo de rotación (Figura 6) a 12 μm . Los sucesivos cortes se disponen sobre un portaobjetos gelatinizado con ayuda de un pincel con unas gotas de agua, y este a su vez se sitúa en una placa calefactora para evaporar dicha agua. Una vez dispuestos en los portaobjetos, los cortes son llevados a una estufa de 37°C con el fin de eliminar toda el agua.



Figura 6. Fotografía de un microtomo de rotación. Fuente: <https://www.leicabiosystems.com/es/equipo-histologia/microtomos/histocore-biocut/> (Última consulta 26/07/2019).

3.3 Bloques de Tissue Tek

Previamente a comenzar con la preparación del bloque, los encéfalos fueron lavados 2 veces en tampón fosfato 0.1 M pH 7.4 (PB) durante 30 minutos.

Estos encéfalos deben ser crioprottegidos con el fin de evitar la formación de cristales de hielo que podrían dañar los tejidos. Por lo que, tras los lavados, los cerebros fueron introducidos en soluciones de Sacarosa en PB en concentración creciente (al 10% durante 2-4 horas, al 20% durante 4 horas y al 30% durante toda la noche). Posteriormente, los encéfalos se introducen en una solución al 50% de Tissue Tek y 50% de sacarosa (al 30% en PB) durante 3-4 horas.

En un molde con Tissue Tek se coloca el encéfalo orientado hacia un punto previamente dibujado en el molde. En un recipiente vertemos 2-metilbutano al 99% (1264700010, Acros organics) y colocamos el molde en el interior del mismo, lo que facilitará que este se congele de forma homogénea desde el exterior al interior. Posteriormente colocamos el recipiente en un cubículo de poliespán y vertemos nitrógeno líquido. Así el bloque queda totalmente congelado y homogéneo.

Estos bloques serán cortados en secciones transversales de 12 μm de grosor, con la ayuda de un criostato (Figura 7). Las secciones obtenidas se recogieron en portaobjetos

previamente gelatinizados. Una vez finalizado el proceso, los portaobjetos se mantienen en la nevera.



Figura 7. Fotografía de un criostato. Fuente: https://kalstein.eu/p211/Cryostat-Microtome/product_info.html (Última consulta 26/07/2019).

3.4 Inmunodetección mediante enzimas: técnica de la inmunoperoxidasa

Los portaobjetos de las secciones incluidas en Parafina fueron introducidos en sucesivos baños de Xileno y de alcoholes de concentración decreciente con el fin de rehidratarlos (al inverso que el procedimiento anterior). Se sometieron a dos lavados con tampón fosfato salino 0,01M pH 7.4 (PBS) de 10 minutos de duración cada uno. Posteriormente se lleva a cabo una recuperación antigénica en tampón ácido cítrico-citrato sódico 0,1M y pH 6 en baño termostático a 95°C durante 30 minutos. Tras este tiempo, se atempera. Y se someten a dos lavados en PBS para eliminar el tampón. Después se somete a un tratamiento con peróxido de hidrógeno al 3% en PBS durante 30 minutos, este reaccionará con la DAB añadida más adelante formando un precipitado de color marrón. Este tratamiento fue llevado a cabo con el fin de eliminar la peroxidasa endógena del tejido para que no existan falsos positivos. Se realiza un lavado en PBS y otro en PBS-T (PBS con Tritón x-100 al 0,01%) que permeabiliza las membranas celulares facilitando la penetración de los diferentes reactivos utilizados al interior celular. Incubamos una hora en suero normal de cabra (NGS) diluido (1:10) en PBS. Finalmente incubamos con el anticuerpo primario de ratón anti-proteína neuronal humana HuC/D (A21271, Invitrogen), que se encuentra a una dilución 1:500 en PBS, se dejará toda la noche a temperatura ambiente en cámara húmeda.

Al día siguiente se realiza un lavado en PBS durante 10 minutos y otro en PBS-T durante el mismo tiempo. Posteriormente se incubaba en anticuerpo secundario diluido (1:100) en PBS, inmunoglobulina de cabra anti-ratón marcada con peroxidasa de rábano GAM-HRP (A0168-1 mL, Sigma-Aldrich) durante 1 hora, a temperatura ambiente y en cámara

húmeda. Realizamos dos lavados en PBS de 10 minutos cada uno. Incubamos con una solución de diaminobencidina (DAB, D5637-56, Sigma-Aldrich) al 0,06% en PBS y peróxido de hidrógeno al 0,005%. Esperamos 2-3 minutos hasta que se forma el precipitado marrón. Posteriormente realizamos 2 lavados en PBS durante 10 minutos. Finalmente deshidratamos en sucesivos baños de etanol en concentración creciente (80°, 96°, 100° I, 100° II) durante 5 minutos cada uno y aclaramos en Xileno I, II, III, 5 minutos cada baño.

Montamos los portaobjetos procedentes del Xileno III. Colocamos el cubreobjetos sobre los portas aplicando un medio de montaje denominado Eukitt y dejamos secar en estufa a 36°C durante 24 horas.

3.5 Inmunodetección mediante fluorocromos

Los cortes incluidos en Tissue Tek fueron introducidos en dos baños sucesivos de PBS durante 10 minutos. Posteriormente se lleva a cabo la recuperación antigénica con tampón ácido cítrico-citrato sódico (pH 6), con el fin de hacer visibles los lugares de unión del antígeno para unirse con el anticuerpo, durante 30 minutos a 95°C. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se realizan 3 baños sucesivos de 5 minutos en PBS. Después se introducen en una solución de Borohidruro de sodio 0,1M durante 30 minutos, con el fin de eliminar la posible autofluorescencia endógena. Tras esto, las secciones se sumergen en un baño de PBS durante 10 minutos, seguido de otro de PBS-T durante el mismo tiempo. Finalmente se dejan incubando con NGS una hora a temperatura ambiente y, trascurrido este tiempo, se incuban con el anticuerpo primario anti-HuC/D durante toda la noche.

Al día siguiente, los cortes se sumergen en un baño de PBS y en otro de PBS-T, ambos durante 10 minutos. Posteriormente son incubados con el anticuerpo secundario inmunoglobulina de cabra anti-ratón conjugada con fluoresceína (GAM-FITC; F2761, Invitrogen) durante una hora, en cámara húmeda y oscuridad. Para finalizar son introducidos en dos baños de PBS consecutivos de 10 minutos y se montan los portaobjetos con glicerol. Los cortes se mantendrán en la nevera y protegidos de la luz.

3.6 Procesamiento de imágenes

Las muestras con DAB y con fluoresceína se visualizaron a través de un microscopio óptico de epifluorescencia (Nikon eclipse 90i) y se fotografiaron con una cámara digital (Olympus DP71) acoplada al microscopio. El procesamiento de las imágenes se llevó a cabo mediante el programa CorelDraw X8.

4. Resultados

En este trabajo se ha estudiado la expresión de la proteína HuC/D en el telencéfalo del pez cebra adulto (*Danio rerio*). Como ya se ha mencionado, se localiza en los somas de todas las neuronas. Este estudio se ha llevado a cabo mediante técnicas inmunohistoquímicas, que permiten dicha detección *in situ*, en concreto mediante 2 métodos indirectos: técnica de la inmunoperoxidasa (Figura 9) e inmunodetección mediante fluorocromos (Figura 10).

En el telencéfalo, hemos podido observar resultados positivos en varios núcleos del área telencefálica dorsal (palio) y ventral (subpalio), así como en los bulbos olfatorios. Lo que indica una presencia generalizada de la misma en dicha región del encéfalo de *Danio rerio*, (Figuras 9 y 10); sin embargo, no todos los núcleos expresaron la proteína HuC/D con la misma densidad (Figura 8).

Listado de abreviaturas					
Bulbos olfatorios		Área telencefálica ventral (V)		Área telencefálica dorsal (D)	
LOT	Tracto olfatorio lateral	Vd	Núcleo ventral dorsal	TeIV	Ventrículo telencefálico medial no pareado
MOT	Tracto olfatorio medial	Vv	Núcleo ventral	Dm	Núcleo dorsal medial
POF	Capa fibrosa	Vs	Núcleo ventral supracomisural	Dd	Núcleo dorsal
GL	Capa glomerular	Vp	Núcleo ventral postcomisural	DI	Núcleo dorsal lateral
ECL	Capa celular externa	Vc	Núcleo ventral central	Dc	Núcleo dorsal central
ICL	Capa celular interna	VI	Núcleo ventral lateral	NT	<i>Nucleus taeniae</i>
		ENd	Núcleo endopeduncular dorsal	Dp	Núcleo dorsal posterior
		ENv	Núcleo endopeduncular ventral		

Tabla 1. Listado de abreviaturas de las diferentes partes del telencéfalo del pez cebra *Danio rerio* (Wullimann *et al.* 1996).

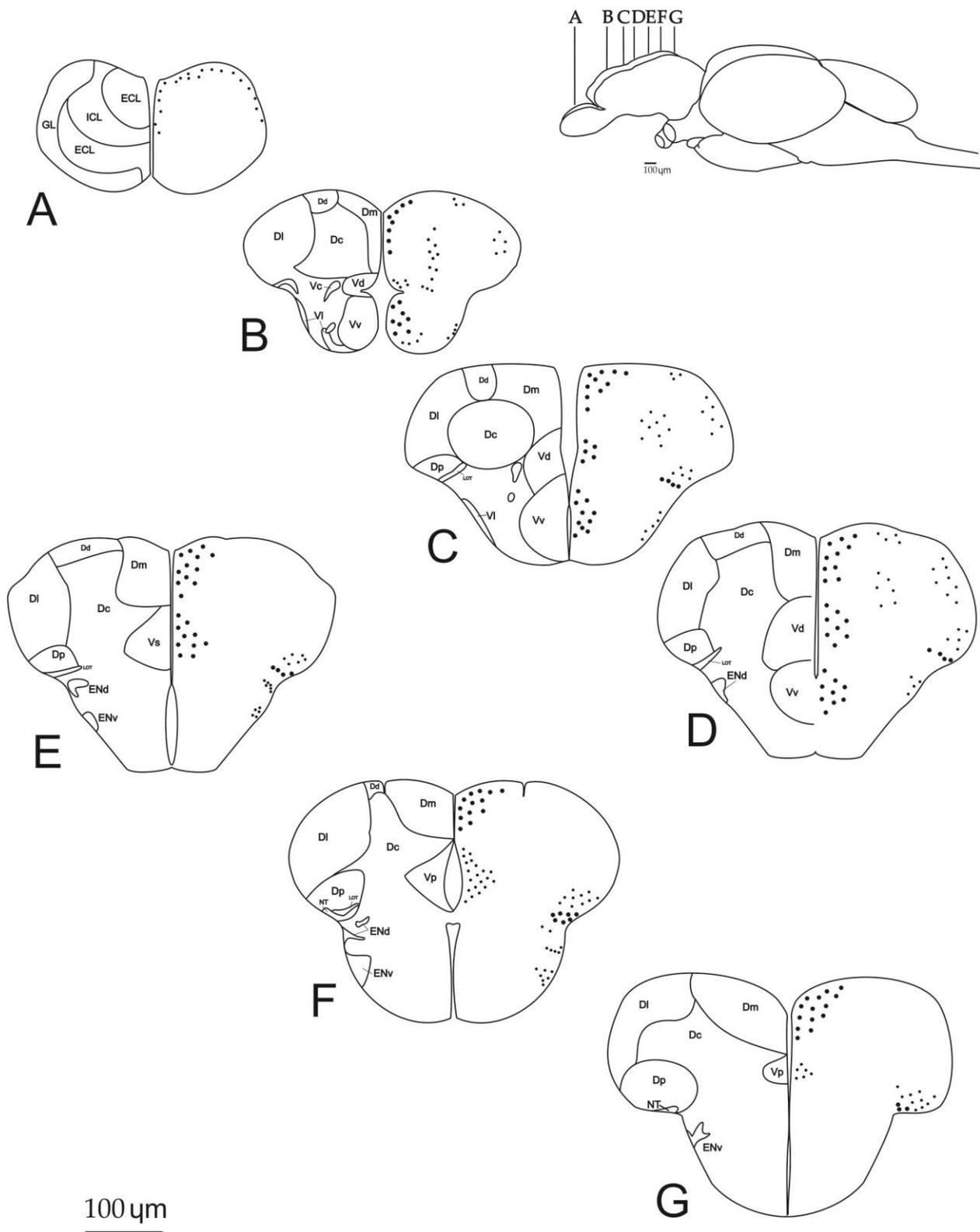


Figura 8 (A-G). Representación esquemática de las secciones transversales del telencéfalo del pez cebra adulto (*Danio rerio*). Se muestra la distribución de los somas neuronales inmunorreactivos a la HuC/D, distinguiendo núcleos de mayor y de menor tamaño. Barra de escala de 100 μm.

-Bulbos olfatorios

En esta región del telencéfalo observamos poca inmunorreactividad tanto con la técnica de la DAB (Figura 9A) como con la de la fluoresceína (Figura 10A); la cual se acumula principalmente en la periferia dorsal de los bulbos (Figura 8A).

-Área ventral telencefálica

En el área ventral del telencéfalo observamos varios núcleos que expresan la proteína HuC/D con diferente intensidad.

Los núcleos dorsal (Figuras 8B-D, 9C-H, 10D, 10J) y ventral (Figura 8B-D, 9B-H, 10B, 10C, 10J) expresan HuC/D en mayor magnitud, distinguiendo un elevado número de células inmunorreactivas en ambas técnicas inmunohistoquímicas. Vd y Vv se caracterizan por la formación de grandes agrupaciones en las cuales es difícil distinguir unos somas de otros. A medida que avanzamos en el telencéfalo, ambos núcleos se van extendiendo, hasta llegar a las zonas más caudales del mismo donde desaparecen. En el caso de Vd, es sustituido por el núcleo supracomisural, cuya inmunorreactividad es menor que la de los anteriores, sin embargo también se distinguen un importante número de poblaciones neuronales que expresan la proteína. En este caso, aunque también se forman agregados, existe una dispersión de los mismos, así como la proteína se expresa en menor intensidad.

Vs, a su vez, es reemplazado por el núcleo postcomisural (Figura 8F, 8G, 9L) en las regiones más caudales del telencéfalo. Vp presenta una gran cantidad de neuronas inmunorreactivas, sin embargo, aunque también hay agrupaciones, en este caso podemos distinguir células individuales y ovaladas, que presentan una mayor inmunorreactividad y que destacan sobre el resto de la población neuronal que conforma el núcleo postcomisural.

En la zona rostral, diferenciamos los núcleos central (Figura 8B, 9C-E, 9G, 10D, 10J) y lateral (Figura 8B, 8C, 9B-G, 10E, 10J-K). Vc se encuentra en una posición lateral con respecto a Vd y VI se dispone en la periferia del encéfalo. Ambos expresan HuC/D en menor medida, con células de menor tamaño, aunque distinguimos algunas células que destacan sobre el resto. No forman agregados como en el caso de Vv o Vd, se pueden distinguir células individuales y redondeadas, cuya expresión de la proteína HuC/D es ligeramente mayor en VI. Ambos núcleos desaparecen a medida que avanzamos hacia la zona más caudal de la región telencefálica.

El núcleo lateral es reemplazado por los núcleos endopedunculares dorsal (Figura 8D-F, 9H-J) y ventral (Figura 8E-G, 9H-J), que se encuentran en las regiones más posteriores del telencéfalo. También expresan la proteína HuC/D, predominando agregados en el caso de ENv y células individuales marcadas y redondeadas en el caso de ENd.

-Área dorsal telencefálica

Como en el caso anterior, en el área dorsal telencefálica también se observan diversos núcleos en los cuales varía la expresión de HuC/D.

El núcleo dorsal medial (Figura 8B-G, 9K, 10F, 10I) expresa la proteína en mayor magnitud, destacando un elevado número de poblaciones neuronales inmunorreactivas en ambas técnicas inmunohistoquímicas. Sin embargo, apenas se observan agregados, distinguiendo los somas neuronales redondeados. A medida que avanzamos rostro-caudalmente, Dm se va extendiendo hacia la zona dorso-lateral del telencéfalo.

En el núcleo dorsal (Figura 8B-F, 10H), se distinguen unas pocas células inmunorreactivas individualizadas y ovaladas, apreciándose sólo en la técnica de inmunofluorescencia. Dd se va extendiendo hasta llegar a las zonas más posteriores, donde vuelve a disminuir hasta desaparecer, haciendo que confluyan Dm y Dl.

En el núcleo dorsal lateral (Figura 8B-G, 10J), también se diferencian una serie de somas neuronales que expresan HuC/D, sin embargo son células separadas y aisladas con forma redondeada. Solo se aprecia en la técnica de inmunodetección mediante fluorocromos. Por lo que la inmunorreactividad es inferior a la de los demás núcleos dorsales. A medida que avanzamos caudalmente en el telencéfalo, Vl se va expandiendo dorso-lateralmente hasta confluir con Dm.

En el núcleo dorsal central (Figura 8B-G, 10I), también se distingue una serie células que expresan HuC/D, pero son células separadas, sin formar un grupo numeroso y llamativo, además solo se aprecian en la técnica de la inmunodetección mediante fluorocromos. Dc va aumentando su ocupación progresivamente. Por último, en el *Nucleus taeniae* (Figura 8F, 8G, 9J), junto con el núcleo dorsal medial, son los núcleos que presentan las mayores poblaciones neuronales que expresan Hu. NT constituye un núcleo de pequeño tamaño que va disminuyendo hasta desaparecer.

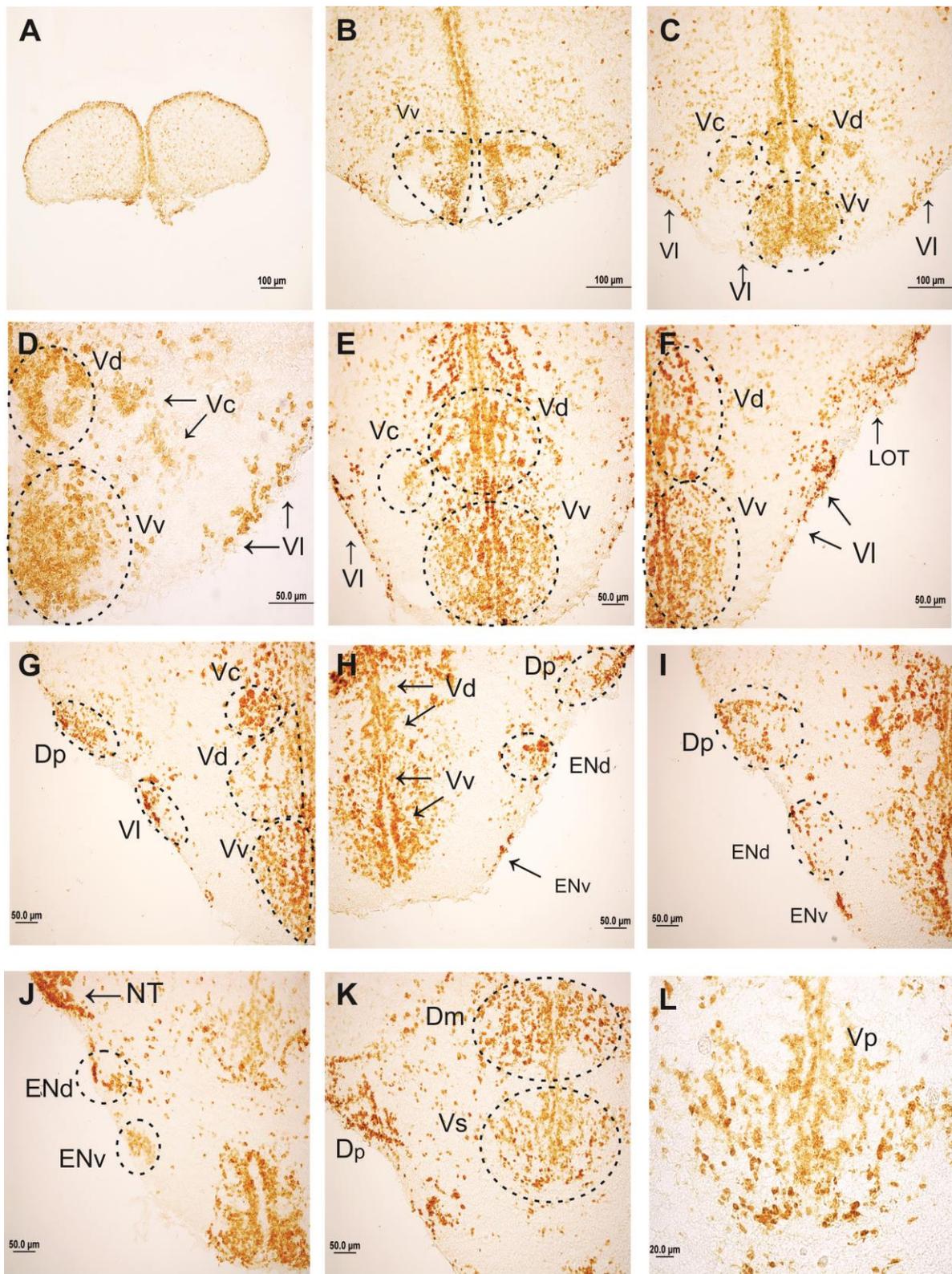


Figura 9 (A-L). Estudio de la expresión de la proteína Hu C/D mediante la técnica de la inmunoperoxidasa. Cortes transversales del telencéfalo del pez cebra (*Danio rerio*), incluyendo la parte dorsal (D) y la parte ventral (V). En las sucesivas imágenes correspondientes a diferentes cortes podemos observar: **A.** Bulbos olfatorios. **B.** Vv. **C.** Vv, VI, Vc, Vd. **D y E.** Vv, Vc, VI, Vd. **F.** Vc, VI, Vd, Dp, LOT. **G.** Vv, VI, Vd, Dp. **H.** Vv, Vd, ENd, ENV. **I.** Vd, ENd, ENV. **J.** NT, ENd, ENV. **K.** Dm, Vs. **L.** Vp.

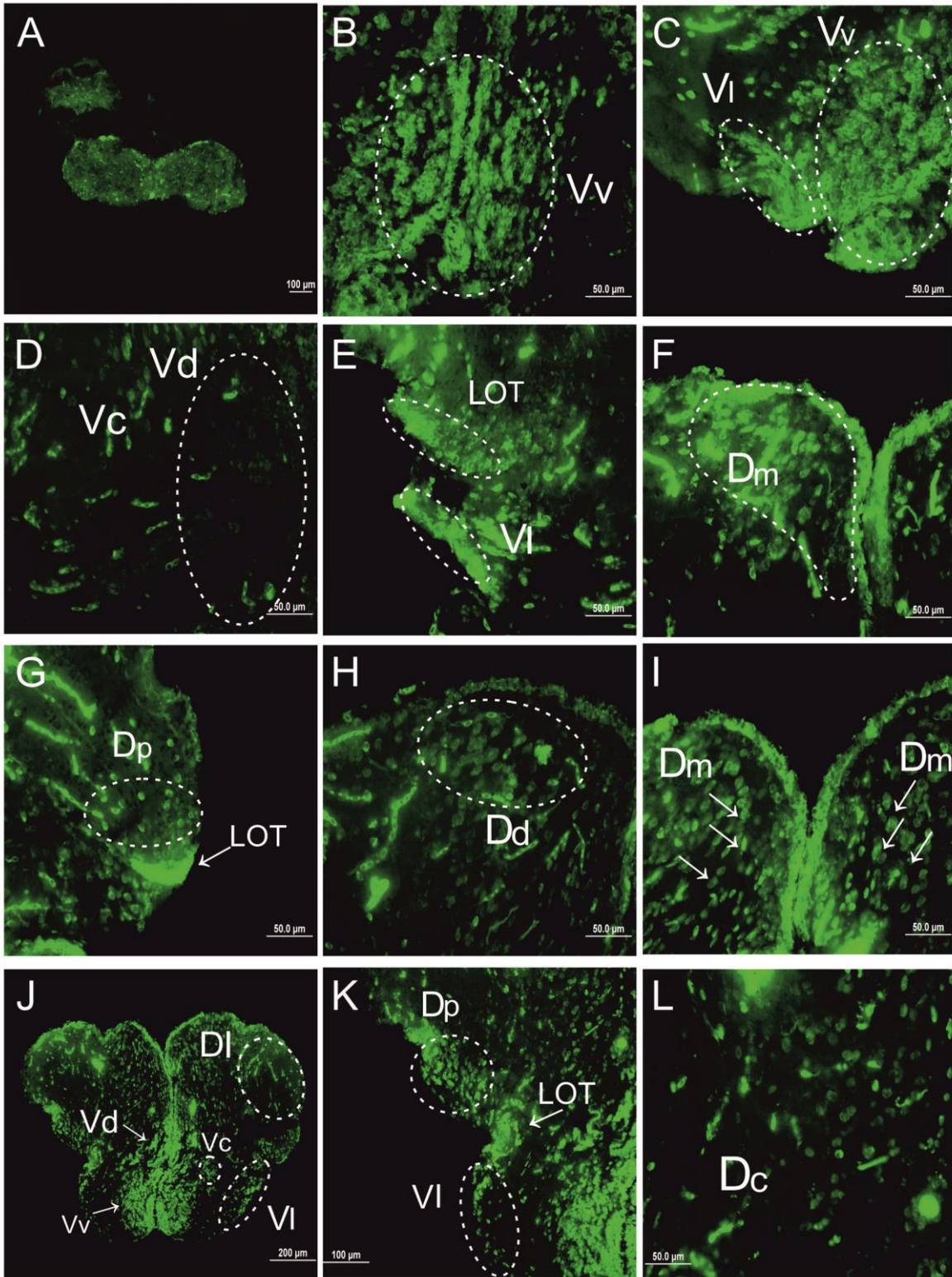


Figura 10 (A-L). Estudio de la expresión de la proteína HuC/D mediante la técnica de la inmunofluorescencia indirecta. Cortes transversales del telencéfalo del pez cebra (*Danio rerio*), incluyendo la parte dorsal (D) y la parte ventral (V). En las sucesivas imágenes correspondientes a diferentes cortes podemos observar: **A.** Bulbos olfatorios. **B.** Vv. **C.** Vv, VI. **D.** Vv, Vc. **E.** VI, LOT. **F.** Dm. **G.** Dp, LOT. **H.** Dd. **I.** Dm. **J.** Vv, VI, Vc, DI. **K.** Dp, LOT, VI. **L.** Dc.

5. Discusión

Las neuronas se caracterizan por ser básicas en la señalización del encéfalo, por lo que el conocimiento del funcionamiento del mismo es fundamental. Los marcadores inmunohistoquímicos han demostrado ser una herramienta importante en el conocimiento del encéfalo para los neurocientíficos. Gracias a los anticuerpos, se puede identificar células que expresan un fenotipo neuronal y, además, obtener información acerca de sus características morfológicas, así como de la expresión de proteínas específicas (Tanapat, 2013), como es el caso de este estudio. Cabe destacar que la identificación y detección de anticuerpos ha resultado útil para la valoración de enfermedades autoinmunes. También están asociados a manifestaciones neurológicas complejas (Carrasco *et al.* 2014).

En el presente trabajo se realizó un estudio de la expresión de la proteína HuC/D en el telencéfalo de *Danio rerio*.

Tras analizar los resultados obtenidos, podemos observar una presencia generalizada de la proteína HuC/D en los somas neuronales. Sin embargo, cabe destacar que no fue expresada en la misma intensidad en todos los núcleos telencefálicos, como se indica en el apartado anterior.

En comparación con otro estudio similar hecho en el mágil *Chelon labrosus* (Lamas *et al.* 2007), donde utilizaron una técnica inmunohistoquímica de doble marcaje para la HuC/D y el dipéptido carnosina, los resultados han sido similares; es decir, se observa una expresión generalizada de la proteína HuC/D a lo largo del telencéfalo del artinopterigio. Sin embargo, cabe mencionar que la anatomía de esta parte del encéfalo difiere con respecto a la del pez cebra. El núcleo dorsal lateral del mágil, a diferencia de *Danio rerio*, presenta una región ventral, que a su vez se subdivide en dos; una región central, que también se subdivide en dos y una región medial que se diferencia en 4 subregiones. En el caso de la región ventral telencefálica, el mágil presenta a mayores un núcleo intermedio, pero sólo un núcleo endopeduncular. Además, los núcleos son de menor tamaño que en el caso del pez cebra. Se trata de un telencéfalo con más variedad de núcleos neuronales. Es necesario mencionar que, al igual que en pez cebra, Vv y Vd presentan una gran inmunorreactividad. Por el contrario, en la región dorsal, Dm presenta menos poblaciones neuronales que expresen HuC/D y DI (en concreto DIp, o núcleo lateral- posterior) presenta una notable inmunorreactividad.

Por lo que, a pesar de presentar diferencias en la anatomía telencefálica, en ambas especies de actinopterigios, la expresión de HuC/D en los somas neuronales también se lleva a cabo de forma general y también existen diferencias en la inmunorreactividad, ya que no todos los núcleos expresan la proteína de la misma manera.

Los estudios con HuC/D son minoritarios con respecto a los realizados con otras proteínas de expresión neuronal como, por ejemplo, la calretinina, que es una proteína fijadora de calcio. En el trabajo de Castro *et al.* de 2006, se estudió la distribución de esta proteína, y se comparó con la de otros neuropeptidos y neurotransmisores en el telencéfalo del pez cebra.

HuC/D y calretinina presentan una expresión similar en la región telencefálica, destacando Dm en la región dorsal con una abundante inmunorreactividad. Al igual que en el caso de la proteína HuC/D, Dc, DI y Dp se caracterizan por presentar poblaciones neuronales que expresan calretinina en menor magnitud que en el caso de Dm. Además, en la región ventral telencefálica y en los bulbos olfatorios los resultados son similares a los de nuestro estudio.

En otro estudio realizado en *Danio rerio* por Díaz *et al.* en 2002, se analizó la distribución de la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) en el encéfalo de pez cebra. En concreto, en el telencéfalo, a diferencia de nuestro análisis de la expresión de la proteína HuC/D, en este caso sólo se observó dicha hormona en determinados núcleos presentes en el área telencefálica ventral.

En el núcleo central (Vc) se observaron células de pequeño tamaño que formaban un grupo compacto, a diferencia de la HuC/D, que se expresaba en células dispersas, aunque también pequeñas. En el núcleo ventral se observaron algunas células, al contrario que en nuestro caso de estudio que Vv presentaba las mayores concentraciones de células inmunorreactivas junto con Vd, formando agregados de gran tamaño en los cuales no se distinguían células individuales. En los núcleos supra y poscomisural se observaron células de pequeño tamaño redondeadas, al igual que en nuestro caso de estudio, con la diferencia de que en la expresión de HuC/D se forman algunos agregados en el caso de Vs. A mayores, cabe destacar la ausencia de TRH en Vd, ENd y ENv.

Por otro lado, se conoce la existencia de una relación entre el papel de la proteína Hu y las enfermedades neurodegenerativas como, por ejemplo, el Parkinson o el Alzheimer (Perrone-Bizzozero & Bird, 2013).

El Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza, entre otros, por el temblor en reposo, que aparecen como resultado de la muerte neuronal en la pars compacta de la sustancia negra situada en los ganglios basales. La muerte de las neuronas dopaminérgicas tiene como resultado una disminución de la cantidad de dopamina que llega al músculo estriado, lo que altera las conexiones entre los ganglios basales y, como consecuencia final, una inhibición en el tálamo, que regula la actividad motora junto la corteza y el cerebelo (Díaz, 2016).

El 90-95% de los casos de Parkinson son de causa desconocida, se habla por tanto de Parkinson idiopático, mientras que solo 5-10% están asociados a factores genéticos, en este caso se habla de Parkinson familiar. La muerte neuronal está asociada a una disfuncionalidad mitocondrial, que está condicionada por el estrés oxidativo/nitrosativo y la inhibición del complejo I mitocondrial. El aumento de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno contribuyen al daño mitocondrial que, junto con el fallo bioenergético provocado por la inhibición del complejo I, conducen a la apertura del poro de transición mitocondrial, con la consiguiente salida de citocromo c y la inducción de la apoptosis. El Parkinson familiar está relacionado con mutaciones en genes cuyos productos son proteínas que participan en el mantenimiento de la función y homeostasis mitocondriales. Los principales genes relacionados con casos de Parkinson familiar son PINK1, Parkina, DJ-1 y α -sinucleína. La α -sinucleína es el principal componente de los cuerpos de Lewy, inclusiones citoplasmáticas características de esta enfermedad, y que aparecen en las neuronas dopaminérgicas, lo que constituye una parte importante de la fisiopatología de la disfunción mitocondrial (Díaz, 2016). Se cree que nuestra proteína de interés, HuD, puede estar relacionada con esta patología debido a su interacción con los ARNm cuya traducción dará lugar a α -sinucleína (Perrone-Bizzozero & Bird, 2013).

El Alzheimer es la principal causa de demencia y se caracteriza por una disminución progresiva de la función cognitiva. Las características neuropatológicas de un cerebro con esta enfermedad son placas amiloides extracelulares difusas y neuríticas, rodeadas de neuritas distróficas y nudos neurofibrilares intracelulares. A menudo también va acompañado de la presencia de microgliosis reactiva y pérdida de neuronas, de materia blanca y de sinapsis neuronales (Reitz *et al.* 2011).

Esta enfermedad causa una pérdida de peso y volumen cerebral, debido, en gran medida, a la contracción y pérdida de procesos neuronales. También se han encontrado alteraciones en las redes neuronales, una hiperactivación del hipocampo durante la ejecución de tareas de memoria, etc, lo que interfiere en los procesos subyacentes al

aprendizaje, la memoria y otras funciones cognitivas. Cabe destacar que la sobreestimulación de las poblaciones neuronales como ocurre en el hipocampo, puede provocar excitotoxicidad, lo que contribuye a la neurodegeneración (Huang & Mucke, 2012).

Se sabe que la desestabilización de la proteína HuD está implicada en el desarrollo y la progresión de la enfermedad del Alzheimer. Se cree que esta enfermedad puede estar causada por interacciones copatógenas entre múltiples factores como la proteína precursora amiloide (APP) (Huang & Mucke, 2012). HuD interacciona con el ARNm de α -secretasa ADAM10, la cual se encarga de la escisión de APP convirtiéndolo en una APP soluble que no es patógena. Por lo que la desestabilización de nuestra proteína de interés conllevaría al inicio de una cadena, que causaría el desarrollo de esta enfermedad neurodegenerativa (Perrone-Bizzozero & Bird, 2013).

Por lo tanto, los estudios con la proteína HuD, son de elevada importancia a la hora de buscar una solución a las enfermedades neurodegenerativas como las nombradas con anterioridad. Además se trata de una proteína ubicua en el telencéfalo y en otras regiones del encéfalo, lo que facilita su estudio, así como se encuentra en multitud de especies animales, incluyendo el *Homo sapiens*.

6. Conclusiones

Partiendo de los resultados obtenidos en este estudio:

- Se ha observado la presencia de células inmunorreactivas a la proteína HuC/D en el telencéfalo del pez cebra adulto.
- La presencia de la proteína HuC/D en las poblaciones neuronales confirma que se trata de un marcador neuronal efectivo para el estudio de las mismas en el telencéfalo del pez cebra, *Danio rerio*.

Conclusiones

Partiendo dos resultados obtidos neste estudio:

- Observouse a presencia de células inmunorreactivas á proteína HuC/D no telencéfalo do peixe cebra adulto.

-A presenza da proteína HuC/D nas poboación neuronais confirma que se trata dun marcador neuronal efectivo para o estudo das mesmas no telencéfalo do peixe cebra, *Danio rerio*.

Conclusions

Based on the results obtained in this study:

-The presence of immunoreactive cells to the HuC/D protein has been observed in the adult zebrafish's telencephalon.

- The presence of the HuC/D protein in neural populations confirms that it is an effective neural marker for the study of these proteins in the adult zebrafish's telencephalon.

ANEXO A

Preparación de las soluciones usadas en la fase experimental del trabajo:

-Tampón fosfato (PB), 0,1M, pH 7,4.

El PB se prepara en una probeta, obteniendo un volumen final de 1 litro, a partir de:

- Fosfato monosódico 0,2M (95 mL). Resultado de 27,598 g de NaH_2PO_4 , completando hasta llegar al litro con agua destilada.
- Fosfato disódico 0,2M (405 mL). Resultado de 71,623 g de NaH_2PO_4 , completando hasta llegar al litro con agua destilada.
- Agua destilada (500 mL).

-Tampón fosfato salino (PBS), 0,01M, pH 7,4.

El PBS se prepara en una probeta, obteniendo un volumen final de 1 litro, 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 un litro.

-Paraformaldehido al 4% en PB 0,1M, pH 7,4. Obteniendo un volumen final de 1 litro. Se prepara en una campana de extracción de gases.

- 500 mL de agua destilada, calentada a 75- 80°C.
- 40 g de paraformaldehido.
- Unas gotas de NaOH 1M, hasta obtener una solución transparente.
- 500 mL de tampón fosfato (PB) 0,2M, pH 7,4 (una vez enfriada la solución).

7. Bibliografía

- Advansta. Análisis de Proteínas Electroforesis, Transferencia e Inmunodetección. <http://www.ecogen.com/upfiles/A56009.pdf>. Última consulta: 04/04/2019.
- Butler, A, B, & Hodos, W. (2005). *Comparative vertebrate neuroanatomy. Evolution and Adaptation*. 2ª ed. New York: Wiley-Liss.
- Carrasco, A, Alarcón, I, González, C, & Graus, F. (2014). *Identificación y utilidad clínica de los anticuerpos antineuronales*. *Inmunología*. 33(4):128–136.
- 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*. *The journal of comparative neurology*. 494:435–459.
- Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). <http://seresmodelicos.csic.es/galeria/peix.html>. Última consulta: 02/04/2019.
- Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). <http://seresmodelicos.csic.es/peix.html>. Última consulta: 02/04/2019.
- Díaz, M.E. (2016). *El pez cebra como modelo de Parkinson. Evaluación de la disfunción mitocondrial y de la capacidad terapéutica de la melatonina*. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- Díaz, M.L, Becerra, M, Manso, M.J, & Anadón, R. (2002). *Distribution of Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) Immunoreactivity in the Brain of the Zebrafish (Danio rerio)*. *The journal of comparative neurology*. 450:45–60.
- Holden, J, A, Lester, L, L, & Matthews, L, J. (2012). *The zebrafish. Atlas of Macroscopic and Microscopic Anatomy*. Cambridge University Press. pp. 122.
- Huang, Y, & Mucke, L. (2012). *Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies*. *ScienceDirect*. 148, 1204-1222.
- Kalstein. https://kalstein.eu/p211/Cryostat-Microtome/product_info.html. Última consulta: 26/07/2019.
- Kalueff, A, V, Stewart, A, M, & Gerlai, R. (2013). *Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders*. *Cell Press*. Review.
- 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
- Leica Biosystems. <https://www.leicabiosystems.com/es/equipo-histologia/microtomos/histocore-biocut/>. Última consulta: 26/07/2019.
- Losada, J.A, Palmeros, B.S, Ramírez, M.B, & Fernández, M.S. (2012). *El pez cebra: una especie modelo*. *La ciencia y el hombre*. Vol: 25. Número 1.
- Nelson JS. *Fishes of the world* 4ªed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2006.
- Nieuwenhuys R., Donkelaar H.J. y Nicholson C. 1998. *The central nervous system of vertebrates*. Springer. Volumen I, II, III.
- Obando M., Gómez E., Tovar M., Rincón L., Caldas M. y Hurtado H. (2013). *Estudio morfométrico y topográfico del cerebro del pez neón cardenal Paracheirodon axelrodi (characiforms: characidae)*. *Actual Biol* 35 (98): 45-61.
- Paz, O. C. (2015). *Estudio de la proliferación celular en el rombencéfalo y en la médula espinal del pez cebra adulto (Danio rerio)*. Trabajo de Fin de Grado. Universidade da Coruña.

- Perrone-Bizzozero, N, Bird, C.W. (2013). *Role of HuD in nervous system function and pathology*. *Frontiers in Bioscience*. 5, 554-563.
- Reitz, C, Brayne, C, & Mayeux, R. (2011). *Epidemiology of Alzheimer disease*. *Nature Reviews Neurology*. 7, 137-152.
- Rincón L, Cavallino L, Alonso F, Lo Nostro F, Pandolfi M. (2016). *Morfometría y topología del cerebro del pez tetra cola roja *Aphyocharax anisti* (CHARACIFORMES: CHARACIDAE)*. *Revista Investigación desarrollo pesquero*, N° 29: 15-32.
- Spence, R, Fatema, M.K, Reichard, M, Hug, K.A, Wahab, M.A, Ahmed, Z.F, & Smith, C. (2006). *The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh*. *Journal of fish biology*. Vol: 69, 1435-1448.
- Spence R, Gerlach G, Lawrence C, Smith C. (2008). *The Behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio Rerio**. *Biological Reviews*. 83(1):13-34.
- Tanapat, P. (2013). *A comprehensive review of immunohistochemical markers for CNS neuronal cell types*. *The world of laboratories*. 3:196.
- Wullimann M, Rupp B, Relchert H. (1996). *Neuroanatomy of the Zebrafish Brain: a topological atlas*. Basilea (Suiza). Birkhauser Verlag. p.8, 9, 23-34.