

Facultad de Ciencias
Departamento de Biología
Área de Biología Celular

Trabajo de Fin de Máster Proyecto de investigación

Caracterización de la retina del pez cebra (*Danio rerio*) durante su desarrollo mediante técnicas inmunohistoquímicas

Caracterización da retina do peixe cebra (*Danio rerio*) durante o seu desenvolvemento mediante técnicas inmunohistoquímicas

Characterization of the retina of the adult zebrafish (*Danio rerio*) during its development by immunohistochemical techniques



José Manuel Bustabad Alonso

Septiembre, 2020

Director Académico: Dra. M^a Luz Díaz Prado
Codirector: Dr. Ibán Lamas Criado



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias
Departamento de Biología
Área de Biología Celular

Caracterización de la retina del pez cebra (*Danio rerio*) durante su desarrollo mediante técnicas inmunohistoquímicas

Caracterización da retina do peixe cebra (*Danio rerio*) durante o seu desenvolvemento mediante técnicas inmunohistoquímicas

Characterization of the retina of the zebrafish (*Danio rerio*) during its development by immunohistochemical techniques

Trabajo de Fin de Máster que presenta el alumno del Máster de Neurociencia José Manuel Bustabad Alonso 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, Septiembre de 2020

INDICE

1.-Resumen/Resumo/Abstract.....	4
2.-Antecedentes y estado actual de la cuestión.....	6
2.1.-El uso del pez cebra como organismo modelo.....	6
2.2.-El sistema visual en el pez cebra.....	8
2.3.-Desarrollo de la retina.....	10
2.4.-Las proteínas ligantes de calcio (CaBPs).....	12
2.5.-Técnicas inmunohistoquímicas.....	15
3.-Hipótesis.....	16
4.-Objetivos.....	16
5.-Metodología.....	17
5.1.-Animales.....	17
5.2.-Procesamiento de las muestras.....	18
5.2.1.-Individuos adultos y juveniles.....	18
5.2.2.-Embriones y larvas.....	18
5.3.-Pruebas control.....	18
5.4.-Bloques de Tissue Tek.....	19
5.5.-Bloques de parafina.....	20
5.6.-Inmunodetección.....	20
5.6.1.-Inmunofluorescencia.....	21
5.6.2.-Inmunodetección mediante enzimas: inmunoperoxidasa.....	22
5.7.-Procesamiento de las imágenes.....	23
6.-Plan de trabajo.....	23
7.-Cuestiones éticas y legislativas.....	25
8.-Aplicabilidad.....	25
9.-Plan de difusión de los resultados.....	26
10.-Recursos necesarios.....	27
11.-Bibliografía.....	29

1.-Resumen

La retina es una estructura del sistema nervioso ampliamente estudiada y conservada en todos los grupos de vertebrados. Mediante el presente proyecto de investigación se pretende ampliar el conocimiento existente acerca de este órgano sensorial en el pez cebra, estudiando la distribución de tres proteínas ligantes de calcio: calbindina, calretinina y parvalbúmina, ya estudiadas en la retina de otras especies. Para ello se va a usar el pez cebra (*Danio rerio*) en diferentes estadios de desarrollo (embriones, larvas, juveniles y adultos) para comparar también los cambios ocurridos durante el desarrollo con la distribución de estas tres proteínas. Además, usando esta caracterización inmunohistoquímica, también se podrían identificar subtipos celulares de la retina en los que alguna de estas proteínas podría funcionar como marcador.

Palabras clave: Pez cebra, retina, inmunohistoquímica, calbindina, calretinina, parvalbúmina, CaBPs, desarrollo.

1.-Resumo

A retina é unha estrutura do sistema nervioso ampliamente estudada e conservada en todos os grupos de vertebrados. Mediante o presente proxecto de investigación preténdese ampliar o coñecemento existente acerca deste órgano sensorial no peixe cebra, estudando a distribución de tres proteínas ligantes de calcio: calbindina, calretinina e parvalbúmina, xa estudadas na retina de outras especies. Para iso, empregaremos o peixe cebra (*Danio rerio*) en diferentes estadios de desenvolvemento (embrións, larvas, xuvenís e adultos) para comparar tamén os cambios ocorridos durante o desenvolvemento ca distribución destas tres proteínas. Ademáis, usando esta caraterización inmunohistoquímica tamén se poderían identificar subtipos celulares da retina nos que algunha destas proteínas podería funcionar como marcador.

Palabras chave: Peixe cebra, retina, inmunohistoquímica, calbindina, calretinina, parvalbúmina, CaBPs, desenvolvemento.

1.-Abstract

The retina is a widely studied and conserved structure of the nervous system in all groups of vertebrates. This project aims to expand the existing knowledge about this sensory organ in zebrafish by studying the distribution of three calcium-binding proteins: calbindin, calretinin and parvalbumin, which have already been studied in the retina of other species. For this, we are going to use the zebrafish (*Danio rerio*) in different stages of development (embryos, larvae, young and adults) to also compare the changes that occurred during development with the distribution of these three proteins. Furthermore, using this immunohistochemical characterization, retinal cell subtypes could also be identified in which some of these proteins could function as a marker.

Key words: Zebrafish, retina, immunohistochemistry, calbindin, calretinin, parvalbumin, CaBPs, development.

2.-Antecedentes y estado actual de la cuestión

2.1.-El uso del pez cebra como organismo modelo

Actualmente la mayor parte de las investigaciones científicas se hacen tomando como sujetos los denominados organismos modelo. Éstos son seres vivos que, por comodidad y aplicabilidad de los estudios realizados en ellos, se han elegido como representantes de un grupo y en ellos se realizan innumerables estudios que nos permiten conocer más acerca de la vida. El pez cebra es uno de estos animales particulares y es que su corto ciclo de vida, su tamaño, sus larvas transparentes y su reducido coste de mantenimiento han hecho de este teleósteo un modelo ideal para el estudio de varios procesos del desarrollo, así como de diferentes patologías (Kalueff *et al.*, 2014). Además, el pez cebra ya tiene su genoma secuenciado, lo que ha permitido que en las últimas décadas se hayan realizado multitud de experimentos en esta especie, muchos de ellos enfocados en la retina (Brockhoff *et al.*, 1998; Niklaus & Neuhauss, 2017).



Figura 1: Imagen del pez cebra (*Danio rerio*) (29/07/2020). Obtenido de: Goodfreephotos.com <https://www.goodfreephotos.com/animals/fish/zebrafish-danio-rerio.jpg.php>

El pez cebra (*Danio rerio*) es un pez actinopterigio teleósteo perteneciente a la familia de peces dulceacuícolas de los ciprínidos. En cuanto a su apariencia es un pez de aspecto fusiforme que rara vez pasa de los 40 mm de largo y se caracteriza por tener de cinco a siete bandas horizontales de color azul oscuro que van desde el opérculo hasta la aleta caudal (**Fig.1**). El pez cebra de forma natural se encuentra en aguas tranquilas como las de los campos de cultivo de arroz. Los principales ríos donde se ha avistado son el Ganges y el Brahmaputra a su paso por India, Nepal y Bangladesh, aunque hay datos de otros avistamientos en nuevos lugares (**Fig.2**) (Spence *et al.*, 2008).

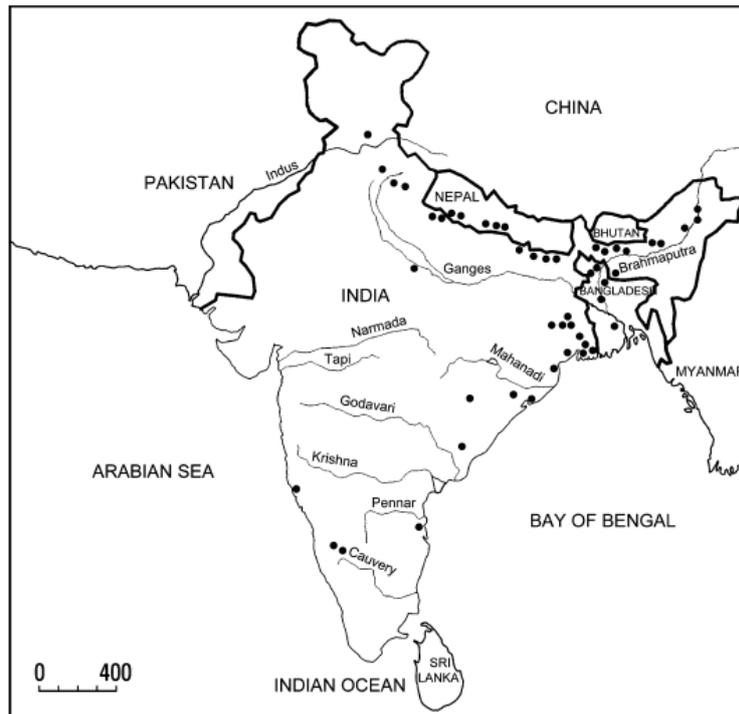


Figura 2: Distribución natural del pez cebra. Obtenido de Spence *et al.*, 2008.

En cuanto a la reproducción, en la naturaleza es un proceso estacional, pero en el laboratorio puede ocurrir durante todo el año (Spence *et al.*, 2008), por lo que no hay que esperar a ninguna época concreta del año. En lo referente a su desarrollo, es un proceso rápido dividido en cuatro estadios: embrión, larva, juvenil y adulto (Arenzana *et al.*, 2011). El estadio embrionario comienza cuando se forma el cigoto y finaliza al producirse la eclosión del huevo (aproximadamente a las 72 horas tras la fecundación) (Kimmel *et al.*, 1995). Durante el mismo, se producen importantes procesos del desarrollo, incluso el embrión varía su morfología. Por ello, el desarrollo embrionario se subdivide en varias etapas: cigoto (0-45 min), periodo de escisión (45 min-2 h), blástula (2-5 h), gástrula (5-10 h), periodo de segmentación (10-23 h), faríngrula (23-42 h) y periodo de eclosión (2-3 días) (Kimmel *et al.*, 1995). En el presente proyecto de investigación se estudiarán embriones de más de 24 h; momento en el que ya se han formado la retina, la notocorda y algunos somitas, y en el que se distingue la simetría bilateral (**Fig.3**). En el periodo de eclosión, que ocurre el tercer día postfertilización, el embrión continúa creciendo y, además, se inicia la organogénesis, siendo ésta un poco más lenta en el tubo digestivo y los órganos asociados a él (Kimmel *et al.*, 1995). Una vez completado este periodo, el animal entra en fase de

larva en la que continuará creciendo mientras que completa los procesos de organogénesis alcanzando la fase de juvenil y finalmente convertirse en adulto.

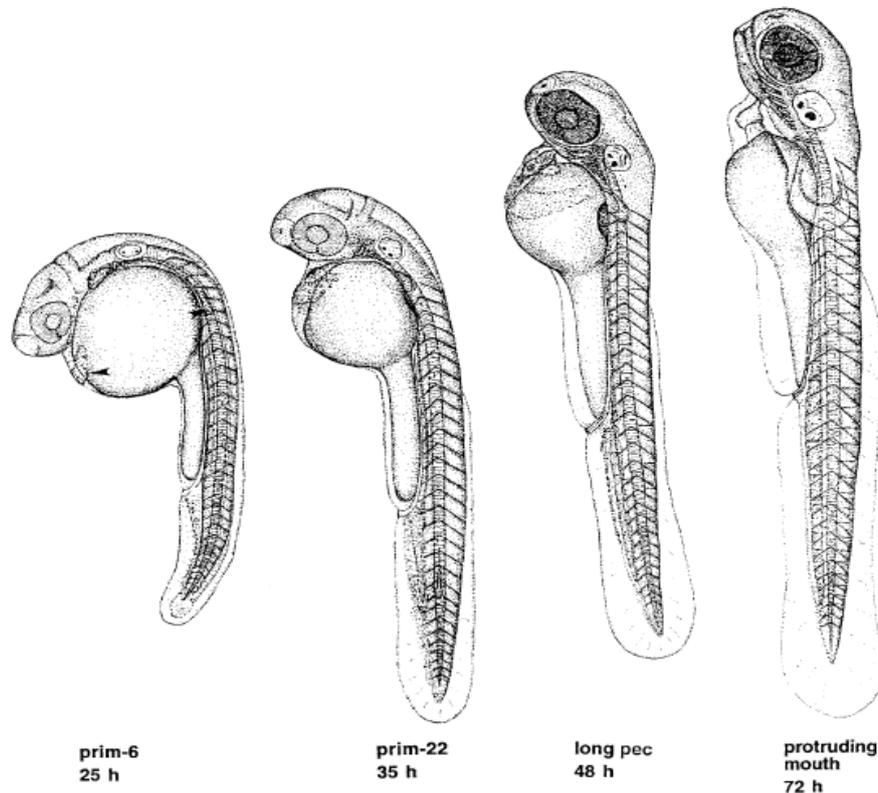


Figura 3: Apariencia del pez cebra en diferentes puntos del desarrollo embrionario. Obtenido de Kimmel *et al.*, 1995.

2.2.-El sistema visual en el pez cebra

El sistema visual del pez cebra ha sido ampliamente estudiado y se conocen varios aspectos de su biología. En lo que se refiere a la retina, se estructura como en la mayoría de los vertebrados, en varias capas: nuclear externa, plexiforme externa, nuclear interna, plexiforme interna y capa de células ganglionares (**Fig.4**). En la retina del pez cebra están presentes los tipos neuronales básicos de la retina de vertebrados: fotorreceptores, células horizontales, células bipolares, células amacrinas y células ganglionares. Estos tipos celulares se distribuyen de modo específico en las diferentes capas de la retina, determinando así la función de cada una de ellas (Anadón *et al.*, 2002; Díaz *et al.*, 2002):

- Capa nuclear externa: en ella se produce la transducción de la señal luminosa. Contiene los cuerpos celulares o somas de los fotorreceptores (conos y bastones), separados unos de otros por ramificaciones de la glía radial de la retina, las células de Müller. Los fotorreceptores emiten prolongaciones hacia

la capa plexiforme externa, en donde establecen sinapsis con las células horizontales y con las bipolares.

- Capa plexiforme externa: está constituida por terminales axónicos de los fotorreceptores, procesos dendríticos de las células bipolares y procesos de las células horizontales. La sinapsis de los conos forma una hilera o fila en el centro de la capa, mientras que las de los bastones se sitúan más externamente.
- Capa nuclear interna: contiene los somas de las células horizontales, bipolares, amacrinas y las células de Müller (glía radial adulta de la retina). Las células bipolares son las encargadas de transmitir la información de los fotorreceptores a las células ganglionares, mientras que las células horizontales y amacrinas regulan este proceso.
- Capa plexiforme externa: es la región de la retina donde las células amacrinas, bipolares y ganglionares establecen sinapsis. Es más compleja que la capa plexiforme externa y su grosor es similar al de la capa nuclear interna.
- Capa de células ganglionares: en esta capa se localizan los somas de las células ganglionares, de gran tamaño, y unas pocas células gliales entre ellas. Los axones de las células ganglionares, que no se ramifican, constituyen el nervio óptico que se dirige hacia el techo óptico.

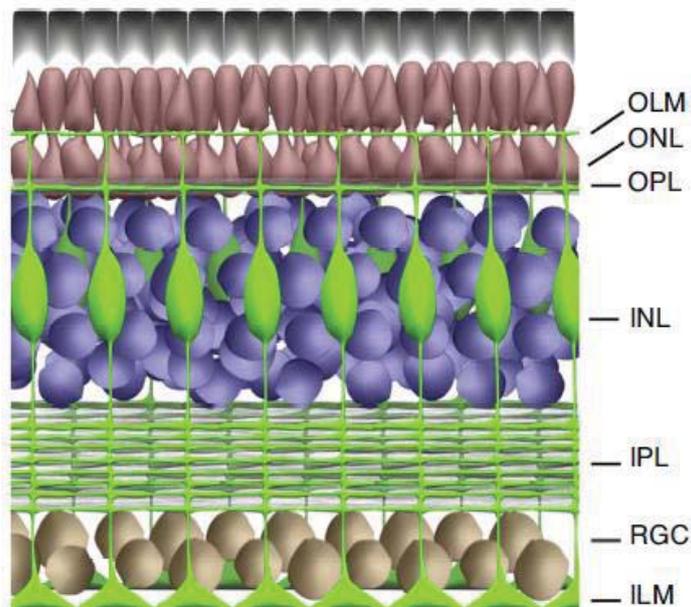


Figura 4: Estructura de la retina de vertebrados. Abreviaturas: membrana limitante externa (OLM), capa nuclear externa (ONL), capa plexiforme externa (OPL), capa nuclear interna (INL), capa plexiforme interna (IPL), capa de células ganglionares (RGC) y membrana limitante interna (ILM). Obtenida de MacDonald *et al.*, 2017.

Estos tipos celulares son muy complejos y, en muchas ocasiones, pueden clasificarse en subtipos (Anadón *et al.*, 2002). Así, los subtipos celulares más fáciles de identificar y más conocidos son los de los fotorreceptores. Estos se clasifican, atendiendo a su morfología, en conos y bastones. Además, según el pico de absorción de la luz, se subclasifican en un único tipo de bastones (500 nm) y cuatro tipos de conos: rojo (550 nm), verde (470 nm), azul (410 nm) y ultravioleta (360 nm) (Bollmann, 2019).

En el pez cebra, al igual que en el resto de vertebrados, la luz es detectada en los fotorreceptores que envían sus axones hacia la capa plexiforme externa, donde establecen sinapsis con las células bipolares que, a su vez, se comunican mediante sinapsis con las células ganglionares en la capa plexiforme interna. Asimismo, los axones de las células ganglionares se agrupan y salen de la retina formando el nervio óptico que, en el caso del pez cebra, se dirige hacia el techo óptico, que constituye el mayor centro de interpretación de los estímulos visuales en peces.

Otro tipo celular que se encuentra en la retina son las células de Müller. En este caso no son neuronas, sino que constituyen la glía radial adulta de la retina. El núcleo de estas células se encuentra en la capa nuclear interna y emiten dos prolongaciones opuestas, cada una dirigida hacia un extremo opuesto de la retina (Charlton-Perkins *et al.*, 2019). Recientemente estas células están siendo muy estudiadas ya que participan en la regeneración de la retina tras una lesión (Jadhav *et al.*, 2009).

2.3.-Desarrollo de la retina

El desarrollo de la retina en el pez cebra es muy similar al del resto de vertebrados. Es un proceso muy rápido debido a que existe una alta presión selectiva al ser la visión el sentido que permite a las larvas encontrar alimento y evitar a posibles depredadores (Niklaus & Neuhauss, 2017). El proceso comienza cuando en el tubo neural aparecen dos evaginaciones denominadas vesículas ópticas. Estas vesículas se van acercando hasta el epitelio en donde, mediante un complejo sistema de señalización recíproca, comienza a formarse la copa óptica. La parte epitelial de la copa óptica formará la lente del ojo, mientras que la parte que proviene del tubo neural formará la retina (Malicki, 2000).

Una vez formada la copa óptica, comienza la diferenciación de las células de la retina. En el pez cebra esta diferenciación ocurre en una dirección vitreoescleral, es decir, de la región interna a la externa de la copa óptica. Así, las primeras células en

diferenciarse son las células ganglionares seguidas de las células de la capa nuclear interna. Durante este periodo comienza a formarse la capa plexiforme interna y, posteriormente, los fotorreceptores y la capa plexiforme externa. Una vez completado este proceso, se desarrollan las células bipolares, a pesar de que se encuentran en la capa nuclear interna (Schmitt & Dowling, 1999) (Tabla 1). Las últimas células en diferenciarse son las de Müller (Charlton-Perkins *et al.*, 2019). El orden de diferenciación de las células de la retina es el mismo en el que se establecen los procesos de sinaptogénesis gracias a los cuales se comunican los distintos tipos celulares (Schmitt & Dowling, 1999) (Tabla 1). Este proceso de desarrollo es muy rápido, de forma que el sistema visual del pez cebra es funcional ya a los primeros 3-5 días tras la fertilización (Bollmann, 2019).

La diferenciación de la retina no es un proceso homogéneo que ocurra a la vez en todas las regiones, sino que comienza en la región cercana a la fisura coroidea denominada parche ventronasal. Además, una vez ha comenzado el proceso no se extiende de forma igual por toda la retina, sino que sigue una progresión asimétrica, existiendo un desarrollo más temprano en la región nasal que en la dorsal y la temporal. Estas diferencias parece que se equilibran entre las 60 y las 70 horas tras la fertilización. La homogeneidad se mantiene hasta las 74 horas tras la fertilización, momento en el que se forma una pequeña región en la retina temporal donde el desarrollo de los conos se acelera (Tabla 1). El desarrollo de la retina es un proceso continuo en esta especie y, además, las primeras respuestas funcionales se observan a las 74 horas tras la fertilización (Schmitt & Dowling, 1999).

Hours post-fertilization	Outer retina		Inner retina		Ganglion cell layer	Other features	Retinotectal projections	Behavior/retinal responses
	Photoreceptor	OPL	INL	IPL				
32					Differentiation in ventronasal patch	Pigmentation within pigment epithelium	Optic axons exit the retina	Weak touch response
36						Optic stalk attenuation commences	Optic axons reach optic chiasm	
40					Ganglion cell birth-days complete/differentiation in ventrotemporal region	Optic stalk attenuation complete	Optic axons reach tectum	Vigorous touch responses
50	Inner segment formation/opsin expression in ventronasal patch	Horizontal cell processes with zonulae adherentes	Differentiation of amacrine and horizontal cells	Amacrine and ganglion cell processes/presumptive synaptic zones	Displaced amacrine cells in intraplexiform location	GABA and trk immunoreactivity in optic nerve		
55	Outer segments in ventronasal patch							
60	Outer segments dorsal/nasal to optic nerve	Rod and cone synaptic terminals	Differentiation of bipolar cells	Bipolar cell processes/conventional synapses	Displaced amacrine cells in ganglion cell layer	GABA and trk immunoreactivity in OPL, INL, IPL		Hatching begins
65		Synaptic ribbons (dyads and triads) in ventronasal patch					Arborization within nine fields in tectum	
70	Rhodsopsin expression in dorsal retina	Synaptic ribbons in other regions		Bipolar cell ribbon synapses in ventronasal patch		Extraocular eye muscle maturation		First visual-evoked responses
72						Emmetropization of eye and lens	Arborization within tenth field in tectum	First electroretinographic responses Optokinetic responses
74	Specialized area in temporal retina first evident			Bipolar cell ribbon synapses in other regions/four sublaminae				

Tabla 1: Principales eventos a lo largo de la diferenciación de las células de la retina. Obtenido de Schmitt & Dowling, 1999.

La diferenciación de las células en la retina es un proceso muy estudiado no solo para conocer cómo se forma esta estructura, sino también para saber cuáles son los posibles subtipos celulares que existen en la retina de vertebrados y cómo van haciendo su aparición y se estructuran y relacionan en las diferentes capas de la misma (Bollmann, 2019).

2.4.-Las proteínas ligantes de calcio (CaBPs)

El calcio es una de las moléculas más importantes en los procesos bioquímicos de señalización ya que puede actuar como primer o segundo mensajero e incluso, como diana (Porteros, 1997). Esto hace que el calcio esté implicado en multitud de procesos dentro del sistema nervioso y, por supuesto, en la retina. Así, la transducción de la señal en los fotorreceptores, la liberación de los neurotransmisores o la activación de ciertos canales iónicos son algunos de los mecanismos en los que participa el calcio en la retina (Akopian & Witkovsky, 2002).

La amplia variedad de funciones que puede desempeñar el calcio en la célula hace que su concentración esté muy controlada, por lo que existen reservorios para este ión tanto en la mitocondria como en el retículo endoplasmático (Akopian & Witkovsky, 2002). Los niveles normales citoplasmáticos de calcio son del orden de milimolar

(Porteros, 1997); a estas concentraciones existe un grupo de proteínas, denominadas proteínas ligantes de calcio, que presentan gran afinidad por el ión calcio. Tradicionalmente estas proteínas se dividen en dos grupos (Porteros, 1997):

1. Anexinas: estas proteínas pueden unirse a otro tipo de moléculas además del calcio.
2. Proteínas del dominio EF (EF-hand): su nombre deriva de la orientación espacial de la quinta (E) y la sexta (F) hélices aminoacídicas que, junto con el dominio de enlace a metales, de 12 aminoácidos, forman el lugar de unión del calcio (**Fig.5**) (Bhoyar *et al.*, 2019). La calbindina, la calretinina y la parvalbúmina pertenecen a este grupo.

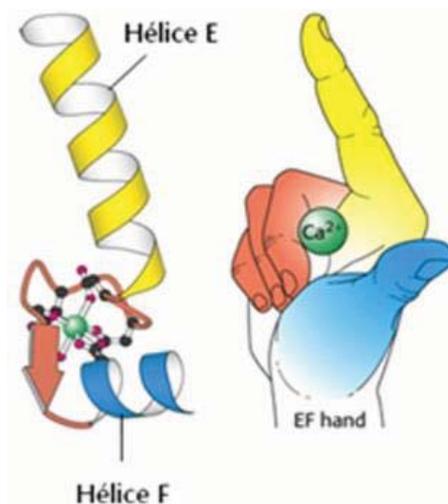


Figura 5: Esquema del dominio EF con las hélices E y F en perpendicular y el lazo formado por 12 aminoácidos. Todo ello comparado con la posición de la mano derecha en la que se imita la disposición de los componentes anteriores. Obtenido de Noebels *et al.*, 2012.

Otros autores clasifican las proteínas ligantes de calcio, atendiendo a su funcionalidad, en amortiguadoras y sensoras. En algunos casos una misma proteína realiza ambas funciones dependiendo de diversos factores, entre ellos, la concentración de calcio. Las tres proteínas ligantes de calcio estudiadas en este proyecto, es decir, calbindina, calretinina y parvalbúmina son amortiguadoras y se encargan de mantener estable la concentración intracelular de calcio (Dudczig *et al.*, 2017).

Calbindina, calretinina y parvalbúmina ya han sido detectadas en la retina de diferentes grupos de animales: ciclóstomos (Vilar-Cheda *et al.*, 2006), peces condriictios (Graña *et al.*, 2008), peces actinopterigios (Doldan *et al.*, 1999; Weruaga *et al.*, 2000; Huesa *et al.*, 2002; Graña *et al.*, 2008), anfibios (Gábriel *et al.*, 1998; Deng

et al., 2001; Morona *et al.*, 2007; Morona *et al.*, 2008), reptiles (Bennis *et al.*, 2005), mamíferos (Nag & Wadhwa, 1996; Jeon & Jeon, 1998; Chiquet *et al.*, 2005; Hwang *et al.*, 2005) e incluso, invertebrados como el pulpo (Altobelli *et al.*, 2018). En el pez cebra, la distribución de estas proteínas no se ha estudiado en la retina mediante técnicas inmunohistoquímicas, pero sí en otras regiones del sistema nervioso como el sistema nervioso entérico (Olsson, 2011), el sistema olfatorio (Kress *et al.*, 2015) y regiones posteriores del encéfalo (Castro *et al.*, 2006). Siendo el pez cebra un organismo modelo tan importante en el estudio del sistema visual sería muy interesante poder conocer cómo es la distribución de estas proteínas en su retina y compararla con observaciones ya realizadas en otras especies, principalmente de teleósteos. Además, también se pueden contrastar con investigaciones acerca de otras proteínas ligantes de calcio en la retina del pez cebra, tales como la calretagonina (Dudczig *et al.*, 2017).

-Parvalbúmina

La parvalbúmina fue aislada por primera vez en el músculo esquelético de animales anamniotas, en los que existen varias isoformas para esta proteína. Su estructura también fue la primera en ser estudiada dentro de las proteínas ligantes de calcio y, posteriormente, se observó que es similar en todas ellas. Su estructura terciaria está compuesta por seis hélices α homólogas, una región N-terminal no helicoidal y cinco bucles β entre las hélices. El peso molecular de toda esta estructura es de 11'5 kDa y los lugares de unión a calcio se encuentran entre las hélices C-D y E-F. En cuanto a su función, se ha relacionado con la protección frente a desórdenes cerebrales, la velocidad de disparo en neuronas inhibitoras o el transporte de calcio en la neurona (Porteros, 1997).

-Calbindina

La calbindina es una proteína con un peso molecular de 28 kDa formada por seis dominios EF, de los cuales cuatro se pueden unir al calcio. En el sistema nervioso, se cree que funciona como tamponador interneuronal del calcio para evitar una acumulación excesiva que podría desencadenar procesos degenerativos. Además, también podría estar implicada en los movimientos celulares y en la regulación de los flujos intracelulares de calcio (Porteros, 1997).

-Calretinina

La calretinina es una proteína con un peso molecular de 29-30 kDa formada por seis dominios EF. Es muy similar a la calbindina ya que existe un 58% de homología en su secuencia, siendo este parecido más marcado en aquellos lugares en los que no se une el calcio. En cuanto a su función, se ha propuesto que es un regulador de la concentración intracelular de calcio, evitando las respuestas citotóxicas debidas a este ión en la célula. También participa en algunas vías bioquímicas mediante la fosforilación de proteínas de membrana. Además, las neuronas de la corteza cerebral que expresan esta proteína son más resistentes a estrés nutritivo y a la entrada masiva de calcio (Porteros, 1997).

Cabe destacar que mediante estudios con mutantes de pez cebra generados en laboratorio se sabe que tanto la calretinina como la calbindina son proteínas esenciales en el desarrollo de esta especie (Bhoyar *et al.*, 2019).

2.5.-Técnicas inmunohistoquímicas

Las técnicas inmunohistoquímicas son una metodología muy usada en la actualidad para detectar componentes específicos en un tejido concreto, para así poder conocer su quimioarquitectura. Estas técnicas se basan en la especificidad de unión entre un antígeno y un anticuerpo al que se le añade un componente fluorescente o una enzima que genere un precipitado coloreado. En este proyecto de investigación se utilizarán tanto las técnicas inmunohistoquímicas con enzimas como con fluorocromos. Gracias a ambos métodos en una sección de tejido se pueden detectar las regiones donde se encuentra una molécula determinada (<https://mmebias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/5-inmuno.php>, 31/07/2020).

Cabe destacar que en este tipo de técnicas pueden usarse diferentes tipos de anticuerpos:

- Anticuerpos monoclonales: en este caso el conjunto de anticuerpos usado solo responde ante un antígeno determinado dentro de la molécula que se quiere detectar.
- Anticuerpos policlonales: en este caso la molécula que se quiere detectar puede tener en su estructura varios puntos que funcionen como antígeno y, por

lo tanto, causan la aparición de varios anticuerpos diferentes. Todos estos anticuerpos pueden recogerse y usarse para la detección de la molécula.

Las técnicas inmunohistoquímicas también se clasifican según la presencia de moléculas intermediarias o no. En el primer caso se habla de métodos indirectos y suele haber un anticuerpo primario específico para la molécula diana y un anticuerpo secundario específico para el primario y que contiene la enzima o el fluorocromo. Estas técnicas son las que más se usan en la actualidad y las que se usarán también en este estudio. En el segundo caso solo se utiliza un anticuerpo específico dirigido contra la molécula diana y que ya contiene la enzima o el fluorocromo (<https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/5-inmuno.php>, 31/07/2020).

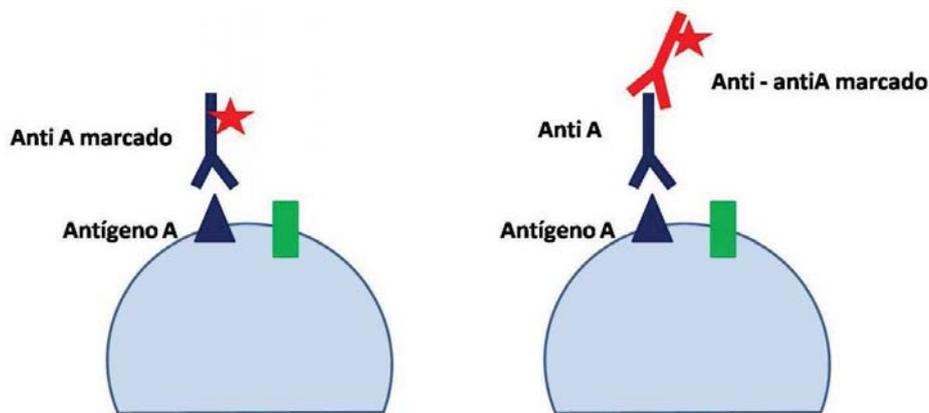


Figura 4: Esquema acerca de cómo funcionan las técnicas inmunohistoquímicas directas (izquierda) e indirectas (derecha). Obtenido de [neurowikia.es](http://www.neurowikia.es) el 17/08/2020. http://www.neurowikia.es/sites/default/files/imagecache/wysiwyg_imageupload_lightbox_preset/wysiwyg_imageupload/inmunohistoquimica_0.jpg

3.-Hipótesis

La hipótesis de partida de este proyecto de investigación es la presencia de las tres proteínas ligantes de calcio citadas (calbindina, calretinina y parvalbúmina) en células específicas de la retina del pez cebra en diferentes estadios de desarrollo del mismo.

4.-Objetivos

Los objetivos generales de este trabajo se basan en conocer la distribución de las proteínas ligantes de calcio en la retina del pez cebra tanto en individuos adultos como en los diferentes estadios del desarrollo (embriones, larvas y juveniles). De esta forma se podrá saber si hay alguna diferencia relacionada con el desarrollo del sistema visual en la retina y, además, se podrán comparar los resultados con los ya existentes en

otras especies, tanto de teleósteos como de vertebrados e invertebrados. Así, el presente proyecto de investigación tiene seis objetivos específicos:

1. Conocer la distribución de las proteínas ligantes de calcio (calbindina, calretinina y parvalbúmina) en la retina de individuos en desarrollo y adultos de pez cebra, *Danio rerio*.
2. Identificar tipos y subtipos celulares según la inmunoreactividad de las células a las proteínas ligantes de calcio, calbindina, calretinina y parvalbúmina.
3. Determinar el momento en el que comienza la expresión de cada una de las proteínas mencionadas anteriormente en los diferentes tipos celulares existentes en la retina.
4. Comparar la distribución entre los individuos que se encuentran en diferentes fases de desarrollo.
5. Comparar la distribución de estas proteínas con la analizada en otras especies animales, principalmente otros peces, para observar si existe alguna tendencia evolutiva o estado ancestral.
6. En base a los puntos anteriores, conocer las posibles funciones de estas proteínas en la retina.

5.-Metodología

5.1.-Animales

Para este estudio se han utilizado ejemplares de pez cebra en diferentes estadios de desarrollo (embrión, larva, juvenil y adulto) debido a las diferencias encontradas en otras especies de peces en relación con la expresión de las proteínas ligantes de calcio a lo largo de distintas fases del desarrollo (Doldan *et al.*, 1999, Weruaga *et al.*, 2000, Vilar-Cheda *et al.*, 2006, Arenzana *et al.*, 2011). La edad de los individuos se expresará tanto en horas tras la fertilización (hpf) como en días tras la fertilización (dpf). Para la elección de los individuos objeto de estudio se ha seguido el procedimiento establecido por Arenzana *et al.* (2011) en el que observaron que la calretinina está presente en el sistema visual del pez cebra durante su desarrollo embrionario. Por ello, se trabajará con embriones de 24, 36, 48 y 60 hpf; larvas de 3, 4 y 5 dpf; juveniles de 10, 15, 21, 30 y 60 dpf y adultos de 90 dpf y 1 año. Los individuos adultos serán obtenidos de acuarios/tanques de mantenimiento del laboratorio de Biología Celular, mientras que el resto se obtendrán por medio del apareamiento de

los anteriores. Tanto el procesamiento como el mantenimiento de los animales se hará acorde a las directivas europeas (2010/63/UE) y la legislación española (RD 53/2013) vigentes en referencia a la investigación con animales de experimentación.

5.2.-Procesamiento de las muestras

5.2.1.-Individuos adultos y juveniles

Para la realización de este proyecto es necesario fijar el tejido previamente. Este proceso debe hacerse antes de que se manifiesten las consecuencias post-mortem, por lo que para ello el animal es anestesiado con metanosulfonato de 3-aminobenzoato de etilo (A5040-25G, Sigma-Aldrich). Una vez anestesiados los individuos, se hace un corte en la región ventral del animal para dejar al descubierto la cavidad torácica y el corazón. Una vez localizado este órgano mediante una cánula se introduce en el torrente sanguíneo el fijador paraformaldehído al 4% en tampón fostato. De esta forma el fijador se va a repartir por todo el cuerpo del animal aprovechando el torrente sanguíneo.

Una vez completada la fijación se deben extraer los ojos de la cabeza, para introducirlos en el fijador durante aproximadamente 20-24 horas. Una vez transcurrido este tiempo debemos extraer el cristalino causando el menor daño posible en el tejido. Para ello se usa un estereomicroscopio. Una vez extraído el cristalino los ojos están listos para ser incluidos en los bloques de parafina y de Tissue Tek.

5.2.2.-Embriones y larvas

En este caso, el procedimiento es diferente. El proceso de fijación no es intracardiaco, sino que se introducirán los ejemplares en la solución fijadora el tiempo que sea requerido dependiendo del tamaño. Además, no es necesario extraer los ojos, sino que se procesará el cuerpo entero del animal.

5.3.-Pruebas control

Primero se realizará un western blotting para conocer la especificidad de los anticuerpos utilizados en el presente proyecto, y descartar la formación de reacciones cruzadas entre los anticuerpos empleados. Para ello se seguirá el procedimiento experimental establecido por Vilar-Cheda *et al.* (2006) para calretinina y calbindina en lamprea, incorporando la parvalbúmina al ensayo.

Para la realización del western, se extraen los encéfalos de los peces procesados en el apartado anterior. Los encéfalos se homogenizan usando el buffer RIPA (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 Mm fenilmetilsulfonilfluoril, 1% Triton X-100, 0´1% sodio dodecilsulfato, 5 µg/mL aprotinina, pH 7.4). Se centrifuga a 20000xg y se extrae el sobrenadante, que se hace precipitar añadiendo metanol al 100% y centrifugando a 100xg. Posteriormente los extractos se resuspenden en RIPA y se cargan en un gel de acrilamida SDS-PAGE para hacer la electroforesis. Después se hace la transferencia a una membrana polivinilideno y se añaden los anticuerpos específicos para las proteínas ligantes de calcio (anti-CB, anti-CR y anti-PV) diluidos. A continuación, las membranas se enjuagan en TBST y se incuban con un anticuerpo secundario HRP-conjugado. Los anticuerpos usados en este ensayo son los mismos que se usarán para la inmunodetección y se especifican más adelante.

Para ser útiles, los resultados del western blotting deben ser comparados con un control. Para ello, se usará un extracto de encéfalo de ratón que se procesará de forma paralela con los de pez cebra.

Por otra parte, durante el transcurso del proyecto, se realizarán varias pruebas control como las realizadas por Porteros (1997):

- Incubación de las secciones en ausencia del primer anticuerpo, es decir, sustitución del anticuerpo primario por suero normal de cabra y desarrollo normal de la técnica
- Preabsorción del primer anticuerpo con el antígeno correspondiente en una cantidad de 100 µg/mL.
- Incubación de las secciones en ausencia del segundo anticuerpo usando una solución tampón.
- En el caso de las muestras de inmunodetección con enzimas se hará un control en el que las muestras únicamente se tratarán con 3,3´diaminobencidina y peróxido de hidrógeno para detectar la presencia de peroxidasas endógenas.

5.4.-Bloques de Tissue Tek

Para preparar los bloques de Tissue Tek primero deben lavarse los ojos dos veces en tampón fosfato 0,1 M pH 7.4 (PB) durante media hora. A continuación, el tejido debe ser crioprotegido para evitar la formación de cristales de hielo que puedan dañarlo. Para ello los ojos se introducen en varias soluciones de sacarosa en tampón fosfato

de concentración creciente: 10% (2-4 horas), 20% (4 horas) y 30% (toda la noche). Una vez completado este proceso, las muestras se introducen en una solución al 50% de sacarosa al 30% de PB y 50% de Tissue Tek durante aproximadamente 3-4 horas. Seguidamente se usa un molde para hacer los bloques. En los moldes se introducen los ojos de los ejemplares juveniles y adultos, así como los embriones y larvas enteros, y se llena de Tissue Tek. El molde se introduce en un recipiente que contiene 2-metilbutano, y éste se enfría con nitrógeno líquido obteniéndose un bloque sólido que debe conservarse a -20°C. Los bloques se seccionan en un criostato, obteniendo secciones transversales de 12 µm de espesor, que se recogen sobre portaobjetos gelatinizados y se conservan en nevera.

5.5.-Bloques de parafina

En el caso de los bloques de parafina lo primero que se debe hacer es deshidratar el tejido. Para ello se introducen los ojos de juveniles y adultos y los embriones y larvas enteros, en varios baños de etanol en concentración creciente (80%, 96% y 100%) y en dos baños de xileno. Una vez deshidratadas, las muestras se infiltran de parafina, sometiéndolas a tres baños de parafina en estufa a 60°C. La duración del primer baño será de 6 horas, el segundo se mantiene toda la noche, y el tercero durante un par de horas.

A continuación, se hacen los bloques de parafina. Así, se colocan los moldes en una placa calefactora (evita que la parafina se solidifique rápidamente), se rellenan con parafina y se colocan las muestras en su interior. Los bloques se dejan enfriar y se seccionan con el micrótopo de rotación, obteniéndose secciones transversales de 12 µm de grosor que se recogen en portaobjetos gelatinizados.

5.6.-Inmunodetección

Para la inmunodetección se van a utilizar dos técnicas diferentes: la inmunofluorescencia y la detección mediante enzimas. Los reactivos utilizados en este estudio y sus diluciones se recogen en la Tabla 2.

En el presente proyecto se detectarán tres proteínas ligantes de calcio, la calbindina, la calretinina y la parvalbúmina, por lo que será necesario usar tres anticuerpos diferentes que se incubarán por separado.

Proteína	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario (inmunofluorescencia)	Anticuerpo secundario (inmunoperoxidasa)
Parvalbúmina	Anticuerpo policlonal de conejo anti-parvalbúmina (PA1-933, Invitrogen)	Inmunoglobulina de cabra anti-conejo conjugada con fluoresceína (GAR-FITC, 65-6111, Invitrogen)	Inmunoglobulina de cabra anti-conejo conjugada con peroxidasa de rábano GAR-HRP (12-348, Sigma-Aldrich)
Calbindina	Anticuerpo monoclonal de ratón anti-calbindina-D28K (C9848, Sigma-Aldrich)	Inmunoglobulina de cabra anti-ratón conjugada con fluoresceína (GAM-FITC, F2761, Invitrogen)	Inmunoglobulina de cabra anti-ratón marcada con peroxidasa de rábano GAM-HRP (A0168-1 mL, Sigma-Aldrich)
Calretinina	Anticuerpo policlonal de conejo anti-calretinina (PA5-32287, Invitrogen)	Inmunoglobulina de cabra anti-conejo conjugada con fluoresceína (GAR-FITC, 65-6111, Invitrogen)	Inmunoglobulina de cabra anti-conejo conjugada con peroxidasa de rábano GAR-HRP (12-348, Sigma-Aldrich)

Tabla 2: Anticuerpos utilizados a lo largo del proyecto para la inmunofluorescencia y la inmunodetección mediante enzimas.

5.6.1.-Inmunofluorescencia

Esta técnica se va a emplear con las secciones obtenidas con el criostato e incluidas en Tissue Tek. Lo primero que se debe hacer es eliminar el medio de inclusión mediante dos lavados con tampón fosfato salino 0,01M pH 7.4 (PBS) de 10 minutos de duración cada uno. A continuación, se realiza la recuperación antigénica con el fin de hacer accesibles los lugares de unión del antígeno. Para esto, las secciones se introducen en un baño con tampón ácido cítrico-citrato sódico (pH 6) a una temperatura de 95 °C durante 30 minutos. Después hay que eliminar la posible autofluorescencia endógena que pueda haber en las muestras introduciéndolas en una solución de borohidruro de sodio 0,1 M durante otros 30 minutos. Antes de cada uno de estos dos pasos es necesario lavar las preparaciones en dos baños de PBS de 10 minutos de duración. Una vez completados estos pasos, se realiza un lavado en PBS-T (PBS con Tritón x-100 al 0,01%) de 10 minutos. Posteriormente las muestras se incuban en suero normal de cabra (NGS) diluido (1:10) en

PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Transcurrido este tiempo, incubaremos con cada uno de los tres anticuerpos primarios específicos (Tabla 2) que se encuentran a una dilución 1:500 en PBS, durante toda la noche a temperatura ambiente y en cámara húmeda.

Una vez incubadas las muestras con los anticuerpos primarios, se realizan dos lavados de diez minutos con PBS y PBS-T. A continuación, se incuban las secciones con los correspondientes anticuerpos secundarios (Tabla 2) a una dilución 1:100 en PBS, durante una hora, en cámara húmeda y en oscuridad. Por último, se hacen dos baños de PBS de 10 minutos y se montan los portaobjetos con glicerol. Las muestras así obtenidas deben guardarse en nevera y protegidas de la luz.

5.6.2.-Inmunodetección mediante enzimas: inmunoperoxidasa

Esta técnica se va a usar con las secciones incluidas en parafina. En primer lugar, se elimina la parafina de las secciones mediante baños de xileno y, posteriormente, se rehidratan en soluciones de etanol de concentraciones decrecientes. A continuación, se realiza la recuperación antigénica sometiendo las muestras a un baño en tampón de ácido cítrico-citrato sódico 0'1 M y pH 6 a 95°C durante 30 minutos. Tras este tratamiento se hacen dos lavados de PBS una vez atemperadas las muestras. Para eliminar la posible actividad peroxidasa endógena, se someten las secciones a una disolución de peróxido de hidrógeno al 3% en PBS durante 30 minutos. Posteriormente se realiza un lavado con PBS y otro en PBS-T y se incuban las muestras con NGS diluido 1:10 en PBS durante 1 hora. Transcurrido el tiempo, se incuban con los correspondientes anticuerpos primarios específicos (Tabla 2) diluidos 1:500 en PBS, durante toda la noche y en cámara húmeda.

Al día siguiente se añaden los anticuerpos secundarios (Tabla 2) en una dilución de 1:100 y se dejan incubar 1 hora. Terminado el proceso, se hacen dos lavados con PBS de 10 minutos y se incuba la muestra con una solución de diaminobencidina (DAB, D5637-56 Sigma-Aldrich) al 0,06% en PBS y peróxido de hidrógeno al 0,005%. La reacción se completa y se forma un precipitado marrón visible al microscopio óptico. A continuación, se realizan dos lavados en PBS de 10 minutos. Para terminar el proceso, las secciones se deshidratan en baños de etanol de concentración creciente durante unos 5 minutos cada uno y posteriormente, en cuatro baños de

xileno durante el mismo tiempo. Para finalizar, se montan los portaobjetos con el medio de montaje Eukitt y se dejan en la estufa 24 horas a 36°C.

5.7.-Procesamiento de las imágenes

Para la visualizar y fotografiar las preparaciones obtenidas con la técnica de inmunofluorescencia se utiliza un microscopio de epifluorescencia (Nikon eclipse 90i) con una cámara acoplada (Olympus DP71); mientras que las preparaciones realizadas con la inmunoperoxidasa, se observan en un microscopio óptico (Nikon, Eclipse, E1000) con una cámara digital acoplada (Nikon, Camera Dmx 1200, Tokio, Japón). Una vez obtenidas las imágenes, para editarlas y destacar en ellas las estructuras estudiadas se usa el programa Corel DRAW X8.

6.-Plan de trabajo

Este proyecto de investigación está estructurado para que tenga una duración aproximada de 1 año y tres meses, tomando como punto inicial la obtención de huevos de pez cebra. En la tabla 3 se recoge la distribución temporal de todos los procesos necesarios para llevar a cabo este proyecto. En esta tabla se observa un salto temporal del 5º al 13º mes debido a la necesidad de esperar que los individuos de un año crezcan lo suficiente.

Meses		Plan de trabajo																								
		1°			2°			3°			4°			5°			13°			14°			15°			
Semanas		1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°	1°	2°	3°	4°	
Cruce de los peces																										
Puesta de los huevos																										
Procesamiento de las muestras																										
Bloques de parafina																										
Bloques de Tissue Tek																										
Western blotting																										
Inmunodetección mediante fluorocromos																										
Inmunodetección mediante enzimas																										
Procesamiento de las imágenes																										
Análisis de los resultados																										
Publicación de los resultados																										

Tabla 3: Esquema detallado del plan de trabajo para el proyecto.

7.-Cuestiones éticas y legislativas

Como ya se ha mencionado en el apartado de metodología, el presente trabajo se realizará respetando en todos los procesos las leyes españolas referentes a animales de experimentación (RD 53/2013) así como la Directiva Europea 2010/63/UE para la protección de animales usados con fines científicos. A lo largo de este proyecto también se tratará de seguir al máximo los principios de reemplazo, reducción y refinamiento recogidos en la presente legislación. De esta forma se evitará el uso innecesario de individuos y se velará por causar el mínimo dolor posible durante la eutanasia.

Debido a la naturaleza de este proyecto es necesario que el personal que lo lleve a cabo tenga la capacitación necesaria para realizar todos los procedimientos, o bien ser supervisado por alguien que la posea. Además, durante el cuidado de los animales, se respetarán en todo momento las indicaciones presentes en la sección B del Anexo II del Real Decreto 53/2013. Para este fin también habrá un órgano encargado del bienestar de los animales (OEBA) cuyas funciones están especificadas en el artículo 38 del RD 53/2013.

Cumpliendo todos los requisitos, el proyecto debe ser aceptado por la autoridad pertinente que, en este caso, es el Comité de Ética de la Universidade da Coruña.

8.-Aplicabilidad

Las proteínas ligantes de calcio han sido estudiadas en la retina de especies muy diversas mediante técnicas inmunohistoquímicas. Sin embargo, en un organismo modelo tan importante para el estudio del desarrollo del sistema visual como el pez cebra, aún no existen este tipo de análisis. Por lo tanto, el presente proyecto de investigación permitirá conocer la distribución de las proteínas ligantes de calcio, calbindina, calretinina y parvalbúmina, en la retina del pez cebra adulto y a lo largo de su desarrollo. De esta manera, estas proteínas también podrán servir como marcadores de distintos tipos o subtipos celulares de la retina en las diferentes etapas del desarrollo.

Por otra parte, conocer el patrón de expresión de estas proteínas a lo largo del desarrollo nos acercará a un mayor conocimiento de su función si se compara el momento y lugares de expresión con los eventos que ocurren en la retina de forma

general y en cada tipo celular en particular. Estas hipótesis serán válidas para la retina del pez cebra, y serán aplicables a otras especies si los patrones de expresión observados son similares (en caso de ver semejanzas claras en este patrón de expresión).

Por lo tanto, en definitiva, este proyecto será interesante para los estudiosos de la quimioarquitectura de la retina, así como del sistema visual del pez cebra. También es importante para aquellos que investigan la búsqueda de nuevos marcadores para poblaciones neuronales en la retina, ya que la calretinina, la calbindina y la parvalbúmina podrían ser nuevos indicadores de poblaciones celulares concretas no solo en el estado adulto, sino también en diferentes etapas del desarrollo de la retina.

9.-Plan de difusión de los resultados

Como se menciona en el apartado anterior, este proyecto es interesante principalmente para todos aquellos que se dedican al estudio de la quimioarquitectura del sistema nervioso en el pez cebra o bien para aquellas personas o grupos de investigación que tratan de buscar nuevos marcadores neuronales y gliales. Por lo tanto, el plan de difusión de los resultados debe estar enfocado hacia ese ámbito al menos en lo que se refiere a la publicación de los resultados.

Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente, una vez obtenidos los resultados, éstos se publicarán en revistas relacionadas con estos estudios. Estas revistas se han escogido en función de los artículos citados en la bibliografía que muestran resultados similares a los que se obtendrán en el presente proyecto de investigación. Para la elección de estas publicaciones se valorará principalmente el factor de impacto obtenido del Journal Citation Report 2019. Además, también se priorizarán aquellas publicaciones que garanticen el acceso gratuito a los resultados como parte del concepto de Ciencia Abierta en el que se garantiza el acceso a todo el mundo sin necesidad de haber una suscripción o pago por el artículo.

Además de la publicación de los resultados en revistas, también hay otros métodos que se pueden utilizar para la difusión de los resultados. Estos incluyen la participación en congresos y en jornadas, o la organización de eventos divulgativos o seminarios, organizados por la propia universidad, para dar a conocer las investigaciones que se realizan. Con este fin, sería muy útil la elaboración de presentaciones o posters de tipo divulgativo que dieran a conocer los resultados de forma resumida.

10.-Recursos necesarios

Este trabajo de investigación está pensado para realizarse en el laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña, donde se encuentran los equipos necesarios para: el procesamiento de los animales y de las muestras, la observación de las preparaciones y la obtención y mantenimiento de los ejemplares durante todo su proceso de desarrollo (Tabla 4).

Materiales y reactivos necesario para el proyecto presentes en el laboratorio
Acuarios/tanques
Alimento
Cubeta para anestésiar a los peces
Tijeras y pinzas de laboratorio
Estereomicroscopio
Jeringuilla y cánula para perfundir
Extractor
Recipientes para poder deshidratar las muestras
Estufa
Placa calefactora
Moldes para los bloques de parafina
Microtomo de rotación
Molde para los bloques de Tissue Tek
Cubículo de poliespán para verter nitrógeno líquido
Criostato
Nevera para el mantenimiento de los bloques y secciones en Tissue Tek
Baño termostático
Centrifugadora
Sonicador
Cámara de incubación
Microscopio de epifluorescencia (Nikon eclipse 90i)
Cámara digital (Olympus DP71)

Microscopio óptico (Nikon, Eclipse E1000)
Cámara digital (Nikon, Camera Dmx 1200)
Tampón fosfato 0´1 M pH 7´4
Nitrógeno líquido
PBS
PBS-T
Tampón ácido cítrico-citrato sódico 0´1 M y pH 6
Tampón Tris 1M pH 6´8
Etanol (80%, 96% y 100%)

Tabla 4: Materiales y reactivos necesarios para el proyecto presentes en el laboratorio.

Además de estos equipos, durante el transcurso del proyecto se necesitarán una serie de reactivos que será necesario comprar a casas comerciales (Tabla 5).

Material		Unidades	Coste (€)
Metanosulfonato de 3-aminobenzoato de etilo (A5040-25G, Sigma-Aldrich)		1	176´00
Paraformaldehído al 4% en PBS (J61899.AP, Alfa Aesar)		1	78´90
Buffer RIPA (J62289.AP, Alfa Aesar)		1	48´90
Metanol 100% (34860-1L-R, Sigma-Aldrich)		1	28´90
Xileno (8080.2500, JT Baker)		1	119´00
Parafina Shandon (501006, Thermo Scientific)		1	99´95
Tissue Tek		1	52´72
Sacarosa (10634932, Fisher Chemical S/8600/60)		1	52´90
2-metilbutano 99% (126470010, Acros organics)		1	93´40
Suero normal de cabra (NGS) (G6767, Sigma-Aldrich)		1	62´40
Diaminobencidina (DAB, D5637-56, Sigma-Aldrich)		1	200´00
Anticuerpos primarios	Anticuerpo policlonal de conejo anti-parvalbúmina (PA1-933, Invitrogen)	1	704´00
	Anticuerpo monoclonal de ratón anti-calbindina-D28K (C9848, Sigma-Aldrich)	1	406´00
	Anticuerpo policlonal de conejo anti-calretinina (PA5-32287, Invitrogen)	1	363´00

Anticuerpos secundarios (inmunodetección con enzimas)	Inmunoglobulina de cabra anti-ratón marcada con peroxidasa de rábano GAM- HRP (A0168-1 mL, Sigma- Aldrich)	1	301'00
	Inmunoglobulina de cabra anti-conejo conjugada con peroxidasa de rábano GAR- HRP (12-348, Sigma- Aldrich)	1	215'00
Anticuerpos secundarios (inmunofluorescencia)	Inmunoglobulina de cabra anti-ratón conjugada con fluoresceína (GAM-FITC, F2761, Invitrogen)	1	158'00
	Inmunoglobulina de cabra anti-conejo conjugada con fluoresceína (GAR-FITC, 65-6111, Invitrogen)	1	157'00

Tabla 5: Recursos necesarios para el proyecto y presupuesto.

Sumando todos los procesos de los que consta el proyecto se necesitaría una financiación total de 3317'07€. Este presupuesto está basado en el precio por unidad de cada producto, por lo que este resultado inicial podría verse incrementado.

11.-Bibliografía

Akopian, A. & Witkovsky, P. (2002). Calcium and retinal function. *Molecular Neurology*, 25: 113-132.

Altobelli, G.G., Van Noorden, S., Cimini, V. (2018). Calcium-binding protein and some neuropeptides in the retina of *Octopus vulgaris*: A morpho-histochemical study. *J. Cell Physiol.* 233: 6866-6876.

Anadón, R., Díaz, M.L., Becerra, M., Manso, M.J. (2002). Presence of thyrotropin-releasing-hormone-immunoreactive (TRHir) amacrine cells in the retina of anuran and urodele amphibians. *Brain Research* 926: 86–93.

Arenzana, F.J., Santos-Ledo, A., Porteros, A., Aijón, J., Velasco, A., Lara, J.M., Arévalo, R. (2011). Characterisation of neuronal and glial populations of the visual system during zebrafish lifespan. *Int. J. Dev. Neuroscience* 29: 441-449.

Bennis, M., Versaux-Botteri, C., Repérant, J., Armengol, J.A. (2005). Calbindin, calretinin and parvalbumin immunoreactivity in the retina of the chameleon (*Chamaeleo chamaeleon*). *Brain Behav. Evol.* 65: 177-187.

Bhoyar, R.C., Jadhao, A.G., Sabharwal, A., Ranjan, G., Sivasubbu, S., Pinelli, C. (2019). Knockdown of calcium-binding *calb2a* and *calb2b* genes indicates the key regulator of the early development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Brain Structure and Function*, 224: 627-642.

Bollmann, J.H. (2019). The zebrafish visual system: from circuits to behavior. *Annual Review of Vision Science* 5: 269-293.

Brockerhoff, S.E., Dowling, J.E., Hurley, J.B. (1998). Zebrafish retinal mutants. *Vision Research*, 38: 1335-1339.

Castro, A., Becerra, M., Manso, M.J., Anadón, R. (2006). Calretinin immunoreactivity in the brain of zebrafish, *Danio rerio*: Distribution and comparison with some neuropeptides and neurotransmitter-synthesizing enzymes. II midbrain, hindbrain and rostral spinal cord.

Charlton-Perkins, M., Almeida, A.D., MacDonald, R.B. (2019). Genetic control of cellular morphogenesis in Müller glia. *Glia* 67: 1401-1411.

Chiquet, C., Dkhissi-Benyahya, O., Cooper, H.M. (2005). Calcium-binding protein distribution in the retina of strepsirhine and haplorhine primates. *Brain Research Bulletin* 68: 185-194.

Deng, P., Cuenca, N., Doerr, T., Pow, D.V., Miller, R., Kolb, H. (2001). Localization of neurotransmitters and calcium binding proteins to neurons of salamander and mudpuppy retinas. *Vision Research* 41: 1771-1783.

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.

Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 276, 33-79.

Doldan, M.J., Prego, B., De Miguel Villegas, E. (1999). Immunocytochemical localization of calretinin in the retina of the turbot (*Psetta maxima*) during development. *The Journal of Comparative Neurology* 406: 425-432.

Dudczig, S., Currie, P.D., Jusuf, P.G. (2017). Developmental and adult characterization of secretagogin expressing amacrine cells in zebrafish retina. *PLoS ONE* 12: e0185107.

Gábrriel, R., Völgyi, B., Pollak, E. (1998). Calretinin-immunoreactive elements in the retina and optic tectum of the frog *Rana esculenta*. *Brain Research* 782: 53-62.

Graña, P., Anadón, R., Yáñez, J. (2008). Immunocytochemical study of calretinin and calbindin D-28K expression in the retina of three cartilaginous fishes and a cladistian (*Polypterus*). *Brain Research Bulletin* 75: 375-378.

Huesa, G., Yáñez, J., Anadón, R. (2002). Calbindin and calretinin immunoreactivities in the retina of a chondrosteian, *Acipenser baeri*. *Cell Tissue Res* 309: 355-360.

Hwang, I.K., Yoo, K.Y., Kim, D.S., Jung, J.Y., Shin, M.C., Seo, K., Kim, K.S., Kang, T.C., Won, M.H. (2005). Comparative study on calretinin immunoreactivity in gerbil and rat retina. *Anat. Histol. Embryol.* 34: 129-131.

Jadhav, A.P., Roesch, K., Cepko, C.L. (2009). Development and neurogenic potential of Müller glial cells in the vertebrate retina. *Progress in Retinal and Eye Research* 28: 249-262.

Jeon, M.H., Jeon, C.J. (1998). Immunocytochemical localization of calretinin containing neurons in retina from rabbit, cat and dog. *Neuroscience Research* 32: 75-84.

Kalueff, A.V., Stewart, A.M., Gerlai, R. (2014). Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35: 63-75.

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F. (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics* 203: 253-310.

Kress, S., Biechl, D., Wullmann, M.F. (2015). Combinatorial analysis of calcium-binding proteins in larval and adult zebrafish primary olfactory system

identifies differential olfactory bulb glomerular projection fields. *Brain Struct. Funct.* 220: 1951-1970.

MacDonald, R.B., Charlton-Perkins, M., Harris, W. (2017). Mechanisms of Müller glial cell morphogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*, 47: 31-37.

Malicki, J. (2000). Harnessing the power of forward genetics – analysis of neuronal diversity and patterning in the zebrafish retina. *Trends Neurosci.* 23: 531-541.

Morona R., Moreno, N., López, J.M., González, A. (2007). Comparative analysis of calbindin D-28K and calretinin in the retina of anuran and urodele amphibians: Colocalization with choline acetyltransferase and tyrosine hydroxylase. *Brain Research* 1182: 34-49.

Morona, R., Moreno, N., López, J.M., Muñoz, M., Domínguez, L., González, A. (2008). Calbindin-D28k and calretinin as markers of retinal neurons in the anuran amphibian *Rana perezii*. *Brain Research Bulletin* 75: 379-383.

Nag, T.C., Wadhwa, S. (1996). Calbindin and parvalbumin immunoreactivity in the developing and adult human retina. *Developmental Brain Research* 93: 23-32.

Niklaus, S., Neuhauss, S.C.F. (2017). Genetic approaches to retinal research in zebrafish. *Journal of Neurogenetics*, 31: 70-87.

Noebels, J.L., Avoli, M., Rogawski, M.A., Olsen, R.W., Delgado-Escueta, A.V. (2012). Jasper's basic mechanisms of the Epilepsies. 4th edition. p.1276. National Center for Biotechnology Information (US) Bethesda (MD). Obtenido de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK98188/>

Olsson, C. (2011). Calbindin immunoreactivity in the enteric nervous system of larval and adult zebrafish (*Danio rerio*). *Cell Tissue Res.* 344: 31-41.

Porteros, A.F. (1997). Expresión de proteínas ligantes de calcio durante la ontogenia del sistema nervioso central de teleósteos. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.

Real Decreto 53/2013 del Ministerio de la Presidencia, de 1 de febrero de 2013, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. *Boletín Oficial del Estado*, 34, 11370-11421.

Schmitt, E.A., Dowling, J.E. (1999). Early retinal development in the zebrafish, *Danio rerio*: Light and electron microscopic analyses. *The Journal of Comparative Neurology* 404: 515-536.

Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., Smith, C. (2008). The behavior and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83:13-34.

Vilar-Cheda, B., Abalo, X.M., Anadón, R., Rodicio, M.C. (2006). Calbindin and calretinin immunoreactivity in the retina of adult and sea lamprey. *Brain Research* 1068: 118-130.

Weruaga, E., Velasco, A., Briñón, J.G., Arévalo, R., Aijón, J., Alonso, J.R. (2000). Distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin D-28k and calretinin in the retina of two teleosts. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 19: 1-15.

Páginas web:

Atlas de histología animal y vegetal de la Universidad de Vigo. (31/07/2020)
Técnicas histológicas: inmunohistoquímica. Obtenido de:
<https://mmeqias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/5-inmuno.php>

Goodfreephotos (29/07/2020). Zebrafish – *Danio rerio* [Archivo de imagen].
Recuperado de: <https://www.goodfreephotos.com/animals/fish/zebrafish-danio-rerio.jpg.php>

Neurowikia.es. (17/08/2020). Inmunohistoquímica [Archivo de imagen].
Recuperado de:
http://www.neurowikia.es/sites/default/files/imagecache/wysiwyg_imageupload_lightbox_preset/wysiwyg_imageupload/inmunohistoquimica_0.jpg