



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

Facultad de Ciencias
Departamento de Biología
Área de Biología Celular

Trabajo de Fin de Máster Proyecto de investigación

Caracterización del techo óptico del pez cebra adulto (*Danio rerio*) mediante técnicas inmunohistoquímicas

Caracterización do teito óptico do peixe cebra adulto (*Danio rerio*) mediante técnicas inmunohistoquímicas

Characterization of the optic tectum of the adult zebrafish (*Danio rerio*) by immunohistochemical techniques



Antía Vázquez Araújo

Septiembre, 2020

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

**Facultad de Ciencias
Departamento de Biología
Área de Biología Celular**

Caracterización del techo óptico del pez cebra adulto (*Danio rerio*) mediante técnicas inmunohistoquímicas

Caracterización do teito óptico do peixe cebra adulto (*Danio rerio*) mediante técnicas inmunohistoquímicas

Characterization of the optic tectum of the adult zebrafish (*Danio rerio*) by immunohistochemical techniques

Trabajo de Fin de Máster que presenta la alumna del Máster de Neurociencia 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, Septiembre de 2020

ÍNDICE

Resumen.....	1
1. Estado del arte de la investigación propuesta.....	3
1.1 Anatomía externa y fisiología del pez cebra.....	3
1.2 Sistema Nervioso Central: techo óptico.....	4
1.3 Técnicas inmunohistoquímicas.....	6
1.4 Proteínas ligantes de calcio.....	8
2. Hipótesis.....	12
3. Objetivos del proyecto.....	12
4. Metodología.....	13
4.1 Procesamiento de las muestras.....	13
4.2 Bloques de Parafina.....	13
4.3 Bloques de Tissue Tek.....	14
4.4 Inmunodetección mediante enzimas: técnica de la inmunoperoxidasa.....	15
4.5 Inmunodetección mediante fluorocromos.....	16
4.6 Procedimiento.....	17
4.7 Pruebas control.....	17
4.8 Procesamiento de las imágenes.....	18
5. Plan de trabajo.....	19
6. Implicaciones éticas y/o de bioseguridad.....	20
7. Aplicabilidad.....	20
8. Plan para la difusión de los resultados.....	20
9. Recursos necesarios.....	21
10. Conclusiones o hechos que se pretenden alcanzar.....	25
ANEXO A.....	26
11. Bibliografía.....	27

RESUMEN

El techo óptico es una estructura que está presente en la superficie dorsal del mesencéfalo, cuya función principal es la localización de un estímulo en el espacio, por lo que constituye el centro visual principal. Mediante el estudio de las proteínas ligantes de calcio “EF- hand” (calretinina, calbindina y parvalbúmina) por medio de técnicas inmunohistoquímicas (enzimáticas y fluorocromáticas), este proyecto tiene como objetivo la caracterización de esta estructura de interés. Todo el procedimiento será llevado a cabo en el pez cebra adulto, *Danio rerio*, una especie de la familia de los ciprínidos que se ha convertido en el organismo modelo por excelencia en campos tales como la neurofarmacología. Además, cabe destacar que, mediante la caracterización de esta estructura encefálica, se pretende facilitar la investigación de anomalías en estudios posteriores con el fin de conocer las patologías que puedan afectar al sistema nervioso.

Palabras clave: techo óptico, mesencéfalo, proteínas ligantes de calcio, técnicas inmunohistoquímicas, *Danio rerio*.

RESUMO

O teito óptico é unha estrutura que está presente na superficie dorsal do mesencéfalo, a súa función principal é a localización dun estímulo no espazo, polo que constitúe o centro visual principal. Mediante o estudo das proteínas ligantes de calcio “EF- hand” (calretinina, calbindina e parvalbúmina) por medio de técnicas inmunohistoquímicas (enzimáticas e fluorocromáticas), este proxecto ten como obxectivo a caracterización desta estrutura de interés. Todo o procedemento levarase a cabo no peixe cebra adulto, *Danio rerio*, unha especie da familia dos ciprínidos, é un organismo modelo por excelencia en campos tan relevantes como a neurofarmacoloxía. Ademais, cabe destacar que mediante a caracterización desta estrutura encefálica, preténdese facilitar a investigación de anomalías en estudos posteriores co fin de coñecer as patoloxías que poidan afectar ao sistema nervioso.

Palabras clave: teito óptico, mesencéfalo, proteínas ligantes de calcio, técnicas inmunohistoquímicas, *Danio rerio*.

SUMMARY

The optic tectum is a structure present on the dorsal surface of the midbrain, whose function is the location of a stimulus in space, therefore it constitutes the main visual center. Through the study of the calcium-binding proteins "EFhand" (calretinin, calbindin and parvalbumin) by immunohistochemical techniques (enzymatic and fluorochromatic), this project aims to characterize this structure of interest. The entire process will be done in the adult zebrafish, *Danio rerio*, which belongs to the cyprinid family and which has become the model organism par excellence in fields such as neuropharmacology. In addition, it should be noted that by characterizing this brain structure, it is intended to facilitate the investigation of anomalies in subsequent studies in order to know the pathologies that may affect the nervous system.

Key words: optic tectum, midbrain, calcium-binding proteins, immunohistochemical techniques, *Danio rerio*.

1. Estado del arte de la investigación propuesta

1.1 Anatomía externa y fisiología del pez cebra

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

Se distribuye por el sur y el este asiático, comprendiendo los países de Pakistán, Birmania, India y Nepal (Figura 1). Su hábitat abarca lagos poco profundos y estanques, es decir, lugares abiertos con agua relativamente clara y con abundante vegetación en los márgenes (Spence et al., 2008).



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

Se trata de un teleósteo omnívoro cuya dieta se basa en larvas de mosquito y de otras especies de insectos (zooplacton), así como algas microscópicas o fitoplacton (<http://seresmodelicos.csic.es/peix.html>. Última consulta: 30/01/2020).

Danio rerio tiene una forma fusiforme y su cuerpo está comprimido lateralmente. En raras ocasiones supera los 40 mm de longitud desde la boca hasta la aleta caudal. Se caracteriza por poseer 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 muestra unas franjas similares, sin embargo, la aleta dorsal presenta un borde superior de color azul oscuro, bordeado de blanco (Spence et al., 2008).

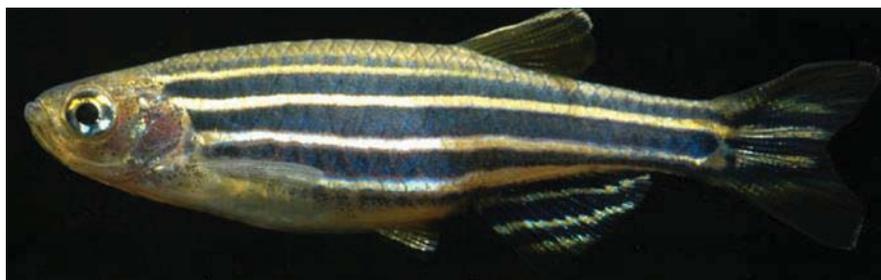


Figura 2. Pez cebra (*Danio rerio*). Fuente:

http://fishbase.sinica.edu.tw/FieldGuide/FieldGuideSummary.php?genusname=Danio&speciesname=rerio&_code=608&print=. Última consulta: 31/1/2020.

En estado natural, la época de apareamiento tiene lugar entre abril y agosto. Se trata de una especie ovípara y la puesta ocurre en los márgenes de los ríos. Los huevos suelen eclosionar a los 2 o 3 días de ser fertilizados y los individuos llegan a la madurez reproductiva a los 5 o 6 meses (Rocha et al., 2002). Además, las hembras pueden aparearse cada 2-3 días (Spence et al., 2008). En condiciones de laboratorio, el potencial reproductivo de las hembras es de 200 huevos aproximadamente (Rocha et al., 2002), el desarrollo embrionario tiene lugar en 24 horas y las larvas empiezan a alimentarse de forma independiente a los 5 días (<http://seresmodelicos.csic.es/peix.html>. Última consulta: 30/01/2020).

El pez cebra se ha asentado como el organismo modelo en diferentes campos, tales como la neurofarmacología, biología del desarrollo, neurofisiología y biomedicina (Losada et al., 2012). Esto es consecuencia de su pequeño tamaño, así como de que es fácil de criar y mantener, ya que su ciclo de vida es corto y las puestas son muy numerosas y ópticamente transparentes (Rocha et al., 2002). Los embriones vivos pueden ser manipulados a lo largo del desarrollo debido a que la fertilización es externa (Spence et al., 2008). Cabe destacar que 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: techo óptico

El techo óptico (Figura 3) es una estructura presente en la superficie dorsal mesencefálica (Northmore, 2011). Su función principal es localizar un estímulo en el espacio y hacer que el animal se oriente al estímulo mediante movimientos corporales (cuello y ojos principalmente). Constituye el centro visual, pero también está relacionado con fibras que

proceden de otros centros sensoriales, como los del oído y la línea lateral, las zonas sensitivas somáticas y la nariz, mediante los hemisferios cerebrales. Cabe mencionar que en el techo también pueden originarse respuestas motoras. En lo relativo a los peces, el techo óptico es una estructura fundamental debido a que es el centro de mayor influencia sobre la actividad corporal. Su desarrollo y funcionalidad está relacionado con el hábitat del animal, siendo mayor en hábitats luminosos y complejos (Butler & Hodos, 2005).

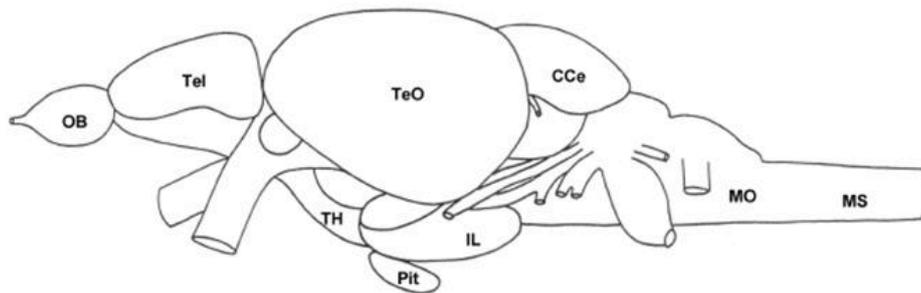


Figura 3. Visión lateral del cerebro del pez cebra. Cce, *corpus cerebelli*; IL, inferior lobe; MO, *medulla oblongata*; MS, *medulla spinalis*; OB, olfactory bulb; Pit, pituitary; Tel, telencephalon; **TeO, tectum opticum**; TH, *tuberal hypothalamus*. Fuente: Kreke & Dietrich, 2008.

En general, el *tectum* se organiza en una serie de capas o estratos desde su superficie externa hasta el núcleo paraventricular, que está ausente en mamíferos y peces marinos. Las capas se estructuran en: superficial, central y periventricular o ventral (Northmore, 2011). Cada capa presenta diferentes clases de neuronas, así como recibe diferentes tipos de información sensorial y proyecta a diferentes centros neuronales; por esta razón, muestra divisiones funcionales que son únicas. A las capas externas se transmiten principalmente proyecciones retinotectales; sin embargo, a las más profundas llega información somatosensorial (Maximino, 2008). Dentro de la multitud de células existentes en el techo óptico, destacan las células piriformes, cuyas dendritas se extienden a través de capas tectales y se orientan radialmente, limitándose a una banda o subcapa particular. Esta disposición permite que la información entrante de diferentes sistemas se segregue en los ejes dendríticos de las neuronas individuales, así como también permite que los diferentes sistemas sensoriales estén espacialmente registrados (Butler & Hodos, 2005).

El techo óptico de peces actinopterigios presenta un mayor grado de complejidad, mayormente ligado a la ecología de la especie. En general, presenta neuronas piriformes, horizontales y multipolares, así como una población de neuronas espinosas ramificadas

(Maximino, 2008). Además, las capas superficiales son principalmente visuales y las capas más profundas son multimodales y motoras (Northmore, 2011).

Dentro de los peces actinopterigios, distinguimos dos grupos, teleósteos y no teleósteos. El techo óptico de teleósteos, como es el caso de *Danio rerio* o pez cebra, se divide en 3 capas claramente delimitadas, como se ha indicado anteriormente. En general, las células piriformes son abundantes, así como presenta células piramidales (Ferreño, 2014). Estas células tienen una dendrita apical extensamente ramificada y espinosa y una dendrita basal que se ramifica profusamente en el plano horizontal, las cuales no existen en todos los vertebrados. En el techo óptico de los teleósteos también están presentes los tanicitos o células endimarias, no neurales, cuyo cuerpo celular se encuentra en la capa endimaria y presenta una larga dendrita apical. Las fibras aferentes terminan, en su mayoría, en la capa superficial y algunas en la capa central, al igual que en el caso anterior. Recibe aferencias de núcleos del telencéfalo y el diencefalo, las primeras surgen de la zona central del palio. También recibe aferencias del mesencéfalo, que surgen del techo óptico contralateral, el *torus semicircularis*, el núcleo del istmo y el tegmento dorsolateral. Las proyecciones eferentes están muy extendidas y, en algunos casos, son recíprocas. Proyecta hacia el mesencéfalo, hacia el techo contralateral, núcleo del istmo y tegmento dorsolateral. En cuanto a las proyecciones eferentes descendentes, destaca la de la formación reticular mesencefálica, lo cual parece estar relacionado con la orientación. Proyecta también al diencefalo, sobre todo al pretecho y al tálamo dorsal. En este último destacan el núcleo anterior y dorsal posterior, el cual proyecta al telencéfalo (Butler & Hodos, 2005).

1.3 Técnicas inmunohistoquímicas

Las técnicas inmunohistoquímicas posibilitan la detección y localización del antígeno de interés tanto en órganos como *in situ* en secciones de tejido gracias al uso de anticuerpos que se unen de forma específica a ese antígeno (Paz, 2015). Es una técnica basada en la gran especificidad y afinidad que tienen los anticuerpos para reconocer distintas moléculas y unirse a ellas. La combinación de estos anticuerpos con enzimas o sustancias fluorescentes permite dicha detección aunque se encuentren en cantidades muy reducidas en el tejido de interés. Los anticuerpos empleados en las diferentes técnicas inmunohistoquímicas son del tipo G, que son producidos por los linfocitos B durante la respuesta inmune. Estos anticuerpos se obtienen mediante la producción masiva animal tras la inyección de una molécula extraña (antígeno), los cuales pasan al

suero sanguíneo, donde son extraídos y purificados. Cabe destacar que existen moléculas complejas, como es el caso de las proteínas, cuya estructura puede presentar varios antígenos, por lo que cada uno de ellos va a desencadenar una respuesta inmune, dando lugar a un linaje diferente de linfocitos B. Los anticuerpos de todos estos linajes se recogerán en el suero sanguíneo, dando lugar a anticuerpos policlonales (Figura 4) (<https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/5-inmuno.php>. Última consulta: 31/1/2020). Sin embargo, *in vitro* cabe la posibilidad de cultivar estos diferentes linajes con el fin de obtener un solo tipo de inmunoglobulina G que reconocerá a un solo tipo de antígeno, es lo que se conoce como anticuerpo monoclonal (García, 2011). Ambos tipos serán empleados en esta investigación.



Figura 4. Tipos de anticuerpos. A la izquierda anticuerpos policlonales uniéndose a diferentes epítopes del antígeno. A la derecha, anticuerpos monoclonales uniéndose a epítopes específicos del antígeno. Fuente: de Dios & Acosta, 2018.

Como se ha indicado anteriormente, la inmunohistoquímica permite el estudio de tejidos de diversas procedencias (biopsias, material citológico, etc). Existen diversos tipos de técnicas que dependen del anticuerpo a utilizar (monoclonal o policlonal), del material disponible (fresco, fijado, etc), de los antígenos a estudiar (de superficie, etc) y también, como en el caso de la investigación vigente, de la relación entre el marcador y el anticuerpo. Según esta última, podemos distinguir (Figura 5):

- **Métodos directos:** se emplea un antisuero primario específico y marcado frente al antígeno a detectar y localizar.
- **Métodos indirectos:** se emplea un anticuerpo primario que después es detectado por un anticuerpo secundario marcado. Este es el caso de nuestro estudio.

Distinguimos varias técnicas de inmunodetección según el tipo de marcador que se vaya a usar, pero las más utilizadas son dos:

- **Enzimas:** se trata de una técnica en la que un antígeno es detectado mediante un anticuerpo enlazado a una enzima que tiene la capacidad de generar un producto estable. Destaca la peroxidasa (HRP) y la fosfatasa alcalina. La peroxidasa fue usada en este estudio combinada con el método de revelado del peróxido de hidrógeno- diaminobencidina (DAB).
- **Fluorocromos:** son moléculas químicas que absorben la luz a una determinada longitud de onda y emiten otra diferente. Se conjugan con los anticuerpos primarios (método directo) o secundarios (método indirecto) y conforman las llamadas técnicas de inmunofluorescencia. Para poder visualizar este método se necesita un microscopio de epifluorescencia. Los fluorocromos más utilizados son la fluoresceína, que emite fluorescencia de color verde, y la rodamina, que emite fluorescencia roja. Se sabe que pueden unirse al anticuerpo de forma covalente sin modificar la unión antígeno-anticuerpo.

Ambos tratamientos serán explicados con más detalle en apartados posteriores.

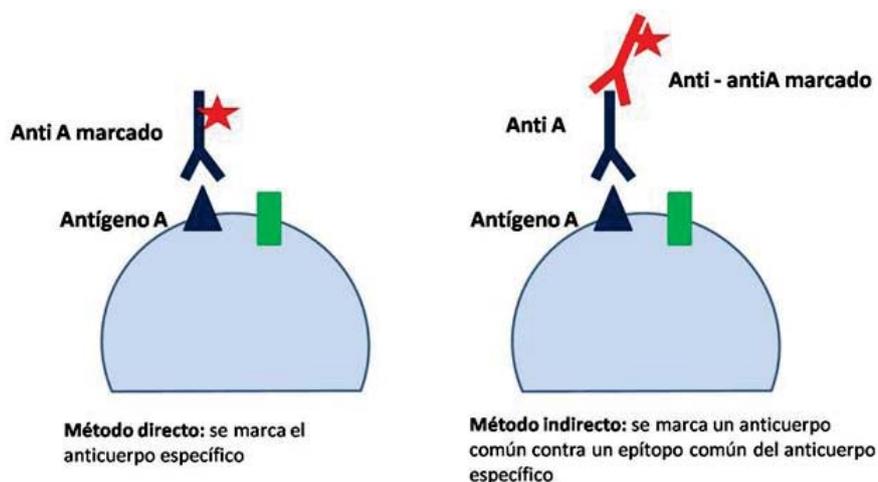


Figura 5. Técnicas inmunohistoquímicas para la detección de un determinado antígeno. A la izquierda diferenciamos el método directo y a la derecha, el indirecto. Fuente:

<http://www.neurowikia.es/content/diagn%C3%B3stico-anatomopatol%C3%B3gico-y-t%C3%A9cnicas-de-biolog%C3%AD-molecular-en-tumores-primarios-del-snc>. Última consulta: 31/1/2020.

1.4 Proteínas ligantes de calcio

Las proteínas ligantes de calcio conforman una familia de pequeñas proteínas de bajo peso molecular con gran afinidad por el ión calcio. Esta alta afinidad es importante, ya que los niveles de calcio intracelular son muy bajos (Porteros, 1997).

Esta familia de proteínas se suele dividir en dos grandes grupos (Porteros, 1997):

- Anexinas: proteínas que además de calcio, son capaces de unir otras moléculas como los fosfolípidos.
- **Proteínas del dominio EF** ("EF-hand"): en este grupo se incluyen la calmodulina, troponina C, calbindina D-28k, parvalbúmina, calretinina y calcineurina.

Las proteínas del dominio EF presentan una estructura (Figura 6) consistente en un loop o lazo flanqueado por dos α -hélices. Este loop posee 12 aminoácidos cuyos residuos están implicados en la coordinación del ión calcio y están muy conservados. Sin embargo, cabe destacar que la afinidad de las distintas proteínas EF-hand por el ión calcio varía dependiendo de la secuencia de aminoácidos del loop (Alvarado, 2009). Según sea la respuesta que provocan tras su unión al calcio, las proteínas del dominio EF se pueden clasificar en disparadoras ("trigger") y tamponadoras ("buffer") Las proteínas ligantes de calcio disparadoras modifican su conformación al unirse al calcio, lo que permite su posterior interacción con enzimas específicas o canales de membrana, modulando así su actividad. A este grupo pertenecen la calmodulina, la calcineurina y la troponina C. Sin embargo, las tamponadoras no cambian su conformación y actúan como un sistema pasivo, encargado de ajustar las concentraciones intracelulares o locales de este ion. Este grupo incluye a la parvalbúmina, la calbindina D-28k y la calretinina (Porteros, 1997; Alvarado, 2009).

Como se ha indicado con anterioridad, estas proteínas están altamente conservadas en vertebrados y, además, están presentes en un amplio abanico de células neuronales. En general, se localizan tanto en el citoplasma como en el núcleo, actuando como estimuladores proliferativos y de migración celular, así como inhibidores de la apoptosis y de la diferenciación. Cabe destacar la función de la regulación de la homeostasis de Ca^{2+} . Además, también parece que participan en las respuestas inmunitarias y en el desarrollo y reparación de los tejidos (Bettini et al., 2017).

Estas proteínas ligantes de calcio aparecen como una alternativa como marcadores neuronales para el estudio de patologías que afectan al sistema nervioso. De hecho, la inmunorreactividad de estas proteínas se ha evaluado en el tejido nervioso de enfermedades neurológicas como Alzheimer, el Parkinson, la corea de Huntington y la esquizofrenia, entre otras (Naizaque & Torres-Fernández, 2016).

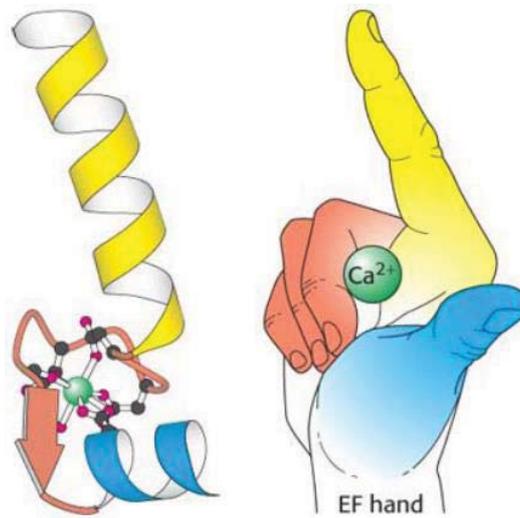


Figura 6. A la izquierda se representa la estructura tridimensional del lugar de unión del ión calcio “EF-hand”. A la derecha, estructura simulada que confiere el nombre a la superfamilia de proteínas ligantes de calcio del tipo “EF-hand”. En las dos imágenes, el amarillo y el azul representan las α -hélices y en naranja, se representa el loop. (Fuente: Berg et al., 2001).

El presente Proyecto de Investigación se centra en el estudio de la **parvalbúmina**, la **calbindina** y la **calretinina** con el fin de caracterizar el techo óptico del pez cebra adulto (*Danio rerio*).

La **parvalbúmina** fue aislada por primera vez en el músculo esquelético de vertebrados anamniotas, así como fue la primera proteína ligante de calcio de la que se conoció su estructura molecular. Dicha estructura terciaria ha resultado ser similar para todas las proteínas de la familia EF, y está formada por seis regiones homólogas de hélice alfa con una región N-terminal no helicoidal y cinco bucles β situados entre las hélices alfa. Los lugares de unión al calcio están en los bucles que aparecen entre las hélices C-D y E-F. Se la ha relacionado con procesos de protección frente a diferentes desórdenes cerebrales (Porteros, 1997). Esta proteína pertenece a la familia de la calmodulina. Está presente en gran abundancia en el músculo esquelético, así como en muchos otros tejidos, entre ellos, el encéfalo, en concreto en neuronas de la corteza visual, en neuronas gabaérgicas, células amacrinas y ganglionares de la corteza visual en el caso de los roedores, las células ciliadas externas de la cóclea, osteocitos, osteoblastos, etc (Friedberg, 2005).

La **calbindina** es una proteína formada por seis dominios EF, de los cuales tan sólo cuatro aceptan calcio. Se encuentra ampliamente distribuida en el Sistema Nervioso Central, en general aparece en neuronas amielínicas y de proyección difusas

relacionadas con subpoblaciones de interneuronas. Funciona como un tamponador intraneuronal de calcio, previniendo así la acumulación excesiva del mismo que se encuentra libre en el citosol y protegiendo a las neuronas contra los procesos degenerativos consecuencia de la excitotoxicidad mediada por calcio. Se ha demostrado la existencia de una supervivencia selectiva de las neuronas que contienen calbindina D-28k en la *Sustancia nigra* de enfermos afectados por la enfermedad de Parkinson y en modelos experimentales de dicha enfermedad. Además, se cree que esta proteína podría desempeñar un papel en el movimiento celular y en la regulación de los flujos intracelulares de calcio (Porteros, 1997). Cabe mencionar que existen estudios que relacionan la disminución de calbindina en diferentes áreas del sistema nervioso como respuesta a la infección por el virus de la rabia (Naizaque & Torres-Fernández, 2016).

La **calretinina** es una proteína que se encuentra en el Sistema Nervioso Central, principalmente en la retina y en neuronas pertenecientes a vías sensoriales. Está formada por 6 dominios "EF-hand" (Figura 7), cuatro de los cuales son ligantes de calcio mientras que los otros dos son aberrantes y, por tanto, no aptos para la unión de calcio. Desempeña un papel importante en la regulación de los niveles de calcio en el citoplasma y en su transporte intracelular, promoviendo o restringiendo las acciones del mismo dentro del metabolismo neuronal. Del mismo modo, controla algunos procesos bioquímicos de forma más directa como la fosforilación de proteínas de membrana. Se ha demostrado que esta proteína sirve también como sistema de protección de las células. En cultivos de neuronas de la corteza cerebral, se ha observado que aquéllas que contienen calretinina son resistentes a la excitotoxicidad provocada por la entrada masiva de calcio tras la apertura de ionóforos en su membrana. Además, se ha comprobado que las neuronas corticales que expresan calretinina son resistentes a condiciones de estrés nutritivo (Porteros, 1997). Por lo tanto, proporcionan protección frente a un incremento excesivo de calcio en períodos de gran frecuencia de descarga, despolarizaciones inducidas por neurotransmisores o causas patológicas, así como en la detención del ciclo celular y apoptosis (Camp & Wijesinghe, 2009).

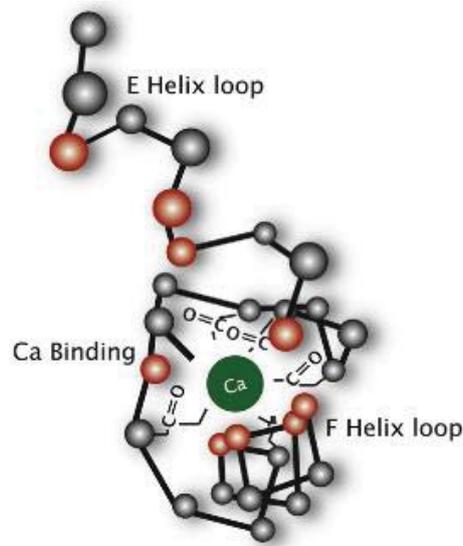


Figura 7. Estructura tridimensional de la calretinina. Fuente: Camp & Wijesinghe, 2009.

2. Hipótesis

Las proteínas ligantes de calcio “EF-hand” (parvalbúmina, calbindina y calretinina) están presentes en el techo óptico del pez cebra adulto, *Danio rerio*, siendo la distribución de su expresión neuronal diferente a lo largo de esta estructura.

3. Objetivos del proyecto

El pez cebra (*Danio rerio*) se ha convertido en un organismo modelo en campos de investigación como la neurofarmacología, la neurofisiología y la biomedicina, entre otros. Así como por su homología con el Sistema Nervioso Central del *Homo sapiens* en cuanto a la genética, la fisiología y la morfología. Por este motivo, el estudio de su encéfalo ha sido el objetivo de múltiples investigaciones.

Los objetivos de este proyecto son los siguientes:

- Estudiar la presencia/ausencia de las poblaciones neuronales inmunorreactivas a las proteínas ligantes de calcio (parvalbúmina, calbindina y calretinina).
- Estudiar topográficamente las poblaciones neuronales inmunorreactivas a las proteínas ligantes de calcio (parvalbúmina, calbindina y calretinina) en el techo óptico del pez cebra adulto, *Danio rerio*.

4. Metodología

4.1 Procesamiento de las muestras

Para la realización de este trabajo se emplearán 21 individuos adultos de pez cebra (*Danio rerio*). Es decir, necesitaremos 12 individuos para la inmunohistoquímica (4 para cada una de las proteínas de interés, dentro de los cuales 2 serán para diaminobencidina y otros 2 para fluoresceína). Necesitaremos 6 peces para los controles (3 para DAB y 3 para fluoresceína). Por último, emplearemos 3 peces para el Western Blott, uno para cada proteína.

Tras ser anestesiados con metanosulfonato de 3-aminobenzoato de etilo (A5040-25G, Sigma-Aldrich), los peces serán perfundidos transcárdialmente con el fijador Paraformaldehído al 4% en tampón fosfato. Este proceso tiene como objeto reemplazar el líquido sanguíneo por el fijador, pudiendo así mantener la mayor proporción posible de células inalteradas como su estado *in vivo*. Después de la perfusión, se seccionarán las cabezas, y éstas serán introducidas en el mismo fijador durante un período comprendido entre 20 y 24 horas. Después el encéfalo será extraído de 12 cabezas de las 21 totales (6 de ellas para la inmunohistoquímica, 3 para el control y 3 para el Western) para después incluirlas en Tissue Tek (4583, Sakura). Cabe destacar que las cabezas destinadas para el Western Blot no se crioprotegen. Las 9 cabezas restantes (6 de ellas para la inmunohistoquímica y 3 para el control) se mantendrán intactas para incluirlas en parafina (36114-4V, VWR Chemicals).

4.2 Bloques de Parafina

Aquellas cabezas que se incluirán en parafina, serán deshidratadas con el fin de eliminar toda el agua posible de los tejidos. Posteriormente, se introducirán en baños sucesivos de etanol (80%, 96%, 100%) durante un período de 40-60 minutos dependiendo del tamaño de las mismas (a mayor tamaño, mayor tiempo) y dos baños en xileno (I y II) de 20 minutos cada uno. Tras la deshidratación, las cabezas serán introducidas en 3 baños de parafina, con el fin de eliminar el xileno y que el tejido se impregne de parafina, este procedimiento se realiza en una estufa a 60 grados centígrados. El primer baño será de 6 horas, el segundo, durante toda la noche y el tercero, durante un par de horas.

Para el proceso de preparación de los bloques, se colocarán unos moldes metálicos sobre una placa calefactora, ya que la parafina solidifica a temperatura ambiente. Colocando la cabeza con la boca hacia abajo, en posición vertical, se dispone el soporte donde irá el

bloque fijado y se añade parafina encima para asegurar que el bloque está colocado correctamente. Finalmente se dejará enfriar.

Estos bloques serán cortados en el microtomo de rotación (Figura 8) en secciones transversales que mostrarán la organización anatómica dorso-ventral, de 12 μm o 14 μm de espesor. Los sucesivos cortes se recogen sobre portaobjetos gelatinizados, que son llevados a la estufa a 37°C con el fin de eliminar toda el agua.



Figura 8. Fotografía de un microtomo de rotación. Fuente: <https://www.labcomercial.com/es/aparatos-de-laboratorio/2354-microtomo-de-rotacion-manual-0-5-a-60-micras.html> (Última consulta 19/02/2020).

4.3 Bloques de Tissue Tek

Antes de comenzar con la preparación del bloque, los encéfalos serán sometidos a 2 lavados en tampón fosfato 0.1 M pH 7.4 (PB) durante 30 minutos.

Los encéfalos deben de ser crioprotectados, este tratamiento es realizado con el fin de evitar la formación de cristales de hielo que podrían dañar el tejido. Tras los lavados, se introducen 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). Después, los encéfalos se introducen en una solución 50-50 de Tissue Tek y de sacarosa (al 30% en PB) durante un período de 3-4 horas.

En un molde plástico que contiene Tissue Tek se introduce el encéfalo correctamente orientado. En un recipiente se vierte 2-metilbutano al 99% (1264700010, Acros organics) y se coloca el molde en su interior, con el fin de que este se congele de forma homogénea. Después introducimos recipiente en un cubículo de poliespán y vertemos nitrógeno líquido. El bloque quedará homogéneamente congelado.

Estos bloques serán cortados en secciones transversales de 12 – 14 μm con la ayuda de un criostato (Figura 9). Las secciones obtenidas se recogen en portaobjetos previamente gelatinizados. Una vez terminado el proceso, los portaobjetos se mantienen en nevera.



Figura 9. Fotografía de un criostato. Fuente: https://kalstein.eu/p211/Cryostat-Microtome/product_info.html (Última consulta 20-02-2020).

4.4 Inmunodetección mediante enzimas: técnica de la inmunoperoxidasa

Los portaobjetos que contienen las secciones incluidas en parafina serán introducidos en sucesivos baños de xileno y de alcoholes de concentración decreciente con el fin de eliminar la parafina y de rehidratarlos. Se someterán 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, con el fin de eliminar la peroxidasa endógena del tejido y evitar la formación de 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 al interior celular de los diferentes reactivos utilizados. Incubamos una hora en suero normal de cabra NGS (G6767, Sigma-Aldrich) diluido (1:10) en PBS. Finalmente incubaremos con el anticuerpo primario, que se encuentra a una dilución 1:500 en PBS, se dejará toda la noche a temperatura ambiente en cámara húmeda. El anticuerpo primario, en el caso de la calretinina, se hará uso del anticuerpo policlonal de conejo anti-calretinina (PA5-32287, Invitrogen). En el caso de la calbindina, se empleará el anticuerpo monoclonal de ratón anti-calbindina-D-28K (C9848, Sigma-Aldrich). Finalmente, con la parvalbúmina se utilizará el anticuerpo policlonal de conejo anti-parvalbúmina (PA1-933, Invitrogen).

Al día siguiente se realizará un lavado en PBS durante 10 minutos y otro en PBS-T durante el mismo tiempo. Después se incubará 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) en el caso de que vayan a reaccionar con anticuerpos primarios monoclonales. En el caso de los anticuerpos primarios policlonales, el anticuerpo secundario será inmunoglobulina de cabra anti-conejo conjugada con peroxidasa de rábano GAR-HRP (12-348, Sigma-Aldrich). Esta incubación durará 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%. Al cabo de 2-3 minutos, el peróxido reaccionará con la diaminobencidina formando un precipitado de color marrón visible al microscopio óptico. 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 portaobjetos aplicando un medio de montaje denominado Eukitt y dejamos secar en estufa a 36°C durante 24 horas.

4.5 Inmunodetección mediante fluorocromos

Las secciones incluidas en Tissue Tek serán introducidas 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 accesibles los lugares de unión del antígeno al 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 (G6767, Sigma-Aldrich) diluido (1:10) en PBS una hora a temperatura ambiente y, trascurrido este tiempo, se incuban con el anticuerpo primario durante toda la noche. El anticuerpo primario, en el caso de la calretinina, se hará uso del anticuerpo policlonal de conejo anti-calretinina (PA5-32287, Invitrogen). En el caso de la calbindina, se empleará el anticuerpo monoclonal de ratón anti-calbindina-D-28K (C9848, Sigma-Aldrich). Finalmente, con la parvalbúmina se utilizará el anticuerpo policlonal de conejo anti-parvalbúmina (PA1-933, Invitrogen).

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), en el caso de que vayan a reaccionar con anticuerpos primarios monoclonales. En el caso de los anticuerpos primarios policlonales, el anticuerpo secundario será inmunoglobulina de cabra anti-conejo conjugada con fluoresceína (GAR-FITC; 65-6111, Invitrogen). Esta incubación durará 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.

4.6 Procedimiento

Como se ha indicado con anterioridad, para la caracterización del techo óptico del pez cebra, *Danio rerio*, haremos uso de 3 proteínas diferentes (calretinina, calbindina y parvalbúmina), por lo que tendremos que emplear 3 anticuerpos distintos para cada una de ellas. Debido a esto, se harán incubaciones diferentes para cada uno de los anticuerpos con DAB y con fluoresceína.

4.7 Pruebas control

Con el fin de comprobar la veracidad de los resultados obtenidos en esta investigación será necesaria la realización de pruebas control, evitando así la posibilidad de resultados erróneos.

- **Verificación de la inmunorreactividad detectada**

Con el fin de verificar la especificidad de la inmunorreactividad detectada, se procederá a la sustitución de la incubación con el anticuerpo primario, por incubación con el suero normal de cabra NGS (G6767, Sigma-Aldrich). Se desarrollará la técnica inmunohistoquímica con normalidad, es decir, tal y como se ha descrito en los apartados anteriores. En todos los casos, las pruebas control pondrán de manifiesto la ausencia de inmunorreactividad en las regiones del techo óptico que han sido estudiadas.

- **Verificación de la especificidad de los anticuerpos empleados**

Con el objetivo de demostrar la especificidad de los anticuerpos utilizados, se hará un western blotting. Se empleará un procedimiento similar al de Díaz-Regueira & Anadón

(2000) realizado en mágil (*Chelon labrosus*) y al de Morona & González (2008), aplicado en anfibios urodelos.

En primer lugar, tras la extracción de los encéfalos, se homogenizarán en un volumen igual de tampón Tris 1 M (pH 6,8) que contiene 20% de glicerol y 10% de SDS, luego el homogenado será sometido a sonicación y centrifugación. Las proteínas contenidas en el sobrenadante se separan por electroforesis en gel SDS-PAGE en geles en placa de acrilamida al 12% a temperatura constante. Las proteínas separadas se “electrobotan” a 10-15V durante 1 hora en una membrana de nitrocelulosa con un poro de 0,2 mm. El resultado se incubará durante 24 horas a 4 ° C en una dilución 1: 500 del anticuerpo anti-calretinina en PBS-Tween que contiene 2% de leche en polvo sin grasa. Después de un lavado en PBS, las transferencias se incubarán durante 1 hora en suero de cabra anti-conejo, se enjuagarán en PBS y luego se incubarán durante 30 minutos en el complejo PAP. La tinción se visualizará mediante DAB.

Se realizará el mismo procedimiento con las proteínas calbindina y parvalbúmina, siendo empleado en estos casos los anticuerpos anti-calbindina y anti-parvalbúmina respectivamente.

4.8 Procesamiento de las imágenes

Las muestras reveladas con DAB serán visualizadas con un microscopio óptico (Nikon, Eclipse, E1000) y se fotografiarán mediante una cámara digital (Nikon, Camera Dmx 1200, Tokio, Japón) acoplada a dicho microscopio. Por otro lado, las muestras relevadas con fluoresceína serán visualizadas a través de un microscopio óptico de epifluorescencia (Nikon eclipse 90i) y se fotografiarán con una cámara digital (Olympus DP71) acoplada al microscopio. El procesamiento de las imágenes se llevará a cabo mediante el programa CorelDraw X8.

5. Plan de trabajo

	PRIMER MES				SEGUNDO MES				TERCER MES				CUARTO MES			
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
METODOLOGÍA																
1. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS																
2. BLOQUES DE PARAFINA																
3. BLOQUES DE TISSUE-TEK																
4. INMUNODETECCIÓN MEDIANTE ENZIMAS																
5. INMUNODETECCIÓN MEDIANTE FLUOROCROMOS																
6. PRUBAS CONTROL																
7. PROCESAMIENTO DE LAS IMÁGENES																
8. ANÁLISIS Y COMPARACIÓN DE DATOS																
9. PUBLICACIÓN DE RESULTADOS																

Tabla 1. Cronograma del plan de trabajo correspondiente al proyecto descrito.

6. Implicaciones éticas y/o de bioseguridad

En este proyecto se hará uso del pez cebra, *Danio rerio*, que está incluido en el Anexo I el RD 53/2013 “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”. Esta normativa está basada en la Directiva Europea 2010/63/UE con el fin de proteger a los animales de experimentación científica.

Este proyecto partirá de las autorizaciones necesarias para llevarlo a cabo, entre las que se incluyen la del comité de ética de la Universidade da Coruña. Se aplicarán preferentemente los principios de reemplazo, reducción y refinamiento que recomienda la legislación nacional y europea. El personal que trabaje con el pez estará capacitado siguiendo el art. 14 y 15, así como debidamente acreditados con la autorización correspondiente según el art. 16 y 17 del RD 53/2013. Además, para la eutanasia de estos animales se seguirán las recomendaciones de la normativa para pez cebra incluidas en el Anexo III.

El proyecto será evaluado según lo establecido en el art.34 del RD 53/2013. Es decir, los órganos habilitados realizarán una evaluación del proyecto, incluyendo el comité de ética de la Universidade da Coruña.

7. Aplicabilidad

La realización de los objetivos expuestos en este proyecto permitirá aumentar el conocimiento de la estructura del techo óptico a partir de la ausencia o presencia y, en este último caso, de la localización y disposición de las células inmunorreactivas a las proteínas ligantes de calcio anteriormente nombradas. Así como, confirmar que se trata de un marcador efectivo para futuras investigaciones en el techo óptico del pez cebra.

8. Plan para la difusión de los resultados

La difusión de los resultados se llevará a cabo mediante estas vías:

- Los resultados serán publicados en el RUC de la UDC.
- Publicación en revistas científicas de nivel internacional como The Journal of Comparative Neurology y The Journal of Neuroscience.

- Participación en las Jornadas de Jóvenes Investigadores en Neurociencia.

9. Recursos necesarios

El grupo de investigación se encuentra ubicado en el laboratorio de Biología Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidade da Coruña. El proyecto se llevará a cabo en este laboratorio según el cronograma indicado en apartados anteriores. Para la realización de este proyecto de investigación será necesario contar con los siguientes recursos (Tablas 2-4):

Material necesario presente en el laboratorio
Cubeta para anestesiar a los animales
Pinzas
Tijeras de laboratorio para seccionar el tejido
Material para perfundir (jeringuilla y cánula de perfusión)
Lupa
Extractor
Recipientes para la deshidratación de las cabezas
Estufa para los diferentes baños en parafina
Moldes para la realización de los bloques de parafina
Placa calefactora
Microtomo de rotación
Molde de plástico sobre el que depositar el Tissue Tek
Cubículo de poliespán sobre el que verter en nitrógeno líquido
Criostato
Baño termostático
Cámara de incubación
Centrifugadora

Sonicador
Gel para electroforesis SDS-PAGE en geles en placa de acrilamida al 12%

Tabla 2. Material necesario para la realización de este proyecto que ya se encuentra presente en el laboratorio.

Reactivos necesarios presentes en el laboratorio
Tampón fosfato 0.1 M pH 7.4 (PB)
Nitrógeno líquido
PBS
PBS-T
Tampón ácido cítrico-citrato sódico 0,1M y pH 6
Tampón Tris 1 M (pH 6,8)
Etanol 80%, 96%, 100%

Tabla 3. Reactivos necesarios para la realización de este proyecto que ya se encuentran presentes en el laboratorio.

Reactivos necesarios no presentes en el laboratorio	Presupuesto (EUR)
Metanosulfonato de 3-aminobenzoato de etilo (A5040-25G, Sigma-Aldrich)	176,00
Paraformaldehído, 4 % en PBS (15434389, Alfa Aesar)	78,90
Xileno (8080.2500, JT Baker)	119,00
Parafina Shandon (501006, Thermo Scientific)	99,95
Sacarosa (10634932, Fisher Chemical S/8600/60)	52,90
Tissue Tek (4583, Sakura)	52,72

2-metilbutano al 99% 126470010, Acros organics		93,40
Suero normal de cabra (NGS) (G6767, Sigma-Aldrich)		62,40
Anticuerpo primario	Anticuerpo policlonal de conejo anti-calretinina (PA5-32287, Invitrogen)	363,00
	Anticuerpo monoclonal de ratón anti-calbindina-D-28K (C9848, Sigma-Aldrich)	406,00
	Anticuerpo policlonal de conejo anti-paralbúmina (PA1-933, Invitrogen)	704,00
Anticuerpo secundario	Inmunoglobulina de cabra anti-ratón marcada con peroxidasa de rábano GAM-HRP (A0168-1 mL, Sigma-Aldrich)	301,00
	Inmunoglobulina de cabra anti-conejo conjugada con peroxidasa de rábano GAR-HRP (12-348, Sigma-Aldrich)	215,00
Diaminobencidina (DAB, D5637-56, Sigma-		200,00

Aldrich)		
Borohidruro de sodio 0,1M (Fisher Chemical S/2560/48)		64,95
Anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína	Inmunoglobulina de cabra anti-ratón conjugada con fluoresceína (GAM-FITC; F2761, Invitrogen)	158,00
	Inmunoglobulina de cabra anti-conejo conjugada con fluoresceína (GAR-FITC; 65-6111, Invitrogen)	157,00
TOTAL		3.162,22

Tabla 4. Recursos necesarios para el proyecto que no están presentes en el laboratorio y que, por lo tanto, es necesaria su adquisición.

Para la observación y análisis de los resultados serán necesarios un microscopio óptico (Nikon, Eclipse, E1000) con el que se visualizarán el control y las muestras reveladas con DAB, así como una cámara digital (Nikon, Camera Dmx 1200, Tokio, Japón) acoplada a dicho microscopio con la que se fotografiarán los resultados. También será necesario un microscopio óptico de epifluorescencia (Nikon eclipse 90i) con el que se visualizarán los resultados de las muestras reveladas con fluoresceína, así como una cámara digital acoplada a dicho microscopio con la que se fotografiará el resultado (Olympus DP71). Además, se necesitará del acceso al programa CorelDraw X8 para el procesamiento de las imágenes.

10. Conclusiones o hechos que se pretenden alcanzar

- Se ha observado la presencia de células inmunorreactivas a las proteínas ligantes de calcio (parvalbúmina, calbindina y calretinina) en el techo óptico del pez cebra adulto.
- La presencia de las proteínas ligantes de calcio (parvalbúmina, calbindina y calretinina) en las poblaciones neuronales confirma que se trata de un marcador neuronal efectivo para el estudio de las mismas en el techo óptico del pez cebra, *Danio rerio*.

ANEXO A

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

-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 un vaso de precipitados, 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.

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

- 500 mL de agua destilada, calentada a 75- 80°C.
- 40 g de paraformaldehído.
- 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).

11. Bibliografía

Webgrafía

- Atlas de histología. Universidade de Vigo. <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/5-inmuno.php>. Última consulta: 21/07/2020.
- Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). <http://seresmodelicos.csic.es/peix.html>. Última consulta: 30/01/2020.
- FishBase. http://fishbase.sinica.edu.tw/FieldGuide/FieldGuideSummary.php?genusname=Danio&speciesname=rerio&c_code=608&print=. Última consulta: 31/1/2020.
- Neurowikia. <http://www.neurowikia.es/content/diagn%C3%B3stico-anatomopatol%C3%B3gico-y-t%C3%A9cnicas-de-biolog%C3%AD-molecular-en-tumores-primarios-del-snc>. Última consulta 19/02/2020.
- LABComercial. <https://www.labcomercial.com/es/aparatos-de-laboratorio/2354-microtomo-de-rotacion-manual-0-5-a-60-micras.html>. Última consulta 19/02/2020.
- Kalstein. https://kalstein.eu/p211/Cryostat-Microtome/product_info.html. Última consulta 20-02-2020.

Artículos científicos y libros

- Alvarado, M. E. (2009). *Cambios en la transducción de señales durante los dos procesos de diferenciación del parásito Giardia intestinalis*. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Colombia.
- Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. (eds.) 2001. *Biochemistry*, 5th edn. WH Freeman and Company. NY, p. 410.
- Bettini, S., Milani, L., Lazzari, M., Maurizii, M. G. & Franceschini, V. (2017). *Crypt cell markers in the olfactory organ of Poecilia reticulata: analysis and comparison with the fish model Danio rerio*. Brain Structure and Function. 222, 3063–3074.
- Butler, A. B. & Hodos, W. (2005). *Comparative vertebrate neuroanatomy. Evolution and Adaptation*. 2ª ed. New York: Wiley-Liss.
- Camp, A. J. & Wijesinghe, R. (2009). *Calretinin: Modulator of neuronal excitability*. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 41, 2118–2121.
- De Dios, S. M. & Acosta, G. (2018). *Guía de inmunohistoquímica para técnicos*. Instituto Nacional del Cáncer.
- Díaz-Regueira, S. & Anadón, R. (2000). *Calretinin Expression in Specific Neuronal Systems in the Brain of an Advanced Teleost, the Grey Mullet (Chelon labrosus)*. The Journal of Comparative Neurology. 426, 81–105.

- 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.
- Ferreño, M. N. (2014). *Estudio del desarrollo y anatomía del toro longitudinal y estrato marginal del techo óptico en la larva y adulto del pez cebra (Danio rerio)*. Universidade da Coruña. Trabajo de fin de grado.
- Friedberg, F. (2005). *Parvalbumin isoforms in zebrafish*. Molecular Biology Reports. 32: 167–175.
- García, A. M. (2011). *Anticuerpos monoclonales. Aspectos básicos*. Neurología. 26(5):301—306
- Kalueff, A. V., Stewart, A. M. & Gerlai, R. (2013). *Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders*. Cell Press. Review.
- Kreke, N. & Dietrich, D. R. (2008). *Physiological Endpoints for Potential SSRI Interactions in Fish*. Critical Reviews in Toxicology. Vol: 3, 215-247.
- 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.
- Maximino, C. (2008). *Evolutionary Changes in the Complexity of the Tectum of Nontetrapods: A Cladistic Approach*. PLoS ONE 3(10): e3582.
- Morona, R. & González, A. (2008). *Calbindin-D28k and Calretinin Expression in the Forebrain of Anuran and Urodele Amphibians: Further Support for Newly Identified Subdivisions*. The Journal of comparative neurology. 511, 187–220.
- Naizaque, J.R. & Torres-Fernández, O. (2016). *La inmunorreactividad a calbindina en células de Purkinje del cerebelo de ratones no es afectada por la infección con virus de la rabia*. Revista Biosalud. 15(2), 9-19.
- Nelson J.S. *Fishes of the world* 4ªed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2006.
- Northmore, D. (2011). *The Optic Tectum*. In Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment. Vol: 1, 131-142.
- Paz, O. (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.
- 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 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.

Rocha A., Ruiz S. & Coll J. M. (2002). *Metodo sencillo para producir huevos embrionados de pez cebra. Investigaciones Agrarias*. 93–102.

Spence R., Gerlach G., Lawrence C. & Smith, C. (2008). *The Behaviour and ecology of the zebrafish, Danio Rerio*. *Biological Reviews*. 83(1):13-34.