



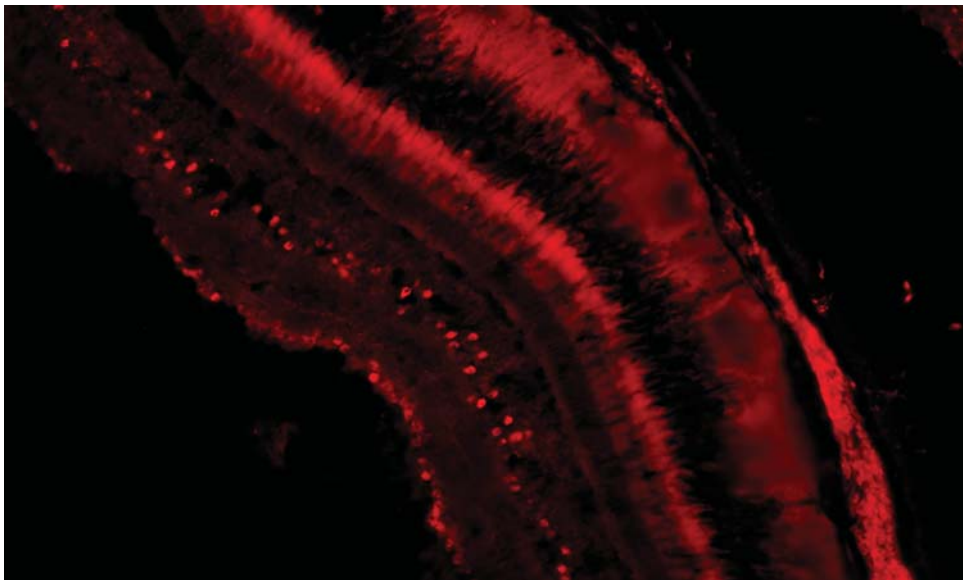
Facultad de Ciencias  
Departamento de Biología  
Área de Biología Celular

**Trabajo de Fin de Máster**  
**2020/2021**

**Caracterización topográfica de la expresión de diferentes proteínas  
en la retina del pez cebra adulto (*Danio rerio*)**

**Caracterización topográfica da expresión de diferentes proteínas na  
retina do peixe cebra adulto (*Danio rerio*)**

**Topographic characterization of the expression of different proteins  
in the adult zebrafish (*Danio rerio*) retina**



**Silvia Mouzo Prado**

**Directores:**

**Dra. María Luz Díaz Prado | Dr. Ibán Lamas Criado**



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

Caracterización topográfica de la expresión de diferentes proteínas en la retina del pez cebrado adulto (*Danio rerio*)

Caracterización topográfica da expresión de diferentes proteínas na retina do peixe cebrado adulto (*Danio rerio*)

Topographic characterization of the expression of different proteins in the adult zebrafish (*Danio rerio*) retina

Trabajo de Fin de Máster que presenta la alumna del Máster de Biología Molecular, Celular y Genética Silvia Mouzo Prado bajo la dirección de D. Ibán Lamas Criado y Dña M<sup>a</sup> Luz Díaz Prado.

**LAMAS  
CRIADO IBAN  
- DNI  
32688489S**

Firmado digitalmente por  
LAMAS CRIADO IBAN  
- DNI 32688489S  
Fecha: 2021.07.13  
17:26:16 +02'00'

Fdo. Ibán Lamas Criado

**DIAZ PRADO  
MARIA LUZ -  
DNI  
32789579C**

Firmado digitalmente por DIAZ PRADO MARIA LUZ - DNI 32789579C  
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES, o=UNIVERSIDAD DE A CORUÑA, ou=CERTIFICADO ELECTRONICO DE EMPLEADO PUBLICO, ou=BIOLOXIA, ou=26022, serialNumber=IDCES-32789579C, sn=DIAZ PRADO, givenName=MARIA LUZ, cn=DIAZ PRADO MARIA LUZ - DNI 32789579C  
Fecha: 2021.07.13 11:49:42 +02'00'

Fdo. M<sup>a</sup> Luz Díaz Prado

A Coruña, Julio de 2021

## RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se propuso determinar la presencia y distribución topográfica de dos proteínas ligantes de calcio (calretinina y calbindina), el neurotransmisor serotonina y las proteínas neuronales de la familia Hu (HuC y HuD) en la retina del pez cebra adulto, mediante el empleo de técnicas de detección inmunoenzimáticas e inmunofluorescentes. Como resultado, se concluye la presencia de todas las proteínas consideradas, con patrones de expresión similares para calretinina y calbindina, pero característicos para serotonina y HuC/D.

**Palabras clave:** *Danio rerio*, retina, técnicas inmunohistoquímicas, proteínas ligantes de calcio, serotonina, HuC/D

## RESUMO

No presente traballo de investigación propúxose determinar a presenza e distribución topográfica de dúas proteínas ligantes de calcio (calretinina e calbindina), o neurotransmisor serotonina e as proteínas neuronais da familia Hu (HuC e HuD) na retina do peixe cebra adulto, mediante o emprego de técnicas de detección inmunoenzimáticas e inmunofluorescentes. Como resultado, conclúese a presenza de todas as proteínas consideradas, con patróns de expresión similares para calretinina e calbindina, pero característicos para serotonina e HuC/D.

**Palabras clave:** *Danio rerio*, retina, técnicas inmunohistoquímicas, proteínas ligantes de calcio, serotonina, HuC/D

## ABSTRACT

In the current research paper, it was proposed to determine the presence and topographic distribution of two calcium binding proteins (calretinin and calbindin), the neurotransmitter serotonin and the neuronal members of the Hu family, HuC and HuD, in the adult zebrafish retina, through the use of immunoenzymatic and immunofluorescent detection techniques. As a result, it is concluded the presence of all the considered proteins, with similar expression patterns for calretinin and calbindin, but characteristic ones for serotonin and HuC/D.

**Key words:** *Danio rerio*, retina, immunohistochemical techniques, calcium binding proteins, serotonin, HuC/D

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1. Introducción.....</b>	<b>5</b>
1.1. Ecología del pez cebra.....	5
1.2. La retina del pez cebra.....	7
1.2.1. Desarrollo de la retina.....	7
1.2.1. Anatomía de la retina.....	8
1.3. Caracterización proteica.....	11
1.3.1. Proteínas ligantes de calcio.....	11
1.3.2. Serotonina.....	12
1.3.3. Familia de proteínas Hu.....	13
1.4. Técnicas inmunohistoquímicas.....	13
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>16</b>
<b>3. Material y métodos.....</b>	<b>17</b>
3.1. Obtención y preparación de las muestras biológicas.....	17
3.1.1. Bloques de parafina.....	17
3.1.2. Bloques de Tissue Tek.....	18
3.2. Tinciones.....	18
3.3. Técnicas inmunohistoquímicas.....	19
3.3.1. Técnicas inmunofluorescentes.....	19
3.3.2. Técnicas inmunoenzimáticas.....	20
3.4. Observación y procesamiento de las imágenes.....	21
<b>4. Resultados.....</b>	<b>22</b>
4.1. Tinciones.....	22
4.2. Técnicas inmunohistoquímicas.....	22
4.2.1. Calretinina.....	22
4.2.2. Calbindina.....	24
4.2.3. Serotonina.....	24
4.2.4. HuC/D.....	26
<b>5. Discusión.....</b>	<b>27</b>
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>31</b>
<b>7. Referencias bibliográficas.....</b>	<b>32</b>
<b>8. ANEXO.....</b>	<b>36</b>

## 1. Introducción

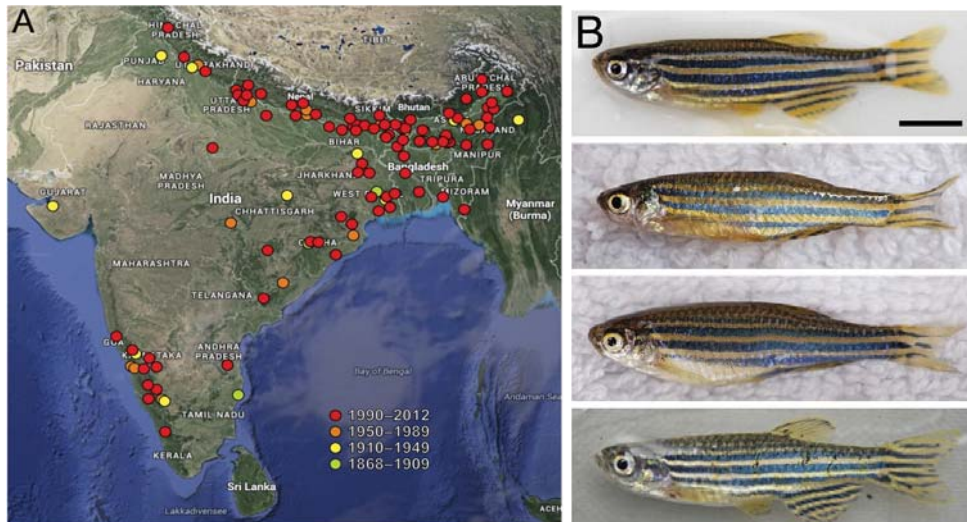
En los últimos años, el pez cebra (*Danio rerio*) ha sido utilizado como organismo modelo en una gran variedad de diseños experimentales, abarcando campos tan diversos como la biología del desarrollo, la genética, la neurofisiología e, incluso, la investigación biomédica. Entre las características que han contribuido a su emergente popularidad destacan su alta homología genética con el ser humano, su rápido desarrollo, la transparencia de sus larvas y el bajo coste de mantenimiento, en comparación con la utilización de otros modelos de vertebrado alternativos<sup>1</sup>.

El pez cebra presenta una retina de vertebrado prototípica, morfológica y fisiológicamente similar a la de mamíferos. La retina puede considerarse como parte del sistema nervioso central (SNC), siendo accesible y de estructura conocida, lo que la convierte en un sistema experimental idóneo para la realización de estudios de desarrollo, organización y regeneración de neuronas del SNC, así como también estudios acerca de la funcionalidad de proteínas específicas en neuronas y redes neuronales<sup>2,3</sup>. Con este fin, el presente estudio tiene como propósito determinar la presencia y distribución topográfica de dos proteínas ligantes de calcio (calretinina y calbindina) en la retina del pez cebra adulto, así como del neurotransmisor serotonina y las proteínas neuronales de la familia Hu, HuC y HuD.

### 1.1. Ecología del pez cebra

El pez cebra es nativo del sureste asiático y presenta una amplia distribución en las cuencas del Ganges y el Brahmaputra, y las aguas dulces tropicales de regiones monzónicas como la India, Bangladesh, Nepal, Pakistán, Bután, Tailandia o el norte de Myanmar (Figura 1A)<sup>4</sup>.

El género *Danio* fue descrito por primera vez en 1822 por el zoólogo Francis Hamilton; aunque actualmente se acepta la clasificación establecida por F. Fang en 2003<sup>5</sup>, según la cual, el género observado por Hamilton se divide en los géneros *Devario* y *Danio*, al considerar la naturaleza parafilética que comparten. En consecuencia, el pez cebra conforma junto con otras 20 especies, el género *Danio*, y constituye una de las más de 4.000 que abarca el orden de peces teleósteos cipriniformes<sup>6</sup>.



**Figura 1.** Pez cebra y su distribución geográfica. (A) Localizaciones en las que se ha informado de la presencia del pez cebrá. (B) Peces cebrá de diferentes poblaciones del noreste de India. Los dos superiores son individuos macho y las dos inferiores hembras. Barra de escala: 5 mm. Fuente: Parichy, D. M. (2015)

*Danio rerio* es un pez de agua dulce, omnívoro y de pequeño tamaño (entre 3 y 5 centímetros de largo y 1 centímetro de ancho), fusiforme y aplanado en sus planos latero-laterales, definidos por su eje horizontal. Presentan dimorfismo sexual, por lo que la fisonomía externa varía en función del sexo (Figura 1B). De este modo, los machos exhiben un tamaño menor que las hembras, con aletas anales más grandes y amarillas y una papila genital poco evidenciada. Las hembras, por su parte, poseen un vientre característicamente convexo y abultado<sup>7</sup>.

Son animales ovíparos con reproducción externa. En condiciones naturales, la reproducción ocurre principalmente durante los monzones de verano, que posibilitan la aparición de pozas transitorias que garantizan la disponibilidad de alimentos, así como refugio frente a posibles depredadores. Adicionalmente, las aguas tranquilas que proporcionan las pozas generadas durante esta época del año, podría facilitar la comunicación por feromonas, relevante para el proceso de cortejo y ovogénesis<sup>4</sup>. Por el contrario, se ha comprobado que las condiciones proporcionadas en el laboratorio (temperatura de 28°C, pH en torno 7-8 y niveles de salinidad, oxígeno disuelto y desechos de nitrógeno controlados), posibilitan la puesta de huevos a lo largo de todo el año. Las hembras pueden llegar a poner entre 100-200 huevos por semana, siendo su tasa de fecundidad alta, de aproximadamente el 90%.

Los huevos eclosionan entre los 4 y 7 días post-fertilización (dpf). Con un mes se les considera juveniles y con tres meses se encuentran capacitados para la reproducción continuada, llegando a alcanzar los 5 años de vida, en condiciones óptimas de laboratorio<sup>7</sup>.

## **1.2. La retina del pez cebra**

El ojo es una estructura del sistema nervioso central en cuya formación intervienen tejidos de distinta procedencia, incluyendo el ectodermo neural y no neural, el meso-endodermo axial y el mesénquima periorcular. Sus características particulares han despertado a lo largo de los años el interés de investigadores de distintas áreas, posibilitando el desarrollo de una mejor comprensión de sus bases celulares y moleculares.

Las similitudes morfológicas y funcionales que comparten la retina del pez cebra y la de mamíferos, hacen de esta estructura un modelo de experimentación idóneo. De hecho, el estilo de vida del pez cebra, se traduce en una retina apta para la luz diurna, lo que la convierte en muchos aspectos en un sistema más próximo a la retina humana, que la de muchos roedores nocturnos<sup>8</sup>.

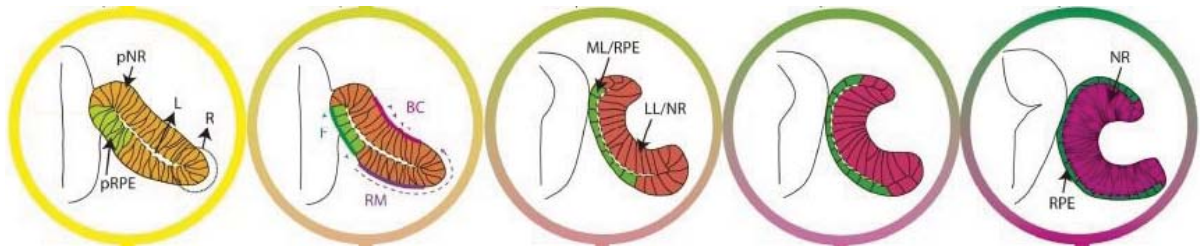
### **1.2.1. Desarrollo de la retina**

El desarrollo del sistema visual del pez cebra en particular, y de los teleósteos en general, es similar al descrito en otros vertebrados, aunque presentan algunas características distintivas en su morfogénesis inicial.

El primer indicio de formación del ojo en la larva del pez cebra se corresponde con la evaginación bilateral de masas sólidas de células neuroepiteliales, a nivel de la porción anterior de la quilla neural; a diferencia de lo que ocurre en otros vertebrados, donde la morfogénesis del ojo comienza con la proyección de vesículas ópticas huecas a partir del tubo neural<sup>9</sup>. A continuación, las estructuras ópticas primitivas experimentan un proceso de reorientación, rotando en dirección anterior, en relación al eje axial del embrión. El proceso de invaginación subsiguiente comienza en el centro del primordio, propagándose de forma simétrica hacia la periferia. Tras 24 horas post-fertilización, la copa óptica se encuentra completamente formada (Figura 2)<sup>9</sup>.



Durante el proceso de formación de la copa óptica de doble pared, las células pertenecientes a la estructura se especializan progresivamente, gracias a la segregación de patrones de regulación génica altamente conservados<sup>10</sup>. La pared externa se diferencia hacia el epitelio pigmentario de la retina. La pared interna prolifera y genera una variedad de células ganglionares, glía, interneuronas y fotorreceptores que, en conjunto, constituirán el componente neural de la retina<sup>10</sup>.



**Figura 2.** Diagrama representativo del proceso de morfogénesis del ojo del pez cebra. De izquierda a derecha: desarrollo a las 16, 18, 20, 24 y 27 hpf. BC, constricción basal; L, cavidad virtual; LL, capa lateral; ML, capa media; NR, retina neural; pNR, futura retina neural; R, borde marginal; RM, movimientos del borde; RPE, epitelio pigmentario de la retina; pRPE, futuro RPE. Fuente: Moreno-Marmol, T., Cavodeassi, F., & Bovolenta, P. (2018)

### 1.2.1. Anatomía de la retina

En sección transversal (Figura 3)<sup>8</sup>, la retina del pez cebra se caracteriza por presentar una organización histológica en diferentes capas que, desde la periferia externa hacia la interna (adyacente al cristalino), se describen a continuación.

#### ❖ Epitelio pigmentario de la retina:

Derivado del neuroectodermo, el epitelio pigmentario (EP) de la retina se compone de una monocapa de células epiteliales pigmentadas lindante con la capa nuclear externa del componente neural de la retina. Sus protrusiones se interdigitan con los segmentos externos de los fotorreceptores<sup>11</sup>. Debido a su localización particular entre la retina neural y los coriocapilares, participa en la regulación del transporte de nutrientes y desechos metabólicos entre la retina y los vasos sanguíneos<sup>12</sup>. Así mismo, desempeña funciones tan importantes como el reciclado del ácido retinoico o la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores potencialmente dañados<sup>13</sup>, ejerciendo, por tanto, un papel clave en la preservación de su integridad.

#### ❖ Capa nuclear externa:



La capa nuclear externa (CNE) contiene los cuerpos celulares de los fotorreceptores, las células encargadas de convertir los fotones en señales neurales. Concretamente, la retina del pez cebra contiene 5 tipos de fotorreceptores con distintos espectros de absorción: un tipo de bastón, receptivo a condiciones de baja luminosidad, y 4 tipos de conos, responsables de la sensibilidad a lo largo del espectro de luz visible (rojo, verde y azul) y ultravioleta<sup>13</sup>. En consecuencia, el pez cebra presenta una visión de color tetracromática<sup>12</sup>.

Los conos reactivos a luz azul y ultravioleta se disponen individualmente, mientras que los conos sensibles a longitudes de luz roja o verde se fusionan a nivel de sus segmentos internos, para formar conos dobles<sup>13</sup>.

❖ Capa plexiforme externa (CPE):

En esta capa, adyacente a la capa nuclear externa, tienen lugar las sinapsis entre los fotorreceptores y las células situadas en la capa nuclear interna de la retina.

❖ Capa nuclear interna:

La capa nuclear interna (CNI) contiene los cuerpos celulares de las interneuronas bipolares, horizontales y amacrinas, así como los somas de las células de Müller.

El análisis del perfil molecular de estas interneuronas en la retina del pez cebra ha conducido a la identificación de diferentes subpoblaciones celulares. Así, Connaughton et al. (2004) revelan la existencia de al menos 17 tipos de células bipolares en la retina del pez cebra basándose en criterios de clasificación morfológicos<sup>14</sup>. Posteriormente, Li et al. (2009) describen 4 tipos de célula horizontal: un tipo celular que establece sinapsis exclusivamente con bastones y tres con conos (H1, H2 y H3)<sup>15</sup>. En relación a las células amacrinas, el estudio llevado a cabo por Wagner y Wagner (1988) sobre la retina de un teleosteo ciprínido, el rutilo, identifica hasta 70 tipos morfológicos y neuroquímicos distintos<sup>16</sup>. Aunque en la retina de pez cebra no se ha alcanzado tal grado de distinción (por ejemplo, en el estudio de Connaughton et al. los autores observan hasta 18 tipos celulares diferentes) se espera que futuras líneas de investigación resulten en la identificación de subtipos adicionales. De estas últimas, las mejor caracterizadas son las células amacrinas interplexiformes dopaminérgicas, cuyas prolongaciones

se extienden hacia ambas capas plexiformes (externa e interna), desempeñando un papel en la comunicación retrógrada, desde la retina interna hacia la externa<sup>12</sup>.

Por su parte, las células de Müller se corresponden con las células gliales de la retina por excelencia. A pesar de que sus somas se localizan en la capa nuclear interna, sus axones se extienden a lo largo de todas las capas retinianas, desde la más externa hasta la periferia interna. Entre sus numerosas funciones, destacan la de soporte estructural de la retina, manutención de la homeostasis y reciclado de neurotransmisores<sup>13</sup>.

Las células de Müller pueden sufrir desdiferenciación hacia un estado de pluripotencia y, desde éste, diferenciarse nuevamente hacia cualquier tipo celular de la retina, reemplazando células retinianas dañadas a lo largo de toda la vida del organismo<sup>12</sup>.

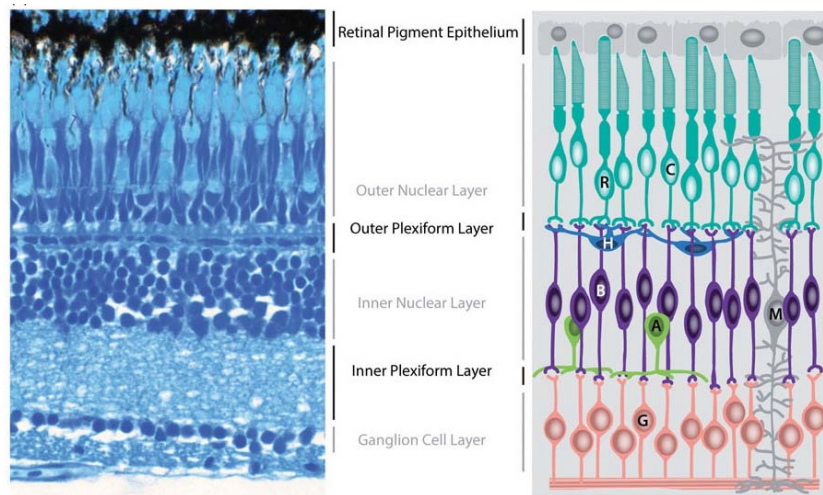
❖ Capa plexiforme interna:

Los axones procedentes de los somas contenidos en la capa nuclear interna, se proyectan hacia la denominada capa plexiforme interna (CPI). Es la región de la retina donde las células amacrinas, bipolares y ganglionares establecen sinapsis<sup>11</sup>. Es más compleja que la capa plexiforme externa y su grosor es similar al de la capa nuclear interna<sup>12</sup>. En esta capa también se diferencian vasos sanguíneos en algunos vertebrados mamíferos.

❖ Capa celular ganglionar:

La capa celular ganglionar (CCG), más próxima al cristalino, contiene los cuerpos celulares de las células ganglionares de la retina. Estas neuronas establecen sinapsis con las células bipolares y amacrinas de la capa nuclear interna. Así mismo, los axones de las células ganglionares se fusionan, siendo los responsables de generar las fibras ópticas que, en último término, dan origen al nervio óptico<sup>11</sup>.

Se han descrito al menos 11 tipos de células ganglionares, en función de sus características morfológicas<sup>12</sup>.



**Figura 3.** Capas histológicas de la retina del pez cebra adulto. R, bastón; C, cono; H, célula horizontal; B, célula bipolar; A, célula amacrina; G, célula ganglionar; M, célula glial de Müller. Fuente: Niklaus, S., & Neuhaus, S. C. F. (2017).

### 1.3. Caracterización proteica

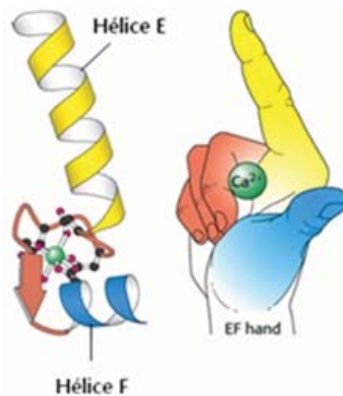
En el presente estudio se propone caracterizar la distribución topográfica de dos proteínas ligantes de calcio: calretinina y calbindina, el conocido neurotransmisor serotonina y las proteínas neuronales HuC y HuD, en la retina del pez cebra adulto (*Danio rerio*) mediante técnicas inmunohistoquímicas.

#### 1.3.1. Proteínas ligantes de calcio

El ión calcio desempeña un papel fundamental en las células de los seres vivos como segundo mensajero en múltiples rutas de señalización celular, regulando procesos clave como la excitabilidad neuronal, los patrones de actividad y la comunicación intercelular. En consecuencia, existen mecanismos específicos cuyo objetivo es mantener o ajustar las concentraciones de calcio intracelular y extracelular a los requerimientos funcionales del momento, de forma dinámica. A este respecto, destacan, además de las bombas de calcio de la membrana plasmática y las estructuras subcelulares que retienen calcio intracelular, las denominadas proteínas ligantes de calcio, presentes en el citoplasma<sup>17</sup>. Éstas constituyen una familia de proteínas con diferentes grados de afinidad para el ión, de modo que su participación en la dinámica de la señalización celular (en general) y neuronal (en particular) también lo será<sup>18</sup>. El impacto funcional de cada una de estas proteínas, deriva en una expresión específica de tipo celular, por lo que han

sido utilizadas como marcadores neurobiológicos para caracterizar poblaciones y subpoblaciones neuronales<sup>17,18</sup>.

La calbindina D28k (CB) y la calretinina (CR) son dos proteínas ligantes de calcio con dominios de mano EF (Figura 4)<sup>19</sup> empleadas de forma habitual como marcadores del sistema nervioso central en vertebrados<sup>20</sup>. Se relacionan con la regulación de los niveles de calcio intracelular, la transducción mediada por iones calcio e, incluso, se ha sugerido su relación con un efecto neuroprotector potencial<sup>20</sup>. Uno de los objetivos del presente trabajo es determinar la presencia y la distribución topográfica de las proteínas ligantes de calcio, calretinina y calbindina, en la retina del pez cebra adulto.



**Figura 4.** Diagrama representativo del dominio de mano EF. Fuente: Noebels J.L., et al. (2012)

### 1.3.2. Serotonina

La 5-hidroxitriptamina o serotonina (5-HT) es una amina biógena derivada del triptófano. Su presencia, así como la de receptores específicos para la misma, ha sido confirmada en la retina de numerosos organismos vertebrados mamíferos y no mamíferos, sugiriendo su papel neuromodulador dentro de la misma. A pesar de que las rutas de señalización que activa dentro de la retina todavía se encuentran en los inicios de ser dilucidadas, los resultados crecientes de estudios de investigación, respaldan su implicación en la fisiología de la retina<sup>21, 22, 23</sup>.

En el caso concreto de la retina del pez cebra, Yazulla y Studholme (2002) observaron inmunorreactividad positiva para 5-HT en una subpoblación de células amacrinas<sup>22</sup>, que es consistente con la descrita en la retina de otros organismos

vertebrados como la carpa dorada (*Carassius auratus*), el ajolote (*Ambystoma mexicanum*), el polluelo o la tortuga (*Chelodina longicollis*)<sup>22,23</sup>.

### **1.3.3. Familia de proteínas Hu**

La familia Hu es un grupo de proteínas con capacidad de unión al ARN. Los miembros neuronales de esta familia, HuB, HuC y HuD, desempeñan funciones relacionadas con la diferenciación y plasticidad neuronal. La proteína HuR, alternativamente, se caracteriza por una expresión generalizada en distintas poblaciones celulares y no exclusiva de neuronas, así como por su implicación en funciones relacionadas con la respuesta celular a situaciones de estrés<sup>24</sup>.

La expresión temprana de proteínas Hu en una amplia variedad de organismos, sugiere funciones conservadas relacionadas con la regulación de las etapas iniciales de la neurogénesis. Las proteínas ELAV se emplean de forma habitual como marcador de diferenciación neuronal, y su actividad resulta esencial tanto para el desarrollo normal como para la preservación de las neuronas en *Drosophila*<sup>25</sup>. A este respecto, encontramos una elevada homología entre las proteínas Hu y las ELAV de *Drosophila*<sup>25</sup>. Debido a su similitud de secuencia, se especula que las proteínas Hu podrían desempeñar funciones similares en las neuronas de vertebrados<sup>25,26</sup>.

## **1.4. Técnicas inmunohistoquímicas**

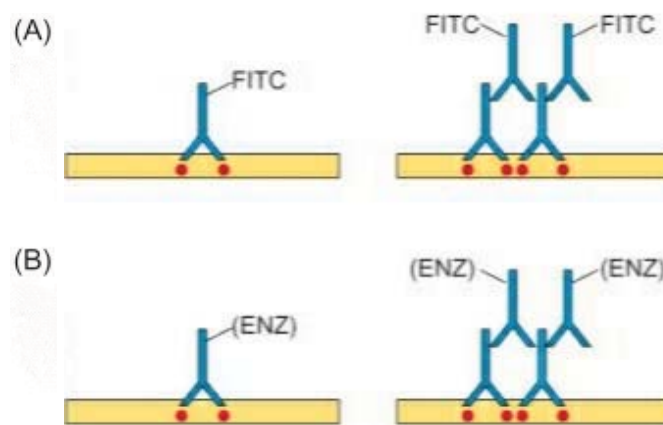
Las técnicas inmunohistoquímicas son procedimientos que tienen por objeto la identificación de componentes antigénicos celulares o tisulares, sirviéndose para ello de las uniones antígeno- anticuerpo<sup>27</sup>. Estas interacciones se basan en el reconocimiento específico entre la región Fab del anticuerpo (paratopo) y la inmunogénica del antígeno-proteína (epítopo).

La inmunoglobulina G (IgG) es el anticuerpo empleado con mayor frecuencia en abordajes inmunohistoquímicos. En función de su procedencia y características inmunológicas, podemos distinguir entre anticuerpos monoclonales y policlonales.

Los anticuerpos monoclonales se obtienen por la técnica del hibridoma. Puesto que todos los anticuerpos proceden de un mismo linaje clonal, presentan una especificidad idéntica frente a un epítipo particular.

Los anticuerpos policlonales, por otra parte, se obtienen a partir del suero de animales expuestos al inmunógeno de interés. En este contexto, la respuesta humoral experimentada por el animal, activa múltiples clones de las células plasmáticas. Cada clon producirá una estirpe de inmunoglobulinas particular, de modo que el suero extraído contendrá una mezcla de anticuerpos con afinidad para un mismo inmunógeno, pero distintos epítipos.

El revelado de la reacción inmunohistoquímica puede llevarse a cabo mediante métodos directos o indirectos (Figura 5)<sup>28</sup>.



**Figura 5.** Diagrama representativo de las técnicas inmunohistoquímicas. **(A)** Técnicas inmunofluorescentes de detección directa (izquierda) e indirecta (derecha). **(B)** Técnicas inmunoenzimáticas de detección directa (izquierda) e indirecta (derecha). FITC, Isotiocianato de fluoresceína (fluorocromo); ENZ, enzima. Fuente: MacLachlan, N.J., & Dubovi, E.J. (2016).

Los métodos directos implican el empleo de anticuerpos primarios directamente conjugados con el marcador. En los indirectos, se emplea un segundo anticuerpo marcado, dirigido frente a la inmunoglobulina de la especie animal de la que se ha obtenido el anticuerpo primario, evidenciando de este modo la presencia de un anticuerpo primario no marcado<sup>27</sup>. Este segundo abordaje presenta una serie de ventajas respecto al primero, en tanto que posibilita la amplificación de la señal emitida, y por tanto una mayor sensibilidad de la técnica. En el presente estudio se ha empleado el método inmunohistoquímico indirecto.



Estos métodos, en función del marcador utilizado para observar si ha ocurrido la reacción antígeno-anticuerpo, pueden clasificarse en:

❖ Técnicas inmunofluorescentes:

Estas técnicas utilizan fluorocromos, conjugados a los anticuerpos, para revelar si se ha producido la reacción antígeno-anticuerpo. Los fluorocromos son sustancias que absorben luz visible o ultravioleta de diferentes longitudes de onda, de modo que sus electrones alcanzan un estado de excitación transitorio. A continuación, el fluorocromo emite luz de mayor longitud de onda y sus electrones retornan a su estado basal<sup>27</sup>. Cada fluorocromo posee un espectro de excitación y emisión óptimos característicos.

❖ Técnicas inmunoenzimáticas:

El marcaje enzimático, en combinación con el uso de cromógenos, posibilita la obtención de productos estables, coloreados y aptos para su observación directa mediante microscopía óptica<sup>27</sup>. En este trabajo, se optó por el empleo de la enzima peroxidasa de rábano (HRP). Las muestras expuestas a la enzima, son posteriormente incubadas con diaminobencidina (cromógeno) y peróxido de hidrógeno (sustrato de la enzima). Si la interacción antígeno-anticuerpo ha tenido lugar, la peroxidasa de hidrógeno conjugada con el anticuerpo cataliza la reducción del sustrato. El aceptor de oxígeno es la diaminobencidina, que al oxidarse genera un precipitado de color marrón. En consecuencia, la visualización de precipitado es indicativo de la presencia del antígeno-proteína en esa región de la muestra.

## 2. Objetivos

Una vez conocidos qué aspectos del tema de interés han sido explorados y cuáles permanecen a espera de ser esclarecidos, se pretende con el presente trabajo de investigación, dar respuesta a los objetivos que se plantean a continuación:

- ❖ Determinar la presencia y distribución topográfica de las proteínas ligantes de calcio, calretinina y calbindina, en la retina del pez cebra (*Danio rerio*) adulto mediante técnicas inmunohistoquímicas.
- ❖ Determinar la presencia y distribución topográfica del neurotransmisor serotonina, en la retina del pez cebra (*Danio rerio*) adulto mediante técnicas inmunoenzimáticas e inmunofluorescentes.
- ❖ Determinar la presencia y distribución topográfica de las proteínas pertenecientes a la familia Hu, HuC y HuD, en la retina del pez cebra (*Danio rerio*) adulto mediante inmunofluorescencia.

### 3. Material y métodos

#### 3.1. Obtención y preparación de las muestras biológicas

Fueron empleados un total de 20 individuos pez cebra adultos en la realización del presente estudio de investigación.

Tras ser anestesiados con metanosulfonato de tricaína (MS-222, Sigma-Aldrich, 100 mg/L en agua de acuario), los peces cebra fueron sometidos a un proceso de fijación en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato (PB) 0,1M pH 7,4, mediante perfusión vascular. Posteriormente, los ojos de los individuos fueron extraídos y postfijados por inmersión en el mismo agente fijador durante 24 horas. La fijación posibilita la preservación de las características morfológicas y moleculares tisulares propias del organismo en su estado *in vivo*, al interrumpir la actividad celular sin ocasionar distorsiones estructurales significativas ni promover la autólisis.

El procesamiento continuó con el lavado de los ojos en PB, para frenar la fijación, y con la impregnación de la estructura biológica en un medio de inclusión adecuado para su posterior seccionado. La metodología difiere en función de si la impregnación se realiza en parafina líquida o en medio Tissue Tek.

##### 3.1.1. Bloques de parafina

Previa infiltración, se llevó a cabo un proceso de deshidratación de las muestras biológicas mediante inmersiones de 30 minutos cada una en una batería de etanoles de gradación creciente. La deshidratación tiene como propósito eliminar los residuos del agente fijador y el agua que se encuentra en las estructuras tisulares en forma libre. A continuación, el tejido fue expuesto a un agente de aclarado, miscible con el deshidratante previo, así como con el agente de infiltración posterior, posibilitando la penetración completa de este último. En este trabajo, el aclarado se llevó a cabo con xileno, un derivado dimetilado del benceno. La inclusión en parafina líquida (36114-4V, VWR Chemicals) se realizó en estufa a una temperatura de 60°C, con el objetivo de evitar la solidificación del agente. Las muestras fueron sometidas a tres baños sucesivos de 4-6 horas, 12 y 2 horas, respectivamente.

La confección del bloque de parafina se realizó en un molde metálico, responsable de conferir la forma característica al bloque sólido final, una vez enfriado.

Los bloques fueron posteriormente cortados en un microtomo de rotación (tipo Minot) en secciones transversales de 12  $\mu\text{m}$  de grosor, recogidas directamente sobre portaobjetos gelatinizados.

### **3.1.2. Bloques de Tissue Tek**

Una vez fijada y recuperada la estructura biológica de interés mediante disección, la muestra fue lavada en PB 0,1 M pH 7,4 y sometida, a continuación, a un tratamiento de criopreservación con el que evitar la formación de cristales de hielo que puedan dañar el tejido, como consecuencia de su congelación posterior. El tratamiento de criopreservación consistió en la inmersión de la muestra en una batería de tampón fosfato y sacarosa en concentración creciente (sacarosa al 10% durante 2 horas, al 20% durante 2 horas y al 30% durante 24 horas) y un baño final en sacarosa (al 30% en PB) y Tissue Tek en proporción 1:1, durante 3-4 horas.

La confección del bloque de Tissue Tek (4583, Sakura) se realizó en el interior de un recipiente con 2-metilbutano al 99% (126470010, Across organics) enfriado en nitrógeno líquido, de modo que la congelación de la muestra se produce de forma homogénea.

Los bloques fueron cortados en láminas de 12  $\mu\text{m}$  de grosor en un criostato a  $-20^{\circ}\text{C}$ , recogidas en portaobjetos gelatinizados, y conservados en nevera.

### **3.2. Tinciones**

Se realizaron dos tinciones generales, una con hematoxilina-eosina, y otra con violeta de cresilo, en parte de las muestras embebidas en parafina, con el objetivo de visualizar la estructura histológica de la retina del pez cebra y su organización en capas y, así, facilitar la interpretación posterior de los resultados derivados de la aproximación inmunohistoquímica.

Para llevar a cabo las tinciones, previamente se eliminó la parafina mediante 3 baños, de 5 minutos de duración cada uno, en xileno. Posteriormente, las secciones se hidrataron mediante inmersión en una batería de alcoholes de gradación decreciente, para finalizar con un baño en agua destilada (5 minutos por baño).

En el caso de la tinción hematoxilina-eosina, las muestras fueron expuestas a hematoxilina de Mayer durante 20 minutos y, tras un lavado bajo flujo de agua corriente, se sometieron a eosina al 2% durante 5 minutos. Por su parte, la tinción con violeta de cresilo comprendió la aplicación de la solución colorante y el lavado ulterior en agua destilada, una vez transcurridos los 20 minutos de exposición.

Finalmente, todas las muestras fueron sometidas a un proceso de deshidratación (baños de 5 minutos cada uno en batería de alcoholes de gradación creciente), aclarado en xileno durante 5 minutos, montaje del cubreobjetos con la resina sintética Eukitt® (O. Kindler) y secado en estufa a una temperatura de 40°C durante 24 horas.

### **3.3. Técnicas inmunohistoquímicas**

Las dos técnicas inmunohistoquímicas empleadas en este estudio difieren en la naturaleza del marcador empleado para revelar la presencia de la proteína de interés, pero su metodología en líneas generales es muy similar. En ambos casos, el tratamiento de las secciones comienza con la eliminación del medio de inclusión en el que estas se encuentran embebidas, en nuestro caso, parafina o Tissue Tek. Las muestras impregnadas en parafina fueron sometidas al mismo proceso de desparafinado e hidratación descrito en el apartado anterior. A continuación, se procedió con tres lavados en tampón fosfato salino (PBS; 0,01M pH 7,4) de 5 minutos de duración cada uno. Las muestras incluidas en Tissue Tek, por el contrario, no requieren de un proceso de desparafinado e hidratación previos, siendo suficiente para la eliminación del medio los lavados en PBS subsecuentes.

Con el objetivo de maximizar el número de epítomos disponibles para el reconocimiento posterior mediado por los anticuerpos, las muestras fueron sometidas a un proceso de recuperación antigénica. La recuperación antigénica se realizó en tampón ácido cítrico-citrato sódico 0,1M pH 6, a una temperatura de 95°C en baño termostático, durante 30 minutos. Tras su enfriamiento a temperatura ambiente, las muestras fueron sometidas a tres lavados consecutivos en PBS de 5 minutos de duración cada uno.

### 3.3.1 Técnicas inmunofluorescentes

Las muestras fueron sometidas a un tratamiento con borohidruro de sodio 0,1M (en PBS) durante 30 minutos y a temperatura ambiente, con el objetivo de eliminar la fluorescencia endógena inherente al tejido basal. A continuación, se llevaron a cabo dos lavados en PBS de 5 minutos cada uno, y un lavado en PBS con Tritón X-100 (PBS-T, 0,01% de Tritón-X-100 en PBS) de 5 minutos. Las secciones se incubaron en suero normal de cabra (NGS, G6767, Sigma-Aldrich, 1:10 en PBS), a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Tras una hora de exposición, se procedió con la incubación con el anticuerpo primario durante toda la noche y en cámara húmeda. Puesto que optamos por técnicas inmunohistoquímicas indirectas, el anticuerpo primario en este caso no va conjugado con el marcador fluorescente, y presenta especificidad por el epítipo (si monoclonal) o los epítipos (si policlonal) de la proteína que pretendamos detectar. Para las técnicas inmunofluorescentes, fueron empleados los anticuerpos policlonales de conejo: anti-calretinina (PA5-32287, Invitrogen, 1:1000 en PBS), anti-calbindina-D-28-K (PA5-50366, Invitrogen, 1:1000 en PBS) y anti-serotonina (S5545, Sigma-Aldrich, 1:1000 en PBS) y el anticuerpo monoclonal de ratón anti-HuC/D (A21271, Invitrogen, 1:500 en PBS).

Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se sometieron a dos lavados en PBS de 5 minutos de duración cada uno y uno de PBS-T de 5 minutos. Se procedió entonces con la incubación de las mismas con el anticuerpo secundario conjugado al marcador fluorescente, durante una 1 hora, a temperatura ambiente, en cámara húmeda y oscuridad. Así, las secciones incubadas con el anticuerpo primario monoclonal, fueron tratadas con el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con fluoresceína (GAR-FITC; F-2761, Invitrogen, 1:100 en PBS). Aquellas expuestas al anticuerpo primario policlonal, fueron tratadas con los anticuerpos secundarios de cabra anti-conejo conjugados con fluoresceína (GAR-FITC; F-2765, Invitrogen, 1:100 en PBS) o con Alexa flúor 568 (GAR-AlexaFluor568, A-11036, Invitrogen, 1:100 en PBS).

Por último, se procedió con el montaje del cubreobjetos con glicerol 1:1 en PBS y su conservación protegido de la luz y en nevera, hasta el momento de su visualización.



### **3.3.2. Técnicas inmunoenzimáticas**

Las muestras fueron tratadas con una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en PBS, durante un total de 30 minutos y a temperatura ambiente, con el objetivo de eliminar la actividad peroxidasa endógena y evitar la formación de falsos positivos. A continuación, se realizaron dos lavados en PBS y otro en PBS-T de 5 minutos de duración cada uno y, posteriormente, se incubaron en NGS (1:10 en PBS) a temperatura ambiente y en cámara húmeda. A continuación, se les aplicó el anticuerpo primario durante toda la noche y en cámara húmeda. Para las técnicas inmunoenzimáticas, fueron empleados los anticuerpos policlonales de conejo anti-calretinina (PA5-32287, Invitrogen, 1:1000 en PBS) y anti-serotonina (S5545, Sigma-Aldrich, 1:1000 en PBS).

Transcurrido el tiempo, los portaobjetos fueron sometidos a dos lavados en PBS de 5 minutos de duración cada uno y uno de PBS-T de 5 minutos. Se procedió entonces con la incubación de los mismos con el anticuerpo secundario conjugado a la enzima peroxidasa de rábano (HRP), durante una 1 hora, a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Para ello, se empleó el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (GAR-HRP, 12-348, Sigma-Aldrich, 1:100 en PBS), al tratarse de muestras expuestas a anticuerpo primario policlonal. Tras tres lavados en PBS de 5 minutos cada uno, las preparaciones fueron expuestas a una solución de diaminobencidina (DAB, D5637-56, Sigma-Aldrich) al 0,06% y peróxido de hidrógeno al 0,005% en PBS, durante aproximadamente 5 minutos y, seguidamente, sometidas a tres lavados de PBS de 5 minutos de duración cada uno.

Por último, se procedió a la deshidratación, aclarado y montaje de las secciones con la resina sintética Eukitt y su posterior secado en estufa a 40°C durante 24 horas.

### **3.4. Observación y procesamiento de las imágenes**

Las muestras tratadas fueron visualizadas en un microscopio de fluorescencia y de campo claro (Nikon Eclipse 90i) y fotografiadas mediante una cámara digital (Olympus DP71) acoplada a este. Las imágenes obtenidas, fueron procesadas con soporte del software de edición CorelDraw 2019.

## 4. Resultados

### 4.1. Tinciones

Con el objetivo de describir la estructura arquitectónica del tejido retiniano se llevó a cabo la tinción con hematoxilina-eosina (H-E) y con violeta de cresilo. La hematoxilina (básica) tiñe los núcleos de un tono azul oscuro, mientras que la eosina (ácida) tiñe el citoplasma y las fibras conectivas tisulares, en tonos rosados de distinta intensidad<sup>27</sup>. Por su parte, el violeta de cresilo es un colorante básico comúnmente usado en tejido nervioso, que tiñe el núcleo y los corpúsculos de Nissl (cúmulos de retículo endoplasmático rugoso) de las neuronas.

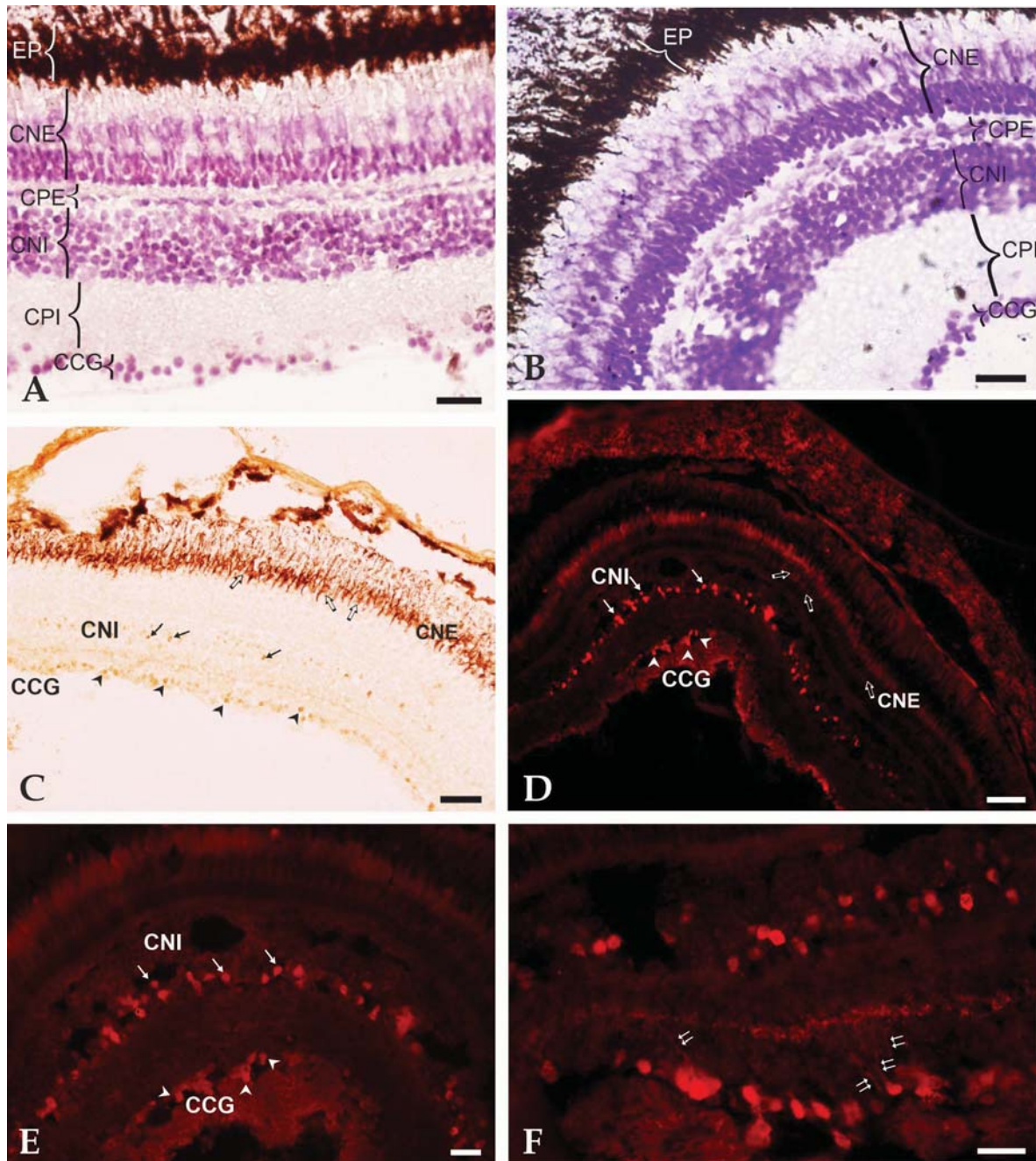
En consecuencia, las tinciones llevadas a cabo en este trabajo permiten diferenciar las distintas capas histológicas que conforman la retina de *Danio rerio*. La capa que exhibe una mayor intensidad de coloración en ambas tinciones, como consecuencia de su contenido pigmentado, corresponde con el epitelio pigmentario de la retina, la capa más externa (Figuras 6A y 6B). Partiendo del EP y en dirección hacia el interior de la retina, distinguimos: CNE, CPE, CNI, CPI y CCG. Las capas plexiformes o sinápticas presentan una coloración más tenue para ambas tinciones, con tonalidades rosa pálido en la tinción con H-E, en congruencia con su naturaleza fibrosa y conectiva. Las capas nucleares, que albergan los somas de las células retinianas, se tiñen más intensamente, como consecuencia de la coloración de sus núcleos con hematoxilina o, alternativamente, violeta de cresilo, confiriendo el color azul oscuro característico.

### 4.2. Técnicas inmunohistoquímicas

#### 4.2.1. Calretinina

Se obtuvo un patrón de inmunorreactividad positiva para la calretinina, consistente en ambas metodologías empleadas: inmunoenzimática e inmunofluorescente.

El revelado enzimático con peroxidasa de rábano-DAB, resultó en la visualización de precipitados color marrón en somas localizados principalmente en la periferia interna de la CNI, una banda longitudinal densa en la región media de la CPI y somas situados en la CCG (Figura 6C). A excepción de la banda descrita, no se obtuvo positividad en los axones neuronales.



**Figura 6.** Microfotografías de microscopía de campo claro (A, B y C) y de fluorescencia (D, E, F) de secciones transversales de retina del pez cebra, mostrando las diferentes capas en A (Tinción con H-E) y B (Tinción con violeta de cresilo). Inmunohistoquímica para la calretinina con revelado enzimático (C) y de fluorescencia (D-F) mostrando inmunorreactividad en capa celular ganglionar (puntas de flecha), en capa nuclear interna (flechas) así como en capa nuclear externa (flechas vacías). Se observan también procesos inmunorreactivos ascendentes desde CCG (flechas dobles). Barras de escala = 20  $\mu\text{m}$  (A, B, E, F), 50  $\mu\text{m}$  (C), 100  $\mu\text{m}$  (D).

Los resultados obtenidos con la técnica inmunofluorescente son concordantes con los obtenidos mediante el revelado enzimático. Así, se detectó positividad en CNI y

CCG (Figuras 6D y 6E). La banda longitudinal identificada en la región media de la CPI puede así mismo ser visualizada mediante inmunofluorescencia (Figura 6F). Los somas identificados en la CNI se sitúan casi exclusivamente en su región más interna. Si bien en la mayor parte de los casos no fue posible distinguir el número y dirección de sus prolongaciones, puntualmente se distingue un único inicio axónico en algunos cuerpos celulares, sugiriendo su correspondencia con una subpoblación de células amacrinas. Los cuerpos celulares localizados a nivel de la CCG, presumiblemente células ganglionares, conforman una banda densa longitudinal que delimita la periferia interna de la estructura retiniana.

#### **4.2.2. Calbindina**

La calbindina exhibió un patrón de distribución en la retina similar al de la calretinina, pero con algunas particularidades.

Al igual que en el caso anterior, se observa una mayor intensidad inmunofluorescente en somas celulares, pero no en sus fibras, localizados en la CNI y la CCG (Figuras 7A y 7B). Los cuerpos celulares situados en la CNI, sin embargo, no se restringen a la periferia interna de esta capa, sino que se localizan somas en mayor número y a diferentes niveles de la CNI, principalmente en su región interna y media. En este sentido, y al margen de la posible colocalización de ambas proteínas ligantes de calcio en ciertos tipos celulares, se interpreta la existencia de subpoblaciones exclusivas para la calbindina en la CNI de la retina del pez cebra.

La CCG, por su parte, presenta inmunorreactividad para la calbindina (CB-ir), aunque en menor grado que aquella asociada a los cuerpos celulares de la CNI o los cuerpos celulares de la CCG detectados con los anticuerpos anti-calretinina.

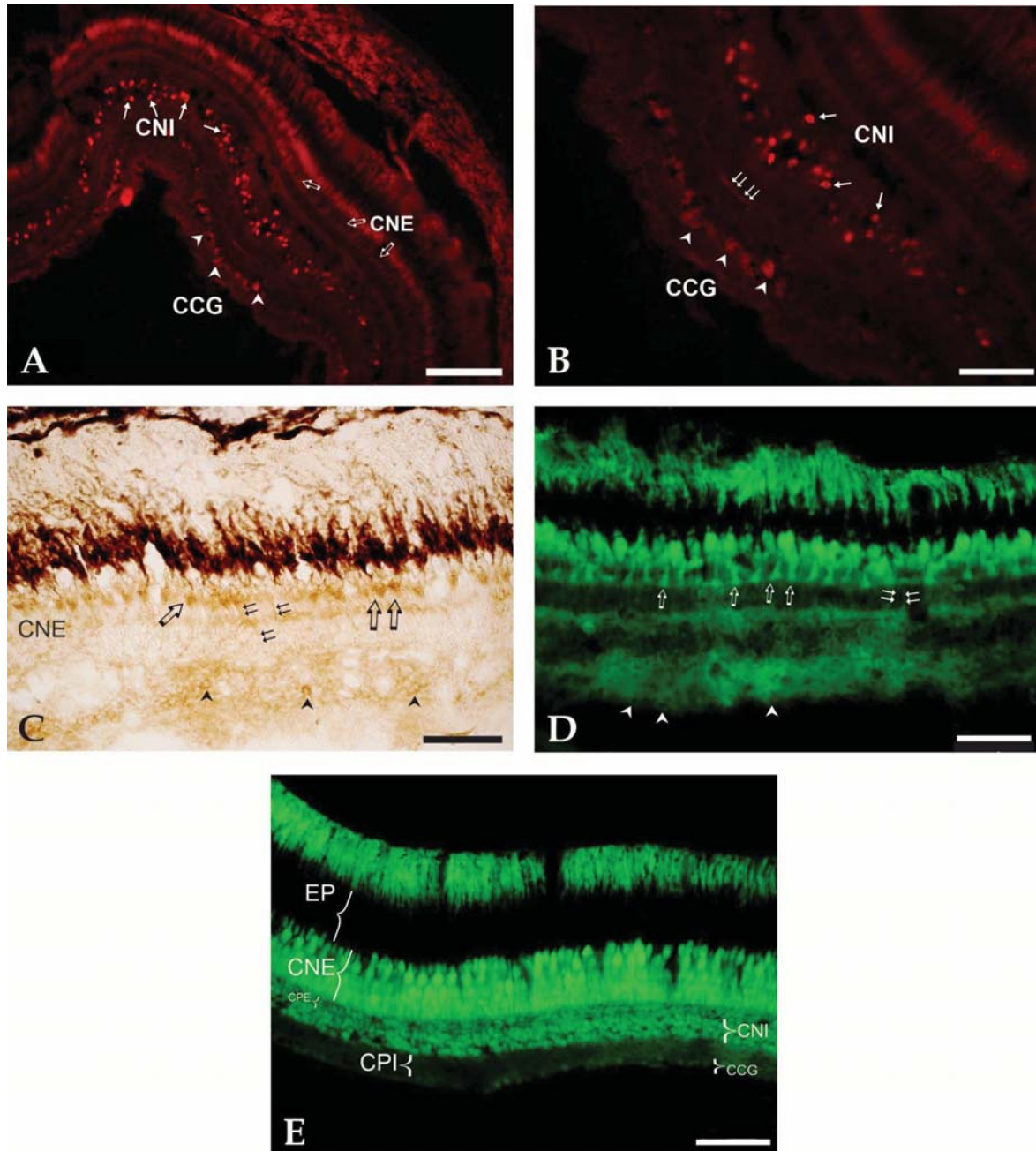
#### **4.2.3. Serotonina**

El revelado enzimático concuerda con aquel asociado al empleo de fluorocromos, derivando en un patrón de expresión de amplia distribución a lo largo de la estructura retiniana (Figuras 7C y 7D).

Se observa inmunopositividad a nivel de la CNE y la CNI, así como un patrón de aspecto fibrilar a nivel de la CPE y, con mayor intensidad, de la CPI. La inmunofluorescencia fibrilar procedente de las capas plexiformes es indicativa de la



presencia del neurotransmisor a nivel de los axones neuronales entre los que se establecen las sinapsis características de estas capas. Los somas localizados en la CNE, presumiblemente fotorreceptores, exhiben un patrón de expresión alterno a dos niveles de altura, lo que sugiere la presencia de serotonina en poblaciones celulares específicas (Figura 7D).



**Figura 7.** Microfotografías de microscopía de campo claro (C) y de fluorescencia (A, B, D, E) de secciones transversales de retina del pez cebra, mostrando inmunorreactividad para la calbindina (A, B), para la serotonina (C, D) y para la Hu C/D (E). A y B muestran células CB-ir en la capa celular ganglionar (puntas de flecha), en la capa nuclear interna (flechas) así como en la capa nuclear

externa (flechas vacías). Se observan también procesos inmunorreactivos en la capa plexiforme interna. Inmunohistoquímica para la serotonina con revelado enzimático (C) y de fluorescencia (D) mostrando somas serotonina inmunorreactivos en CNE (flechas vacías), además de procesos en CPE y CPI (flechas dobles). Las puntas de flecha indican contactos sinápticos inmunorreactivos rodeando los somas de las células de la CNI. Inmunofluorescencia para la proteína Hu C/D mostrando inmunoreactividad en somas neuronales de las capas celulares de la retina excepto EP. Barras de escala = 100  $\mu\text{m}$  (A), 50  $\mu\text{m}$  (B, C, D, E).

La CNI también exhibe una inmunofluorescencia significativa, pudiendo diferenciarse la morfología de somas celulares alargados en su periferia esclerótica, con prolongaciones extendiéndose a lo largo de la CPE (Figura 7D). Por su localización se infiere que estas células pueden corresponder con células bipolares.

En otras regiones más internas de la CNI, podemos diferenciar un patrón de expresión de aspecto granular, compatible con la presencia de sinapsis intercelulares serotoninérgicas que limitan con la periferia externa de los somas celulares situados en esta capa.

A nivel de la CPE, las prolongaciones se extienden transversalmente en forma vertical, mientras que, a nivel de la CPI, la fluorescencia parece exhibir un aspecto granular similar a aquel descrito para las regiones más internas de la CNI.

#### **4.2.4. HuC/D**

Al igual que lo observado para la serotonina, HuC/D exhibe un patrón inmunorreactivo ampliamente distribuido a lo largo de la retina. No obstante, en este caso la inmunopositividad parece concentrarse en las capas nucleares de la retina, en mayor medida que en sus capas plexiformes intermedias (Figura 7E).

Se observa expresión de la proteína en células fotorreceptoras situadas a dos alturas, a nivel de la CNE. En dirección hacia el interior, a continuación, detectamos señal fluorescente perteneciente a dos poblaciones celulares diferentes, localizadas en la CNI, en la periferia externa e interna de la capa nuclear correspondiente. En función de su localización, se infiere que los somas podrían corresponder con poblaciones de células horizontales y células amacrinas, respectivamente. Por último, se diferencian morfológicamente los somas redondeados de células ganglionares a la altura de la CCG, con intensidad equiparable a la referida para la CNE y la CNI.



## 5. Discusión

### ❖ Proteínas ligantes de calcio: Calretinina y calbindina

En el caso de la calretinina, el patrón de inmunorreactividad identificado concuerda con el descrito en observaciones previas. En el trabajo actual, confirmamos la expresión de calretinina en somas localizados en la periferia interna de la CNI y en la CCG, así como la existencia de una banda longitudinal en la región media de la CPI.

Un estudio inmunohistoquímico llevado a cabo por Yazulla y Studholme (2002) en retina de pez cebra, obtuvo inmunorreactividad para la calretinina en células ganglionares, células amacrinas y en un tipo celular cuyas prolongaciones se extienden hacia la CPE<sup>22</sup>. Sin embargo, y en ausencia de procesos descendentes, no pudieron dilucidar si estas últimas se corresponden con células bipolares o un tipo de célula interplexiforme. Así mismo, confirmaron la existencia de una banda longitudinal en la CPI, que infirieron deriva de algún tipo de célula amacrina piriforme<sup>22</sup>. Otro estudio, realizado por Weruaga et al. (2000) en la retina de dos teleósteos, identifica inmunopositividad para la calretinina en células ganglionares, distintas subpoblaciones de células amacrinas y en células bipolares, cuyas dendritas se extienden verticalmente y se ramifican horizontalmente a nivel de la CPE<sup>29</sup>. Nuevamente, los autores describen una banda longitudinal en la CPI, observando que algunas de las neuronas localizadas en la CCG extienden prolongaciones dendríticas en su dirección<sup>29</sup>. En suma, ambos estudios sugieren la correspondencia de la banda observada con una red multineuronal de conexiones sinápticas, presumiblemente entre células ganglionares y una subpoblación de células amacrinas. Esta interacción sería congruente con el papel modulador que las células amacrinas podrían ejercer sobre la respuesta visual.

La calbindina, por otra parte, exhibe un patrón similar al de la calretinina, aunque la inmunorreactividad asociada no parece responder en todos los casos a las mismas subpoblaciones positivas descritas para calretinina. En el estudio inmunohistoquímico llevado a cabo por Weruaga et al. se empleó un anticuerpo monoclonal frente a la calbindina D28k, observando la máxima positividad en somas localizados en el límite esclerótico de la CNI con prolongaciones extendiéndose a lo

largo de la CPE, que identificaron como un subtipo particular de célula horizontal<sup>29</sup>. Adicionalmente, los autores detectaron inmunorreactividad en somas localizados a distintos niveles de la CNI, con prolongaciones radiales extendiéndose a través de las distintas capas que conforman la estructura retiniana bidireccionalmente, siendo posteriormente identificadas como células de Müller<sup>29</sup>. Ante la imposibilidad de caracterizar las prolongaciones emitidas por los somas, no fue posible en el presente trabajo discernir las distintas poblaciones comprendidas en la CNI, y si efectivamente corresponden no sólo con poblaciones neuronales, sino también con células gliales.

Por último, cabe mencionar un estudio de caracterización inmunohistoquímica de la calretinina y la calbindina D28k llevado a cabo por Morona et al. (2011) en la retina de dos dipnoos o peces pulmonados. En este caso, los resultados derivados de los patrones de expresión independientes de ambas proteínas, llevaron a los autores a plantearse su posible expresión conjunta en algunas poblaciones neuronales<sup>20</sup>. En consecuencia, y tras un estudio de doble inmunofluorescencia, los autores concluyen la colocalización de ambas proteínas en algunas subpoblaciones de células bipolares y amacrinas, así como en células ganglionares<sup>20</sup>.

En este sentido, sería interesante plantear en futuras líneas de investigación el estudio simultáneo de los patrones de inmunorreactividad de ambas proteínas, con el objetivo de dilucidar qué subpoblaciones expresan exclusivamente calretinina o, alternativamente, calbindina, y cuáles colocalizan ambas proteínas. De este modo, podríamos comprobar si la retina del pez cebra se comporta igual que la de otros teleósteos y los dos dipnoos anteriormente descritos, en términos de colocalización.

#### ❖ Serotonina

Los cambios en la expresión de melatonina a lo largo del día como respuesta a la información lumínica externa, es una característica altamente conservada en la fisiología de los vertebrados. La producción de melatonina se encuentra regulada a diferentes niveles y por distintos mecanismos, entre ellos, la actividad de la enzima serotonina N-acetiltransferasa (AANAT) a nivel de la glándula pineal y la retina<sup>30</sup>. Concretamente, en el pez cebra adulto, el RNA mensajero de la AANAT-2 se expresa exclusivamente en células pineales y en los fotorreceptores de la retina<sup>30</sup>.

Siguiendo esta línea de expresión, el patrón inmunorreactivo alterno observado a nivel de la CNE sería concordante con las premisas planteadas. De este modo, se infiere que la fluorescencia emitida a este nivel podría ser el resultado del empleo de la serotonina como precursor de la melatonina, en poblaciones de fotorreceptores que expresan AANAT.

Por otra parte, en este trabajo se detectó una intensidad fluorescente significativa proveniente de somas localizados en la CNI, con prolongaciones extendiéndose transversalmente en ambas direcciones, de modo que a nivel de la CPE y la CPI se puede diferenciar un patrón de inmunoreactividad de aspecto fibrilar.

En el estudio inmunohistoquímico de Wilhelm et al. (1993) se analizó la distribución de la serotonina y de la enzima sintetizadora de serotonina, fenilalanina hidroxilasa, en la retina de distintos vertebrados, entre ellos la carpa dorada. Con este planteamiento, los autores discriminan dentro de las poblaciones inmunopositivas para el neurotransmisor, aquellas con capacidad serotoninérgica. Sus resultados concluyen la existencia de subpoblaciones amacrinas serotoninérgicas dentro de la retina de los organismos vertebrados no mamíferos considerados<sup>23</sup>. El resto de poblaciones inmunopositivas para el neurotransmisor, pero no para la enzima sintetizadora (células bipolares y otras subpoblaciones de células amacrinas), se infiere actúan como células acumuladoras de la serotonina producida por las neuronas serotoninérgicas. Puesto que la presencia de melatonina o sus enzimas productoras se restringe a la población de fotorreceptores, parece improbable que, en las células localizadas en la CNI, la serotonina se emplee como precursor de la melatonina<sup>23</sup>. Alternativamente, es posible que a este nivel la serotonina ejerza un papel neuromodulador o cotransmisor, como ya ha sido sugerido en observaciones previas. En este sentido, la detección de receptores para la serotonina en fotorreceptores, células amacrinas, células bipolares y en células ganglionares, respalda su función neuromoduladora dentro de la estructura<sup>21</sup>.

En particular, la acumulación de serotonina en células bipolares a nivel de la CNI, las cuales establecen contacto con fotorreceptores portadores de receptores para el neurotransmisor, podría ser indicativo de la existencia de una vía de comunicación célula bipolar- fotorreceptor en la que la serotonina desempeña un papel central<sup>21</sup>.

#### ❖ HuC/D

Desde su caracterización, las proteínas Hu neuronales han sido empleadas como marcadores neuronales en el estudio de diferentes tejidos, entre ellos la retina. En el caso de la retina de rata, existen estudios inmunohistoquímicos en los que se ha detectado actividad para el anticuerpo Anti-HuC/D en células amacrinas y células horizontales de la capa nuclear interna, así como para somas de células amacrinas desplazadas y células ganglionares, a nivel de la capa ganglionar<sup>31</sup>. Por el contrario, tanto las células bipolares como los fotorreceptores fueron inmunonegativos para el anticuerpo Anti-Hu C/D, independientemente de la etapa del desarrollo considerada.

En la retina del pez cebra, numerosos estudios emplean el anticuerpo anti-Hu C/D como marcador neuronal de células amacrinas y células ganglionares. En el presente trabajo, si bien se confirma su expresión en ambas poblaciones celulares, se observa adicionalmente positividad en fotorreceptores y en células situadas en la periferia externa de la CNI, identificadas por su localización como células horizontales, en consonancia con los resultados asociados a la retina de rata<sup>31</sup>.

## 6. Conclusiones

Todas las proteínas consideradas en el estudio se encuentran presentes en la retina del pez cebra adulto, exhibiendo los siguientes patrones de expresión:

- ❖ Las proteínas ligantes de calcio, calretinina y calbindina, muestran inmunorreactividad positiva en la CCG y la CNI principalmente, con células localizadas en la periferia interna de esta última para la calretinina, pero a distintos niveles de la región interna y media para la calbindina. Se infiere la existencia de subpoblaciones exclusivas para cada una de ellas y de subpoblaciones que colocalizan ambas proteínas.
- ❖ El neurotransmisor serotonina exhibió inmunorreactividad en somas situados a nivel de la CNE y la CNI, con prolongaciones extendiéndose a lo largo de la CPE y la CPI. Se sugiere su papel como precursor de la melatonina a nivel de los fotorreceptores, así como una función neuromoduladora en las capas más internas de la estructura.
- ❖ Las proteínas Hu consideradas, HuC/D, se asocian con un patrón de expresión generalizado a lo largo de la estructura, reiterando su utilidad como marcador neuronal de células amacrinas y células ganglionares, pero extendiendo su potencial a fotorreceptores y células horizontales.

## 7. Referencias bibliográficas

1. Howe, K., Clark, M. D., Torroja, C. F., Torrance, J., Berthelot, C., Muffato, M., ... Matthews, L. (2013). The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*, 496(7446), 498–503. doi:10.1038/nature12111
2. Wan, J., & Goldman, D. (2016). Retina regeneration in zebrafish. *Current Opinion in Genetics & Development*, 40, 41–47. doi:10.1016/j.gde.2016.05.009
3. Dudczig, S., Currie, P. D., & Jusuf, P. R. (2017). Developmental and adult characterization of secretagogin expressing amacrine cells in zebrafish retina. *PLOS ONE*, 12(9), e0185107. doi:10.1371/journal.pone.0185107
4. Parichy, D. M. (2015). Advancing biology through a deeper understanding of zebrafish ecology and evolution. *eLife*, 4. doi:10.7554/elife.05635
5. Fang, F. (2003). Phylogenetic analysis of the Asian cyprinid genus *Danio* (Teleostei, Cyprinidae). *Copeia*, (4), 714e728
6. McCluskey, B. M., & Braasch, I. (2020). Zebrafish Taxonomy and Phylogeny or Taxonomy and Phylogeny. *The Zebrafish in Biomedical Research*, 15–24. doi:10.1016/b978-0-12-812431-4.00002-6
7. Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2007). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83(1), 13–34. doi:10.1111/j.1469-185x.2007.00030.x
8. Niklaus, S., & Neuhauss, S. C. F. (2017). Genetic approaches to retinal research in zebrafish. *Journal of Neurogenetics*, 31(3), 70–87. doi:10.1080/01677063.2017.1343316
9. Schmitt, E. A., & Dowling, J. E. (1994). Early-eye morphogenesis in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *The Journal of Comparative Neurology*, 344(4), 532–542. doi:10.1002/cne.903440404



10. Moreno-Marmol, T., Cavodeassi, F., & Bovolenta, P. (2018). Setting Eyes on the Retinal Pigment Epithelium. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6. doi:10.3389/fcell.2018.00145
11. Gestri, G., Link, B. A., & Neuhauss, S. C. F. (2012). The visual system of zebrafish and its use to model human ocular Diseases. *Developmental Neurobiology*, 72(3), 302–327. doi:10.1002/dneu.20919
12. Cassar, S., Dunn, C., & Ramos, M.F. (2020). Zebrafish as an Animal Model for Ocular Toxicity Testing: A Review of Ocular Anatomy and Functional Assays. *Toxicologic Pathology*. 2021;49(3):438-454. doi:10.1177/0192623320964748
13. Bilotta, J., & Saszik, S. (2001). The zebrafish as a model visual system. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 19(7), 621–629. doi:10.1016/s0736-5748(01)00050-8
14. Connaughton, V. P., Graham, D., & Nelson, R. (2004). Identification and morphological classification of horizontal, bipolar, and amacrine cells within the zebrafish retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 477(4), 371–385. doi:10.1002/cne.20261
15. Li, Y. N., Matsui, J. I., & Dowling, J. E. (2009). Specificity of the horizontal cell-photoreceptor connections in the zebrafish (*Danio rerio*) retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 516(5), 442–453. doi:10.1002/cne.22135
16. Wagner, H.J., & Wagner, E. (1988). Amacrine cells in the retina of a teleost fish, the roach (*Rutilus rutilus*): a Golgi study on differentiation and layering. *Philos Trans R Soc Lond Biol* 321:263–324
17. Roski, C., Langrock, C., Körber, N., Habermann, G., Buse, E., Reichenbach, A., ... Francke, M. (2018). Comparison of cellular localisation of the Ca<sup>2+</sup>-binding proteins calbindin, calretinin and parvalbumin in the retina of four different Macaca species. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. doi:10.1111/ahe.12399
18. Kovács-Öller, T., Szarka, G., Ganczer, A., Tengölics, Á., Balogh, B., & Völgyi, B. (2019). Expression of Ca<sup>2+</sup>-Binding Buffer Proteins in the Human and

- Mouse Retinal Neurons. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), 2229. doi:10.3390/ijms20092229
19. Noebels, J.L., Avoli, M., Rogawski, M.A., Olsen, R.W., Delgado-Escueta, A.V. eds (2012) *Jasper's basic mechanisms of the epilepsies*, ed 4. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information
  20. Morona, R., Northcutt, R. G., & González, A. (2011). Immunohistochemical localization of calbindin D28k and calretinin in the retina of two lungfishes, *Protopterus dolloi* and *Neoceratodus forsteri*: Colocalization with choline acetyltransferase and tyrosine hydroxylase. *Brain Research*, 1368, 28–43. doi:10.1016/j.brainres.2010.10.098
  21. Masson, J. (2018). Serotonin in retina. *Biochimie*. doi:10.1016/j.biochi.2018.11.006
  22. Yazulla, S., & Studholme, K. M. (2002). Neurochemical anatomy of the zebrafish retina as determined by immunocytochemistry. *Chemical Anatomy of the Zebrafish Retina*, 3–44. doi:10.1007/978-1-4615-1089-5\_2
  23. Wilhelm, M., Zhu, B., Gábríel, R., & Straznicky, C. (1993). Immunocytochemical Identification of Serotonin-synthesizing Neurons in the Vertebrate Retina: A Comparative Study. *Experimental Eye Research*, 56(2), 231–240. doi:10.1006/exer.1993.1030
  24. Hinman, M. N., & Lou, H. (2008). Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(20), 3168–3181. doi:10.1007/s00018-008-8252-6
  25. Kim, C.-H., Ueshima, E., Muraoka, O., Tanaka, H., Yeo, S.-Y., Huh, T.-L., & Miki, N. (1996). Zebrafish *elav/HuC* homologue as a very early neuronal marker. *Neuroscience Letters*, 216(2), 109–112. doi:10.1016/0304-3940(96)13021-4
  26. Marusich, M.F., Furneaux, H.M., Henion, P.D., & Weston, J.A. (1994). Hu neuronal proteins are expressed in proliferating neurogenic cells. *J. Neurobiol.* 25, 143–155

27. Suvarna, S.K., Layton, C., & Bancroft, J.D. (2019). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques* (Octava ed.). Elsevier.
28. MacLachlan, N.J., & Dubovi, E.J. (2016). *Fenner's Veterinary Virology* (Quinta ed.). Academic Press.
29. Weruaga, E., Velasco, A., Briñón, J., Arévalo, R., Aijón, J., & Alonso, J. . (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), 1–15. doi:10.1016/s0891-0618(00)00046-6
30. Gothilf, Y., Coon, S. L., Toyama, R., Chitnis, A., Namboodiri, M. A. A., & Klein, D. C. (1999). Zebrafish SerotoninN-Acetyltransferase-2: Marker for Development of Pineal Photoreceptors and Circadian Clock Function1. *Endocrinology*, 140(10), 4895–4903. doi:10.1210/endo.140.10.6975
31. Ekström, P., & Johansson, K. (2003). Differentiation of ganglion cells and amacrine cells in the rat retina: correlation with expression of HuC/D and GAP-43 proteins. *Developmental Brain Research*, 145(1), 1–8. doi:10.1016/s0165-3806(03)00170-6

## 8. ANEXO

### Preparación de las soluciones empleadas

#### Tampón Fosfato (PB) 0,1M pH 7,4 (1 L)

- ❖ Fosfato monosódico 0,2M (95 mL):  
27, 598 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  en agua destilada hasta llegar al litro
- ❖ Fosfato disódico 0,2M (405 mL):  
71, 623 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  en agua destilada hasta llegar al litro
- ❖ Agua destilada (500 mL)

#### Tampón Fosfato Salino (PBS) 0,01M pH 7,4 (1 L)

- ❖ 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 1 L)

#### Paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1M y pH 7,4 (1 L)

1. Mezclar:
  - ❖ 500 mL de agua destilada (a 75-80°C de temperatura)
  - ❖ Paraformaldehído (40 g)
  - ❖ 2 gotas de NaOH 1M
2. Una vez enfriada la solución, añadir PB 0,2M pH 7,4

#### Violeta de cresilo (solución acuosa filtrada al 1%)

- ❖ Violeta de cresilo (1 g)
- ❖ Agua destilada (100 mL)
- ❖ 2 gotas de ácido acético al 10%

## Hematoxilina-eosina

**Hematoxilina de Mayer:** disolver, en el orden dado, los siguientes componentes en 750 ml de agua destilada:

- ❖ Sulfato de aluminio potásico (50 g)
- ❖ Hematoxilina (1 g)
- ❖ Iodato sódico (0,1 g)
- ❖ Ácido cítrico monohidratado (1 g)
- ❖ Hidrato de cloral (50 g)
- ❖ Agua destilada hasta completar 1 L

**Eosina** (solución acuosa al 2%):

- ❖ Eosina (2 g)
- ❖ Unas gotas de ácido acético glacial
- ❖ Agua destilada hasta completar 1 L