



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

TESIS DOCTORAL

El ácido retinoico y la retinogénesis del pez cebra

Héctor Carreño Gutiérrez

2013



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

El ácido retinoico y la retinogénesis del pez cebra

Memoria presentada por Héctor Carreño Gutiérrez
para optar al Título de Doctor en Neurociencias

Héctor Carreño Gutiérrez
Salamanca, 2013



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

José Aijón Noguera, Catedrático de Biología Celular y Rosario Arévalo Arévalo,
Profesora Titular de Biología Celular de la Facultad de Biología

HACEN CONSTAR:

Que el presente trabajo titulado “*El ácido retinoico y la retinogénesis del pez cebra*”, ha sido realizado por el licenciado en Biología D. Héctor Carreño Gutiérrez en el Departamento de Biología Celular y Patología de la Universidad de Salamanca y en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León.

Que ha sido desarrollado bajo nuestra dirección y dentro del programa de doctorado de Neurociencias de nuestra Universidad.

Que, en nuestra opinión, reúne todos los requisitos científicos y formales para ser defendido como Tesis Doctoral y así optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Para que así conste, expedimos el presente certificado.

El Director

La Directora

Fdo. J. Aijón Noguera

Fdo. R. Arévalo Arévalo

*A mis padres y
mis abuelos*

Agradecimientos

Esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la ayuda prestada por varias personas durante estos últimos cuatro años. A ellas también va dedicada.

En primer lugar, mis agradecimientos son a mis Directores de Tesis, el Prof. Dr. J. Aijón y la Profa. Dra. R. Arévalo. Agradezco al Prof. Aijón que me brindase la oportunidad de entrar a formar parte del Departamento de Biología Celular e iniciar mi carrera investigadora en su laboratorio. También le debo agradecer, además, su apoyo y confianza en mi labor. A la Profa. Arévalo, más allá de la dirección, supervisión e interés y valoración de mi hacer en su grupo en estos años de travesía predoctoral, quiero agradecer su cercanía, el apoyo y ayuda prestados en muy diversos momentos, su comprensión, y su trato tan amable y sincero desde que empecé a trabajar en su laboratorio, allá por el final de mi licenciatura.

A los dos les debo cinco años en el Departamento y en el INCyL, años de aprender, de trabajar, y de vivir.

En segundo lugar, tengo que agradecer su ayuda al Prof. Dr. J. Lara, el Prof. Dr. A. Porteros, y a la Profa. Dra. A. Velasco, por su buen hacer y su disposición a ayudarme, en cosas científicas -y a veces no tan científicas- siempre que lo he necesitado. Agradezco también a la Profa. Dra. C. Lillo por abrirme las puertas de su laboratorio, al igual que los Drs. E. Weruaga y J. R. Alonso. A nuestra técnico, Maite, y a su buena mano, también tengo cosas que agradecerle.

En tercer lugar, agradezco al Prof. S. Wilson y a la Dra. G. Gestri acogerme en su laboratorio de Londres durante mi estancia en el *University College London*, y al Dr. L. Valdivia, que me sirvió de apoyo y guía, al igual que los demás miembros de aquel lugar.

En cuarto lugar, agradezco al Dr. A. Santos Ledo que me iniciara en el manejo del pez cebra, y que me apoyara y ayudase después. A la Dra. V. Gonzalez y a D. Fernando les agradezco su ayuda, su tiempo y su confianza. Agradezco también su ayuda y sus ánimos a otros compañeros del laboratorio y del INCyL que se han ido doctorando -y algunos marchando- mientras yo batallaba con mis peces: Marta Parrilla, David Díaz, Marcelo, Carmela y Azu. Por último, agradezco a mis compañeros de laboratorio y del INCyL su ayuda prestada: Miguel -especialmente-, Maite, Saúl, Antonio, Roger y Bego.

Este trabajo ha sido posible gracias al contrato predoctoral del Programa de Ayudas al Personal Investigador de Reciente Titulación Universitaria de la Junta de Castilla y León (Orden EDU/1064/2009), y a la financiación del Ministerio de Ciencia e Innovación (BFU2009-11179) y de la Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León (Grupo de excelencia GR-183).

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Retinogénesis en el pez cebra y marcadores implicados	3
Formación de la copa óptica	3
Formación de la retina y el nervio óptico	5
Marcadores implicados en la retinogénesis	7
Pax6	8
Ath5	9
Sox2	9
PH3	10
Calretinina.....	10
Neurolina	11
Pax2	11
Slit2.....	12
Glutamina sintetasa.....	12
GFAP.....	12
Zpr1 y Zpr3.....	13
El ácido retinoico	13
Señalización celular del ácido retinoico	13
Síntesis.....	14
Raldh2.....	15
Raldh3.....	15
Regulación de la transcripción.....	16
Degradación.....	18
Teratogenia del AR	18
Deficiencia de AR.....	20
Funciones de ácido retinoico en la retinogénesis.....	21
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
MATERIAL Y MÉTODOS	27
Animal de experimentación: pez cebra.....	29
Mantenimiento y reproducción del pez cebra.....	29
Exposición de los animales a AR	30
Tratamiento con AR entre los 3 y 4 dpf.....	30
Tratamiento con AR entre las 24 y 48 hpf.....	30
Inhibición de la señalización del AR	31
Tratamiento con DEAB entre las 24 y 48 hpf.....	31
Tratamiento con AGN entre las 24 y 48 hpf.....	31
Administración de Bromo-deoxiuridina (BrdU).....	32
Inyección del morfolino de p53.....	32
Obtención y genotipado de embriones mutantes para <i>raldh3</i>	33
Identificación de los adultos reproductores	33
Obtención y genotipado de los embriones mutantes.....	35
Procesamiento histológico	36
Fijación	36
Obtención de secciones en criostato	36
Obtención y tinción de secciones semifinas	37
Determinación de la muerte celular por apoptosis mediante TUNEL	38
Inmunohistoquímica.....	39

Inmunohistoquímica ABC <i>in toto</i>	39
Inmunofluorescencia sobre secciones de tejido	41
Diseño y obtención de las ribosondas de <i>neurolina-a</i> y <i>neurolina-b</i>.....	43
Diseño de los cebadores o <i>primers</i>	43
Extracción del ARN y obtención del ADN copia.....	43
Obtención y ligación de los amplicones al plásmido.....	44
Clonación del plásmido.....	46
Determinación de la orientación del amplicón en el plásmido	47
Síntesis de las ribosondas.....	47
Hibridación in situ in toto	48
Análisis de imágenes	51
Conteos de células y medición de áreas	51
Análisis estadístico de los datos	52
RESULTADOS.....	53
Efectos del tratamiento con ácido retinoico entre los 3 y 4 dpf.....	55
Morfología y tamaño de la retina.....	55
Proliferación celular	56
PH3	57
BrdU	58
Neurogénesis.....	59
Pax6	59
Sox2.....	60
Diferenciación celular	62
CR.....	62
GS	63
Nervio óptico	67
Neurolina	67
Neurolina-Pax2.....	68
<i>Neurolina-a</i>	71
<i>Neurolina-b</i>	72
<i>Pax2a</i>	73
Identidad de las células Pax2 positivas	74
<i>Slit2</i>	75
Efectos del tratamiento con ácido retinoico entre las 24 y 48 hpf.....	77
Morfología	77
Citoarquitectura y tamaño de la retina	78
Muerte celular	80
Inyección p53.....	82
Proliferación celular.....	85
PH3	85
BrdU	86
Neurogénesis.....	88
Pax6	88
Sox2.....	90
Ath5	93
Diferenciación celular	94
CR.....	94
GS	95
Zpr1 y Zpr3.....	96
Nervio óptico	100
Neurolina	100

Neurolina-Pax2	101
<i>Neurolina-a</i>	105
<i>Neurolina-b</i>	106
<i>Pax2a</i>	108
Identidad de las células Pax2 positivas	109
<i>Slit2</i>	112
Efectos del tratamiento con DEAB entre las 24 y 48 hpf	114
Tamaño de la retina	114
Neurogénesis	115
H3P	115
Pax6	116
Sox2	117
Diferenciación celular	118
CR	118
GS	119
GFAP	120
Nervio óptico	121
Neurolina-Pax2	121
Efectos del tratamiento con AGN entre las 24 y 48 hpf	122
Tamaño de la retina	122
Neurogénesis	123
H3P	123
Pax6	126
Sox2	125
Diferenciación celular	126
CR	126
GS	127
GFAP	128
Nervio óptico	129
Neurolina-Pax2	129
Caracterización de los embriones mutantes para <i>raldh3</i>	130
Tamaño de la retina	130
<i>Raldh2</i>	130
PH3	132
Pax6	133
Neurolina-Pax2	134
DICUSIÓN	135
Influencia del AR sobre la retinogénesis larvaria	137
Influencia del AR sobre la retinogénesis embrionaria	142
Inhibición de la señal del AR durante la retinogénesis embrionaria	158
Mutantes para <i>raldh3</i>	161
CONCLUSIONES	165
BIBLIOGRAFÍA	169

INTRODUCCIÓN

Retinogénesis en el pez cebra y marcadores implicados

El proceso de formación de la retina de los vertebrados ha servido como modelo para conocer la neurogénesis del Sistema Nervioso Central (SNC) en general. Su estudio ha proporcionado información sobre la base de algunas enfermedades visuales humanas así como estrategias para estudiar posibles terapias regenerativas. Uno de los modelos animales que más está ayudando al conocimiento de la neurogénesis de la retina es el pez cebra. Una de las razones es que, debido al desarrollo externo de dichos organismos, el proceso de la neurogénesis de la retina es fácilmente accesible y manipulable. El embrión es transparente y hay multitud de herramientas desarrolladas en el campo de la biología celular y la genética. Además, la neurogénesis persiste a lo largo de toda la vida del animal, y por ello es capaz de responder a lesiones en la retina o en el nervio óptico regenerándolos, lo que permite desarrollar estrategias para intentar restaurar la función visual en humanos. Por otra parte, los peces cebra tienen visión en color, lo que los hace muy adecuados para estudios de patologías que afectan a los conos.

Al igual que ocurre en el resto de vertebrados, la retina del pez cebra también se desarrolla a partir de una única capa, relativamente homogénea, de células neuroepiteliales y siguiendo las mismas etapas.

Formación de la copa óptica

La especificación de la región del embrión a partir de la cual se originará la retina comienza en la gastrulación, cuando se forma el campo morfogenético del ojo en la región más anterior de la placa neural (Li *et al.*, 1997). Entre las 11 y las 13 horas postfecundación (hpf) se produce la migración lateral de las células del campo del ojo, de manera que se originan los primordios ópticos como dos expansiones bilaterales que permanecen unidas al encéfalo por los llamados tallos ópticos, situados en la región más anterior del embrión (Schmitt y Dowling, 1994; Li *et al.*, 1997). El lumen de los primordios se desarrolla a las 13 hpf, y la unión de este lumen con los ventrículos se produce a las 16 hpf (Hyatt *et al.*, 1992). Los primordios ya cavitados se denominan vesículas ópticas (Fig. 1).

A medida que avanza el desarrollo, las vesículas ópticas experimentan una rotación según su eje naso-temporal, de forma que la superficie ventral de las mismas se

dirige hacia el encéfalo y la dorsal hacia el exterior (Schmitt y Dowling, 1994). Simultáneamente se invagina la superficie externa de cada vesícula óptica, a la vez que el ectodermo cutáneo adyacente se engrosa para constituir los primordios de los cristalinos. A medida que la invaginación continúa, la vesícula óptica va dando lugar a la copa óptica (Fig. 1), cuya conexión con el encéfalo se reduce a una estrecha abertura en posición nasal que se continúa por el tallo óptico, y se conoce como fisura coroidea (Schmitt y Dowling, 1994) (Fig. 2).

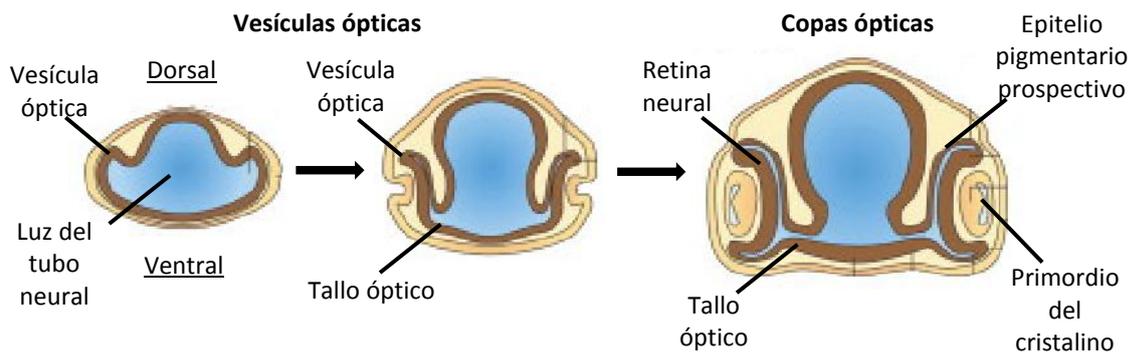


Figura 1: Esquema que muestra la formación de las copas ópticas a partir de las vesículas ópticas. Modificado de Graw, 2010.

A las 24 hpf la copa óptica está formada (Schmitt y Dowling, 1994) y se encuentra organizada en dos regiones: la región distal, que es un neuroepitelio indiferenciado que dará lugar a la retina neural, y la región proximal, que es un estrato de células que dará lugar al epitelio pigmentario (Fig. 1). Ambas regiones están separadas por el lúmen óptico, que desaparecerá más adelante en el desarrollo.

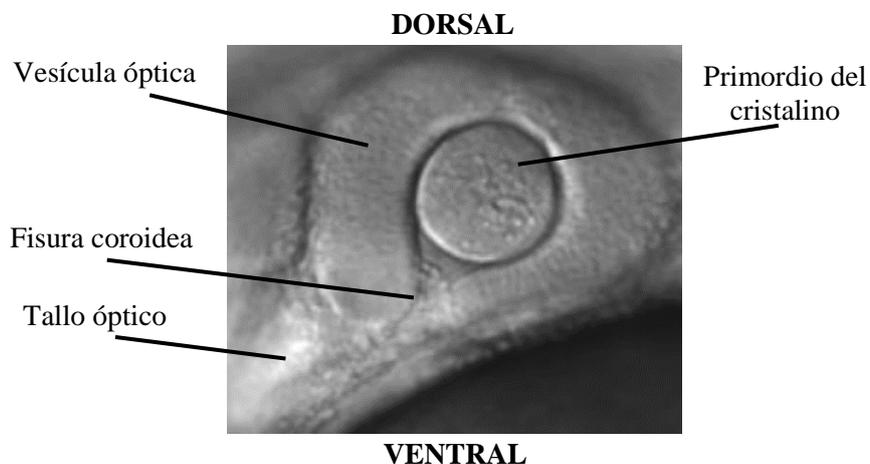


Figura 2: Fotografía de la vesícula óptica del pez cebra unida al tallo óptico en la que se aprecia la fisura coroidea. Extraída de www.ucl.ac.uk/zebrafish-group/research/eye.php.

Formación de la retina y el nervio óptico

La formación de la retina o retinogénesis es el conjunto de procesos mediante los cuales el neuroepitelio indiferenciado y el epitelio pigmentario, que constituyen la copa óptica, se fusionan y dan lugar a la retina, con sus diferentes capas y tipos celulares. La neurogénesis y la diferenciación celular comienzan en la región ventro-nasal de la copa óptica, adyacente a la fisura coroidea y el tallo óptico, en respuesta a señales procedentes del tallo óptico del embrión (Masai *et al.*, 2000). Las primeras células postmitóticas se encuentran en esa región a partir de las 24 hpf y se diferencian a células ganglionares. La formación de estas células progresa hacia la región dorsal de la copa óptica y de ahí se extiende hacia la región ventro-temporal, describiendo un círculo en el sentido de las agujas del reloj (Kljavin, 1987; Hu y Easter, 1999; Schmitt y Dowling, 1999).

Los diferentes tipos celulares son generados secuencialmente y la retina se forma capa a capa, desde la región distal o vitreal hacia la parte proximal o escleral, siguiendo el mismo patrón, en el sentido de las agujas del reloj (Hu y Easter, 1999). Los precursores de las células ganglionares sufren sus mitosis finales entre las 24 y las 36 hpf y las células de la capa nuclear interna entre las 36 y las 48 hpf.

Los axones de las células ganglionares comienzan a crecer a las 30 hpf, se adentran en el tallo óptico a través de la fisura coroidea y alcanzan la línea media del embrión, donde pocas horas después formarán el quiasma óptico (Burrill y Easter, 1995; Hu y Easter, 1999). A la vez que los axones avanzan, las células del tallo óptico se diferencian a células gliales, que delimitan la fisura coroidea y están directamente involucradas en su cierre (Macdonald *et al.*, 1995). Estas células participan en la guía de los axones de las células ganglionares de la retina (Stuermer y Bastmeyer, 2000). Mientras los axones van creciendo y saliendo de la copa óptica, el tallo óptico va desapareciendo y en su lugar quedan los axones, células gliales y vasos sanguíneos, que en conjunto constituyen el nervio óptico. Los axones del nervio óptico alcanzan la región anterior del techo óptico a las 48 hpf (Stuermer, 1988; Burrill y Easter, 1995).

A los 3 días postfecundación (dpf), se han diferenciado las células de Müller y los fotorreceptores. A partir de ese estadio los axones del nervio óptico inervan también la región posterior del techo óptico y la retina ya tiene sus capas organizadas. Además, en el margen se distingue la zona periférica germinal (ZPG).

La ZPG, que está constituida por una población de células proliferativas con morfología neuroepitelial (Raymond y Rivlin, 1987), se mantiene tras la retinogénesis

embrionaria durante la vida adulta del animal y se dispone formando un anillo en el margen de la retina (Müller, 1952; Johns, 1977). Se trata de una región que ha sido considerada como un remanente del neuroepitelio embrionario (Jonhs, 1977), aunque tiene características que la diferencian de aquel (Wehman *et al.*, 2005). Además de autorrenovarse, estos progenitores continúan generando todos los tipos celulares de la retina -con la excepción de los bastones (Raymond, 1991)- durante toda la vida del animal (Müller, 1952; Johns, 1977; Meyer, 1978; Rusoff y Easter, 1980; Sharma y Ungar, 1980; Fernald, 1991; Olson *et al.*, 1999; Otteson y Hitchcock, 2003). De esta manera, la retina crece en anillos concéntricos a partir de la ZPG de manera indefinida desde el estadio de larva de 3 dpf.

Así, podemos estudiar la retinogénesis durante el periodo embrionario, que dura hasta los 3 dpf, durante el periodo larvario, desde los 3 dpf hasta los 5 dpf, o durante el resto de la vida del animal. A partir del estadio de 5 dpf la retina presenta una organización histológica con todas las capas nucleares y plexiformes que se reconocen en el animal adulto, además de la ZPG (Fig. 3):

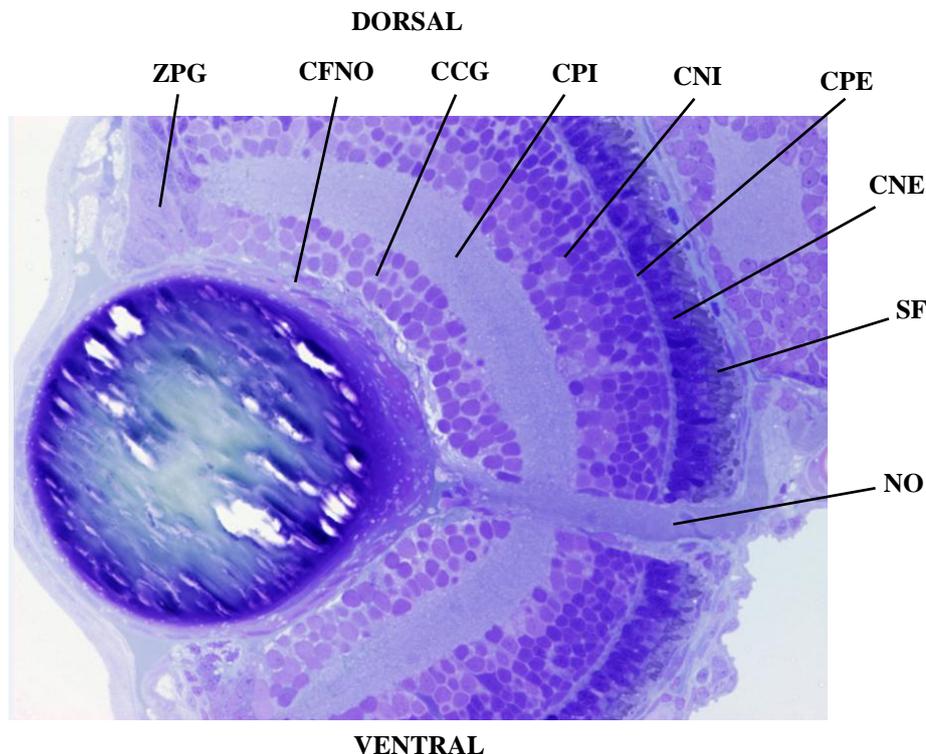


Figura 3: Sección semifina teñida con azul de toluidina de un ojo de pez cebra a los 5 dpf en la que se indica la organización histológica de la retina, similar a la del adulto.

- ZPG (zona periférica germinal), que es un nicho neurogénico durante toda la vida del animal.
- CFNO (Capa de las fibras de nervio óptico), por donde discurren los axones de las células ganglionares hacia el nervio óptico.
- CCG (Capa de las células ganglionares), compuesta por los somas de las células ganglionares de la retina y de las células amacrinas desplazadas.
- CPI (Capa plexiforme interna), formada por los procesos de las células bipolares, interplexiformes, amacrinas y ganglionares.
- CNI (Capa nuclear interna), constituida por los somas de las interneuronas y de las células de Müller.
- CPE (Capa plexiforme externa), donde se localizan las sinapsis entre los fotorreceptores y las interneuronas.
- CNE (Capa nuclear externa), donde se sitúan los somas de los conos y los bastones.
- SF (Capa de los segmentos de los fotorreceptores), formada por los segmentos internos y externos de los conos y los bastones.

Durante la formación de la retina en el periodo embrionario tienen lugar escasos procesos de muerte celular (Cole y Ross, 2001). Sin embargo, sucesivas oleadas de muerte celular por apoptosis se producen después de la génesis de las distintas capas de la retina. Una oleada se produce en la CCG con un máximo a los 3 dpf, otra menor se produce en la CNI a los 4 dpf, y otra tiene lugar en la CNE con un máximo a los 7 dpf (Biehlmaier *et al.*, 2001).

Marcadores implicados en la retinogénesis

Durante el proceso de retinogénesis en el pez cebra, ya sea en el periodo embrionario o durante el resto de la vida del animal, se expresan diferentes genes, altamente conservados en todos los vertebrados, que codifican diversas proteínas, como factores de transcripción, enzimas, proteínas estructurales o secretables, que orquestan este proceso y están relacionadas entre sí y con otras. Algunos son genes que mantienen la multipotencialidad celular, otros son proneurales o determinan el destino de las células; algunos intervienen en la proliferación y otros en la diferenciación celular; otros

intervienen en la síntesis de factores o de morfógenos que dirigen procesos como la guía axonal o la morfogénesis de la retina (Fig. 4).

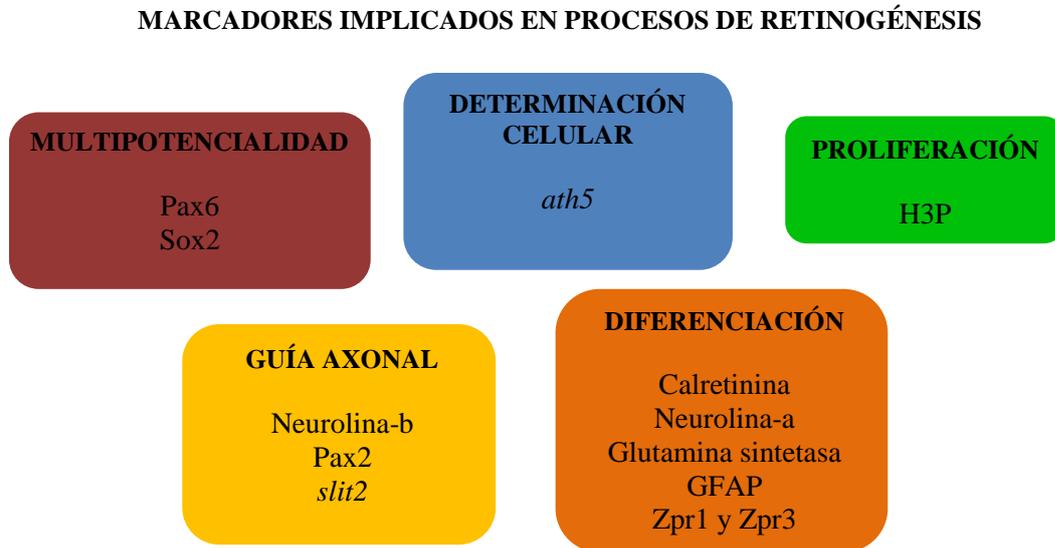


Figura 4: Procesos de la retinogénesis y algunos de los genes y proteínas implicados en ellos.

Pax6

El gen *pax6* (*paired box gene 6*), del que hay dos coortólogos en el pez cebra (*pax6a* y *pax6b*) (Nornes *et al.*, 1998) codifica un factor de transcripción que contiene dos dominios de unión a ADN: un *paired domain* y un homeodominio. En todas las especies estudiadas, los homólogos de *pax6* están implicados en el desarrollo del ojo. En los vertebrados, *pax6* se expresa en el primordio del ojo (Macdonald *et al.*, 1995) y es necesario para mantener la multipotencialidad de las células progenitoras de la retina (Marquardt *et al.*, 2001).

La expresión de *pax6* persiste durante los estadios tempranos de la neurogénesis retiniana en todos los tipos celulares, hasta que a los 3 dpf dicha expresión queda restringida a las células ganglionares y amacrinas diferenciadas (Hitchcock *et al.*, 1996), en las que no se conoce su función, y también en las células de Müller, en las que mantiene su estado multipotente (Bernardos *et al.*, 2007). Además, en los modelos estudiados, *pax6* activa la expresión de factores de transcripción bHLH que determinan el destino celular, como *ath5* (Brown *et al.*, 1998; Marquardt *et al.*, 2001).

Ath5

Los genes *ath* de vertebrados (homólogos del gen *atonal* de *Drosophila*) junto con la familia de genes *ash* (homólogos del complejo génico *achaete-scute* de *Drosophila*) constituyen dos categorías principales de genes proneurales que codifican factores de transcripción que contienen motivos bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*). En el pez cebra, *ath5* se expresa antes de la diferenciación de las primeras neuronas de la retina siguiendo un patrón que anticipa las oleadas de neurogénesis y diferenciación (Masai *et al.*, 2000).

El sitio inicial de expresión de *ath5* es la región ventro-nasal de la copa óptica, adyacente a la fisura coroidea y el tallo óptico. El pez cebra mutante de *ath5*, denominado *lakritz*, carece de células ganglionares en la retina, aunque el resto de tipos celulares sí se diferencian, y en mayor número que en los animales silvestres (Kay *et al.*, 2001). En otros modelos se ha demostrado que *ath5* regula la expresión de genes específicos de células ganglionares y es esencial para la formación de las mismas (Liu *et al.*, 2001).

Sox2

Sox2 (*Sex determining region Y-box 2*) se expresa en células troncales multipotentes del neuroepitelio embrionario y se encarga de mantener su capacidad proliferativa, compitiendo con los factores proneurogénicos (Bylund *et al.*, 2003). Además, interacciona con Pax6 en distintos momentos de la morfogénesis del ojo (Hever *et al.*, 2006; Inoue *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2009). Está implicado en la diferenciación de células amacrinas de la retina de pollo (Rouède *et al.*, 2002) y de ratón (Lin *et al.*, 2009), y se mantiene su expresión en células amacrinas colinérgicas diferenciadas (Fischer *et al.*, 2010a), al igual que en el pez cebra (Jusuf y Harris, 2009). Sox2 se expresa en células gliales de la retina, como astrocitos (Fischer *et al.*, 2010b) y células de Müller (Taranova *et al.*, 2006). Su mutación se ha relacionado con la anoftalmia (Fantes *et al.*, 2003; Hever *et al.*, 2006; Williamson *et al.*, 2006).

PH3

La PH3 (phosphohistone H3) pertenece a la familia de las histonas, que son unas proteínas de unión al ADN que regulan el nivel de condensación del mismo, ya que forman parte de los nucleosomas, la unidad básica de la cromatina. Las diversas modificaciones postraduccionales que pueden sufrir controlan los diferentes niveles de organización del ADN (Luger *et al.*, 1997; Ridgway y Almouzni, 2001). En todos los eucariotas, durante la mitosis, la histona H3 presenta una fosforilación en su extremo N-terminal, en el residuo de serina 10 (Ser10) (Prigent y Dimitrov, 2003). Esta modificación está relacionada espacial y temporalmente con la condensación cromosómica: comienza en la fase G₂ tardía del ciclo celular, en la heterocromatina pericentromérica y se extiende por todo el núcleo durante la transición a la fase M. Su desfosforilación se inicia en la anafase y se completa en la telofase (Henzel *et al.*, 1997).

Calretinina

La Calretinina (CR) es un miembro de la superfamilia de proteínas ligantes de calcio, a la que pertenecen también la Calbindina, la Parvalbúmina y la Calmodulina. Estas proteínas se caracterizan por tener un dominio “mano E-F” de unión a calcio (Lukas y Jones, 1994). Se encuentra, principalmente, en neuronas sensoriales del SNC (Resibois y Rogers, 1992). En peces teleósteos se conoce la distribución de Calretinina en diferentes zonas del sistema visual (Arévalo *et al.*, 1995; Castro *et al.*, 2003, 2006; Arenzana *et al.*, 2011).

En la retina del pez cebra se empieza a detectar a las 48 hpf en las células amacrinas (Arenzana *et al.*, 2011). Posteriormente, se encuentra en las células ganglionares y en células de la CNI, manteniéndose esta distribución hasta la edad adulta (Yazulla y Studholme, 2001; García-Crespo y Vecino, 2004; Arenzana *et al.*, 2011; Cederlund *et al.*, 2011). La Calretinina está implicada en los procesos de diferenciación celular (Brandt *et al.*, 2003; Kempermann *et al.*, 2004), y se utiliza como marcador de este proceso *in vivo* (Fischer *et al.*, 2002; Karl *et al.*, 2008; Ferreiro-Galve *et al.*, 2010) y en cultivos celulares (Yang *et al.*, 2002; Lawrence *et al.*, 2007)

Neurolina

La Neurolina [también *alcam* o *zf DM-GRASP* (Kanki *et al.*, 1994)] es una inmunoglobulina de superficie homóloga del complejo ALCAM de humanos. Neurolina/ALCAM posee cinco dominios extracelulares *Ig-like* y una corta porción intracelular (Paschke *et al.*, 1992; Laessing *et al.*, 1994). Esta proteína de superficie funciona como molécula de adhesión extracelular, e interviene en el crecimiento y guía axonal (Deiner *et al.*, 1997; Stuermer y Bastmeyer, 2000). El anticuerpo Zn-8 reconoce la Neurolina y es especialmente útil para inmunodetectar los axones jóvenes en crecimiento de las células ganglionares de la retina (Trevarrow *et al.*, 1990; Westerfield, 1995; Arenzana, 2006).

Recientemente, en el pez cebra se ha descrito la existencia de dos genes parálogos (*neurolin-a* y *neurolin-b*) que codifican para dos isoformas distintas de la Neurolina, la Neurolina-a y la Neurolina-b, con diferentes funciones en el desarrollo del sistema visual (Diekmann y Stuermer, 2009). La Neurolina-a es imprescindible para la diferenciación de las células ganglionares de la retina, mientras que la Neurolina-b interviene en la fasciculación y guía de los axones de dichas células hasta el techo óptico.

Pax2

Los genes *pax* codifican proteínas que constituyen una familia de factores de transcripción caracterizados por la presencia de un dominio *paired* de 128 aminoácidos que codifica un único motivo de unión a ADN (Chalepakis *et al.*, 1991; Treisman *et al.*, 1991). *Pax2* es fundamental en la formación del nervio óptico (Dressler *et al.*, 1990; Czerny *et al.*, 1993). Durante el desarrollo del sistema visual del pez cebra, al igual que en otros vertebrados, *pax2* se expresa en la región ventral de la vesícula óptica y, tras la formación de la copa óptica, su expresión se restringe a las células gliales del tallo óptico (Macdonald *et al.*, 1995; Torres *et al.*, 1996). Dichas células intervienen en la correcta guía y empaquetamiento de los axones de las células ganglionares de la retina (Macdonald *et al.*, 1997). También se ha descrito la expresión de *pax2* en el organizador ístmico o MHB (*Midbrain-Hindbrain-Boundary*), que es la región que limita el mesencéfalo y el rombencéfalo, en el rombencéfalo y en la médula espinal (Krauss *et al.*, 1991, 1992; Hyatt *et al.*, 1996b; Arenzana, 2006).

Slit2

Slit es una familia de proteínas secretables que funcionan como factores quimiotrópicos repelentes de los axones que cruzan la línea media del SNC (Rothberg *et al.*, 1988). Estas proteínas interactúan con sus receptores, denominados Robo (*Roundabout*), de manera que controlan la guía y empaquetamiento de los axones comisurales en crecimiento (Kidd *et al.*, 1998). Los homólogos del gen *slit* han sido encontrados en todas las especies de vertebrados estudiadas. En el pez cebra se han identificado cuatro homólogos de la familia génica *slit*: *slit1a*, *slit1b*, *slit2* y *slit3*, de los cuales sólo *slit2* se expresa en la retina (Yeo *et al.*, 2001, Miyasaka *et al.*, 2005).

Slit2 comienza a expresarse durante la gastrulación en el borde anterior de la placa neural y el mesodermo axial. Más tarde se expresa a lo largo de la línea media del embrión en la placa del suelo del SNC (Yeo *et al.*, 2001). Se ha propuesto que *slit2* funciona como factor repelente para los axones de las células ganglionares en el quiasma óptico (Erskine *et al.*, 2000; Niclou *et al.*, 2000) y también dentro de la retina (Thompson *et al.*, 2009).

Glutamina sintetasa

La enzima Glutamina sintetasa (GS) está presente en todas las especies analizadas y en casi todos los tejidos y cataliza la transformación de amonio y glutamato en glutamina (Meister, 1974). En el SNC de vertebrados, la GS desempeña un papel fundamental en la detoxificación del amonio y en la regulación metabólica del neurotransmisor glutamato. Esta enzima es un marcador astrocitario (Norenberg y Martínez-Hernández, 1979; Linser y Moscona, 1983; Mearow *et al.*, 1989; Derouiche y Ohm, 1994; Suárez *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 1999), de células de Müller de la retina (Riepe y Norenburg, 1977; Linser y Moscona, 1979; Derouiche y Rauen, 1995; Prada *et al.*, 1998), así como de glía radial y de endotelio en todos los modelos estudiados (Monzón-Mayor *et al.*, 1990; Wicht *et al.*, 1994; Hernández *et al.*, 1999).

GFAP

La GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) es el principal componente de los filamentos intermedios de los astrocitos en el encéfalo (Eng *et al.*, 1971; Rueger *et al.*,

1978; Dahl *et al.*, 1985), ya que durante la diferenciación astrogial, la organización y la acumulación de gliofilamentos aumenta en paralelo con la concentración de GFAP (Sensenbrenner *et al.*, 1980). Se ha utilizado como marcador específico de astrocitos en amniotas (Onteniente *et al.*, 1983; Hájos y Kalmán, 1989; Monzón-Mayor *et al.*, 1990; Schmidt-Kästner y Szymas, 1990), si bien en los peces teleósteos se ha localizado en otras poblaciones gliales como endimocitos y glía radial (Cardone y Roots, 1990; Velasco, 1992). Además, la cantidad de dicha proteína aumenta en las células gliales cuando estas responden a un estímulo neurotóxico (O'Callaghan y Sriram, 2005).

Zpr1 y Zpr3

Zpr1 (*zebrafish photoreceptor 1*) y Zpr3 (*zebrafish photoreceptor 3*) son anticuerpos específicos de pez cebra (ZIRC) que se utilizan para inmunodetectar tanto los somas como los segmentos externos de los fotorreceptores. Zpr1 marca los conos sensibles al color rojo-verde, mientras que Zpr3 marca los bastones (Larison y Bremiller, 1990, Schmith y Dowling, 1996).

El ácido retinoico

Señalización celular del ácido retinoico

El ácido retinoico (AR) es una molécula perteneciente a la familia de los retinoides, que son lípidos derivados del retinol o vitamina A. Los retinoides tienen numerosas funciones y son indispensables tanto durante el desarrollo embrionario como en el adulto. Controlan el desarrollo embrionario temprano, la organogénesis, la homeostasis de los tejidos, la reproducción y el funcionamiento de diferentes sistemas biológicos como el sistema visual (Napoli, 1996; Glover *et al.*, 2006; Mark *et al.*, 2006; Niederreither y Dollé, 2008).

En la naturaleza hay dos estereoisómeros del AR: el ácido *trans* retinoico y el ácido 9-*cis* retinoico. Este último no se produce endógenamente por los seres vivos (Mic *et al.*, 2003). Con AR nos referiremos al isómero *trans* (Fig. 6).

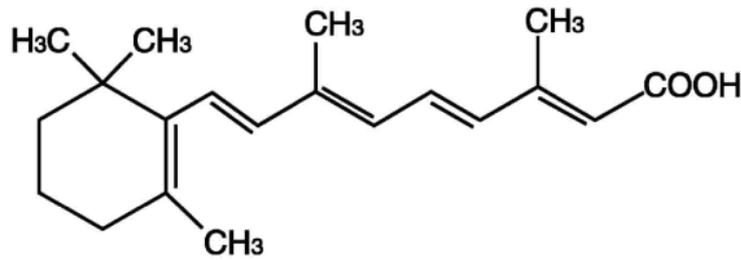


Figura 6: Estructura química del estereoisómero ácido *trans* retinoico (AR).

Síntesis

La mayoría de los animales no sintetizan el AR *de novo*, sino a partir de la vitamina A, de los retinil ésteres, o de los β -carotenos que toman en la dieta. Los embriones y larvas de los vertebrados anamniotas, como los peces, se alimentan del vitelo, que es la fuente de retinol, retinal y AR (Costaridis *et al.*; 1996). En el pez cebra es importante la enzima BCMO1 (*beta-carotene 15,15-monooxygenase 1*), que rompe el beta-caroteno para dar retinaldehído (Lampert *et al.*, 2003).

El retinol circula por la sangre y entra en las células unido a las RBPs (*retinol binding proteins*). En mamíferos, el paso por la membrana plasmática puede ser facilitado por receptores de membrana específicos, como STRA6 (Kawaguchi *et al.*, 2007). Las RBPs maternas no pueden atravesar la placenta, así que el retinol llega por la sangre al embrión, donde se vuelve a unir a las RBPs cigóticas (Ward *et al.*, 1997). Una vez en el citoplasma, el retinol es captado por las CRBPs (*cellular retinol binding proteins*), de las que se conocen cuatro tipos en mamíferos (Ong, 1994; Li y Norris, 1996; Folli *et al.*, 2001; Vogel *et al.*, 2001) y una en pez cebra, similar a la CRBP II de mamíferos (Calderone *et al.*, 2002).

El primer paso en la síntesis de AR es la oxidación del retinol para formar retinal. Hay dos tipos de enzimas que catalizan esta reacción reversible: las ADHs (*cytosolic alcohol dehydrogenases*), que pertenecen a la familia de las deshidrogenasas/reductasas de cadena media, y las RDHs (*microsomal retinol dehydrogenases*), de la familia de las deshidrogenasas/reductasas de cadena corta (Pares *et al.*, 2008).

El siguiente paso es la oxidación del retinal, que permanece unido a las CRBPs. Esta reacción irreversible es llevada a cabo por una subfamilia de enzimas ALDH1A

(*aldehyde dehydrogenases*). En mamíferos se han descrito cuatro miembros de esta subfamilia: ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3 y ALDH1A4 (Glover *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2008; Duester, 2008). En los peces teleósteos, el gen de la ALDH1A1 se ha perdido en la evolución y estos animales sólo poseen la Aldh1a2, la Aldh1a3 y la Aldh1a4, que se denominan también Raldh2, Raldh3 y Raldh4 respectivamente (Duester, 2000; Sophos y Vasiliou, 2003; Cañestro *et al.*, 2006; Pittlik *et al.*, 2007).

Raldh2

Las Raldhs (*Retinaldehyde dehydrogenases*) son las enzimas que catalizan la síntesis de ácido retinoico a partir de retinal. La expresión del ortólogo del gen *raldh2* en el pez cebra comienza durante la gastrulación en el mesodermo paraxial y posteriormente se localiza en los somitos. En la copa óptica comienza a expresarse en la región dorsal a partir de las 19 hpf (Marsh-Armstrong *et al.*, 1994; Begemann *et al.*, 2001; Grandel *et al.*, 2002), de manera similar a como ocurre en mamíferos (Niederreither *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1996).

La mutación del gen *raldh2* en ratón conduce a un fallo en la invaginación necesaria para la formación de la copa óptica. Sin embargo, en el pez cebra, la mutación de este gen (*neckless*) conduce a defectos en la regionalización del rombencéfalo (Begemann *et al.*, 2001), pero no se han descrito alteraciones de la retinogénesis.

Raldh3

En todas las especies estudiadas, la expresión de *raldh3* es mucho más restringida que la de *raldh2*, y se localiza en la región ventral de la retina, tanto en rana (Lupo *et al.*, 2005), como en pollo (Adler y Belecky-Adams, 2002) y en ratón (McCaffery *et al.*, 1991; Li *et al.*, 2000; Mic *et al.*, 2000, Suzuki *et al.*, 2000).

El pez cebra posee un ortólogo de *raldh3*, y su expresión comienza a las 12 hpf en el primordio óptico, a las 20 hpf se localiza en la región de la copa óptica adyacente al tallo óptico, y desde las 48 hpf queda restringida a la región ventral de la retina a ambos lados de la fisura coroidea (Pittlik *et al.*, 2007, Liang *et al.*, 2008). Así pues, como en el resto de los vertebrados, en la retina del pez cebra hay dos dominios de síntesis de ácido retinoico opuestos y no solapados: uno dorsal, donde se expresa *raldh2*, y otro ventral donde se expresa *raldh3* (Fig. 5). Se ha descrito que la Raldh3 es mucho más activa que

la *Raldh2* dentro de la retina durante el desarrollo embrionario (Marsh-Armstrong *et al.*, 1994).

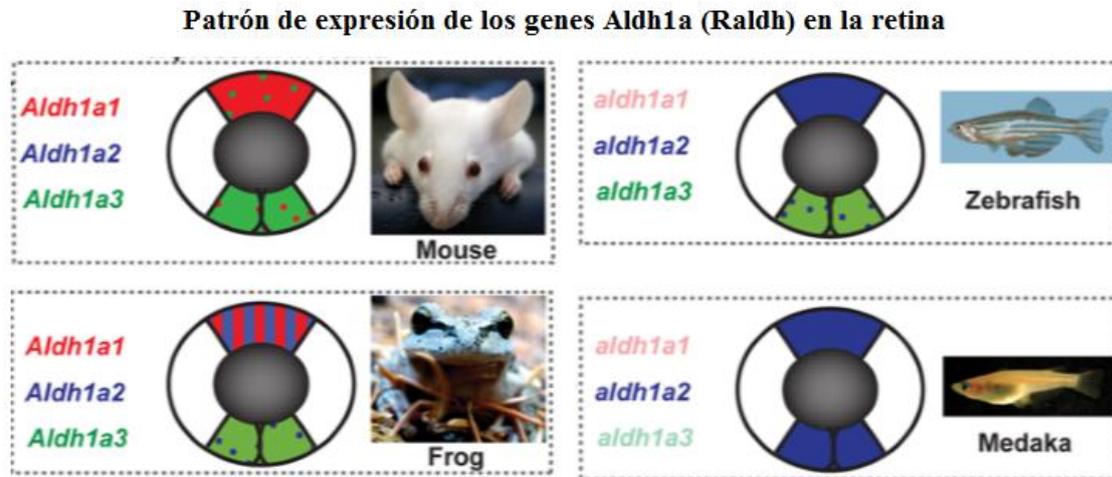


Figura. 5: Esquema que representa el patrón de expresión de los tres genes Aldh1a (Raldh) en la retina de diferentes especies de vertebrados. Extraído de Cañestro *et al.*, 2009.

Los ratones *knockout* para *Raldh3* mueren al nacer por problemas respiratorios y presentan algunas malformaciones oculares (Dupè *et al.*, 2003). En el pez cebra, la inhibición de la actividad de la Raldh3 con 3,7-dimethyl-2,6-octadienal (cital) durante dos horas, justo después de la evaginación de los primordios ópticos, conduce a la formación de ojos sin la mitad ventral de la retina, un fenotipo que se revierte tratando los embriones con AR (Marsh-Armstrong *et al.*, 1994). Los mismos resultados se han observado en *Xenopus laevis* (Lupo *et al.*, 2005) y en la codorniz (Maden *et al.*, 2007).

Hasta la actualidad no se conoce el fenotipo que produce la mutación del gen *raldh3* (sa118), recientemente identificada en el pez cebra. El pez medaka es el primer vertebrado del que se conoce que carece de expresión de *raldh3* en la región ventral de la retina, aunque presenta una fuerte expresión de *raldh2* en dicha región, además de en la retina dorsal (Cañestro *et al.*, 2009).

Regulación de la transcripción

Una vez sintetizado, el AR se une en el citoplasma de las células a las CRABPs (*cellular retinoic acid binding proteins*). Si se une a las CRABPs-I se produce su degradación (Boylan y Gudas., 1992) y si lo hace a las CRABPs-II entra en el núcleo

celular (Gustafson *et al.*, 1996). Cuando el AR ha entrado en el núcleo actúa como regulador transcripcional, mediante la unión a sus receptores nucleares, denominados RARs (*retinoic acid receptors*), que forman heterodímeros con los RXRs (*retinoid acid receptors*) (Fig.7). Ambos tipos son miembros de la superfamilia de receptores de esteroides, hormonas tiroideas y vitamina D (Rochette-Egly y Germain, 2009). El AR tiene gran afinidad por el receptor RAR, mientras que su isómero, el 9-*cis*-RA, puede unirse al RXR (Chambon, 1993; Giguère, 1994; Mangelsdorf, 1994). Además, algunos de los efectos del AR podrían estar mediados por su unión a otros receptores nucleares como PPAR β/γ (Schug *et al.*, 2007).

En pez cebra se han caracterizado cuatro clases de genes *rar* (*rara α* , *rara β* , *rara γ* , *rara β*) y otras cuatro de *rxr* (*rxra*, *rxr β* α , *rxr β* β , *rxr γ*), que son ortólogos o coortólogos de los genes hallados en los mamíferos (*Rara α* , *Rar β* , *Rar γ* , *Rxra*, *Rxr β* , *Rxr γ*) (Hale *et al.*, 2006; Tallafuss *et al.*, 2006). Se ha descrito que en la retina del pez cebra se expresan, al menos, *rara β* y *rxr γ* (Stevens *et al.*, 2011).

RAR y RXR forman heterodímeros que se unen al DNA de los genes diana en determinadas secuencias reguladoras de la transcripción denominadas RAREs (*retinoic acid response elements*) (Zhang y Kalh, 1993; Chambon, 1996). Los RARE consisten en una repetición directa de secuencia 5'-(A/G)G(G/T)TCA-3' o del motivo 5'-(A/G)G(G/T)(G/T)(G/C)A-3', separado por 1, 2 o 5 pares de bases (Balmer y Blomhoff, 2002).

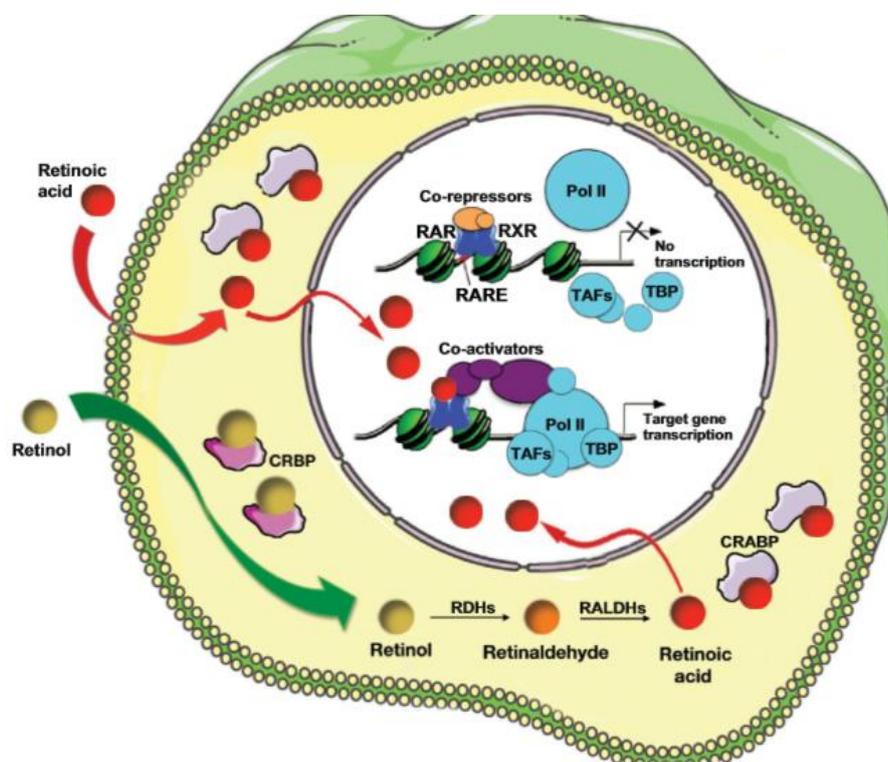


Figura 7. Esquema de la ruta de señalización celular del AR. Extraído de Rhinn y Dollé, 2012.

Se ha descrito la presencia de RAREs en las secuencias reguladoras de numerosos genes, como los genes homeóticos *Hoxa1*, *Hoxb1*, *Hoxb4* and *Hoxd4* (Marshall *et al.*, 1996), o genes de la propia ruta de señalización del AR, como *Rarb*, *Crbp1/2* (*Rbp1/2*), *Crabp1/2* and *Cyp26a1* (Balmer y Blomhoff, 2002). El número de genes identificados como dianas del AR sigue aumentando. En estudios recientes realizados en pez cebra se han identificado varios genes implicados en la morfogénesis de la copa óptica cuya expresión está regulada por los RARs (Lupo *et al.*, 2011).

Degradación

La degradación del AR es llevada a cabo por enzimas de una subfamilia del citocromo P450, denominadas CYP26. En mamíferos hay tres genes que codifican sendas enzimas (*Cyp26a1*, *Cyp26b1* y *Cyp26c1*), y en el pez cebra se han encontrado ortólogos de los tres genes (White *et al.*, 1996; Hernandez *et al.*, 2007). Las CYP26 oxidan el AR a compuestos como el ácido 4-hidroxi-retinoico, ácido 4-oxo-retinoico, 18-hidroxi-retinoico y 5,8-epoxi RA (White *et al.*, 1996; Fujii *et al.*, 1997; White *et al.*, 2000). Aunque se había propuesto que estos metabolitos no tenían ninguna función, hay estudios que indican que dichos metabolitos son biológicamente activos y que, por tanto, deben de tener alguna función en el organismo (Sonneveld *et al.*, 1999).

La precisa regulación del equilibrio dinámico entre la síntesis y la degradación del AR por las RALDHs y los CYP26 permite un control preciso de la distribución de esta molécula en diferentes regiones de un tejido u órgano, y por tanto es una forma de controlar sus efectos (Napoli, 1993). Los patrones de distribución de las enzimas CYP26 son complejos y complementarios a los de las RALDHs, de manera que en conjunto determinan en qué poblaciones celulares debe actuar la señal del AR.

Teratogenia del AR

El AR juega un papel esencial en el desarrollo embrionario, ya que controla procesos clave desde estadios muy tempranos. Las funciones de esta molécula se van conociendo mediante experimentos en los que se estudian sus efectos teratogénicos por la sobreexposición a la misma, o mediante la inhibición de su síntesis o de su ruta de señalización celular, en diferentes modelos de vertebrados. Las características del pez

cebra lo convierten en un modelo muy adecuado para realizar experimentos de teratogenia del AR.

Los teratógenos pueden ser agentes físicos -como las altas temperaturas o las radiaciones ionizantes- o químicos -diversas sustancias como el etanol, los antibióticos, los medicamentos y drogas, microorganismos infecciosos o alteraciones metabólicas en la madre- que provocan malformaciones en el embrión durante su desarrollo. Entre los agentes químicos se incluyen el AR y su precursor, el retinol.

A mediados del siglo XX se hicieron los primeros experimentos de administración de altas dosis de retinol o de análogos del mismo a hembras de mamíferos preñadas (Cohlan, 1953; Giroud y Martinet, 1959). Se observó que dosis altas producían malformaciones severas en las crías, similares a las que después fueron descritas en humanos (Giroud y Martinet, 1961; 1962). Las alteraciones incluían fallos en el cierre del tubo neural (exencefalia), hernias encefálicas (encefalocele), reducción del tamaño del encéfalo (microcefalia) y malformaciones oculares como la disminución del tamaño del ojo (microftalmia) (Cohlan, 1953; Shenefelt, 1972). Pronto se demostró que el agente teratógeno no era la propia vitamina, sino un metabolito de la misma, el AR.

Las perturbaciones que se producen en el desarrollo embrionario como consecuencia de alterar la señal del AR dependen de la concentración del mismo, del momento del desarrollo en el que se administre, y de la duración de la exposición a la misma. En el pez cebra se ha observado que la sobreexposición a AR muy temprana en el desarrollo provoca graves alteraciones como la anoftalmia, o incluso la falta de formación de toda la cabeza, la microftalmia, defectos cardiacos (Holder y Hill, 1991; Stainier y Fishman, 1992; Hill *et al.*, 1995; Waxman y Yelon, 2009) e incluso la duplicación de la retina (Hyatt *et al.*, 1992). En *Xenopus* se ha descrito un espectro similar de malformaciones debidas al tratamiento de los embriones con AR, con alteraciones del desarrollo de la cabeza, microftalmia o ciclopia y alteraciones en la formación de la retina (Durston *et al.*, 1989; Sive *et al.*, 1990; Lopez y Carrasco, 1992; Papalopulu y Kintner, 1996; Eagleson *et al.*, 2001). Lo mismo se ha observado en aves (Osmond *et al.*, 1991), ratas (Morriss, 1972) y ratones (Wood *et al.*, 1994; Leonard *et al.*, 1995).

Además de los efectos descritos en la morfogénesis de la copa óptica, se conoce que el AR también afecta al desarrollo del ojo en estadios posteriores del desarrollo. Estudios *in vitro* realizados tanto con células de pollo (Stenkamp *et al.*, 1993) como con células de mamífero (Kelley *et al.*, 1994, 1999; Osakada *et al.*, 2008), han mostrado que el AR incrementa la diferenciación y supervivencia de los fotorreceptores. Del mismo

modo, el AR acelera la diferenciación de los fotorreceptores a partir de células embrionarias de retina de ratón (Wallace y Jensen, 1999). En el pez cebra se han realizado estudios *in vivo* que demuestran que la administración de AR durante la neurogénesis de las células fotorreceptoras estimula la diferenciación de bastones y conos sensibles al rojo, pero retrasa la maduración de conos sensibles al azul y al ultravioleta, y no tiene ningún efecto sobre los conos sensibles al verde (Hyatt *et al.*, 1996b; Prabhudesai *et al.*, 2005).

Por otra parte, también se ha descrito que la administración de AR durante la neurogénesis de la CNI y la CNE produce muerte celular por apoptosis en todas las capas de la retina (Stevens *et al.*, 2011).

Deficiencia de AR

La deficiencia de AR o de retinol durante el desarrollo embrionario es también perjudicial. Las primeras pruebas de la importancia del retinol en el desarrollo embrionario se obtuvieron de cerdos y ratas en los que la deprivación parcial de retinol durante su desarrollo provocaba microftalmia e incluso anoftalmia (Warkany y Schraffenberger, 1946). El conjunto de defectos oculares debidos a la deprivación de vitamina A durante el desarrollo se ha denominado Síndrome Fetal de Deficiencia de Vitamina A (VAD, del inglés *Vitamin A deficiency*) (Wilson *et al.*, 1953).

Se ha comprobado, en varios modelos de vertebrados, que la deficiencia de AR o de retinol conduce a defectos oculares como el coloboma o la displasia retiniana (Wilson *et al.*, 1953; Dowling., 1964; Stull y Wikler, 2000; Mic *et al.*, 2004; Molotkov *et al.*, 2006; Matt *et al.*, 2008; See y Clagett-Dame, 2009). De manera similar, deficiencias en la ruta de señalización del AR provocan alteraciones en la morfogénesis de la copa óptica y de la retina (Kastner *et al.*, 1994; Grondona *et al.*, 1996; Matt *et al.*, 2005; Moloktov *et al.*, 2006; Matt *et al.*, 2008).

En el pez cebra se ha descrito que la inhibición de la síntesis endógena de AR o la inhibición de sus receptores también resulta en alteraciones del desarrollo, como la formación de ojos en los que falta la región ventral de la retina (Marsh-Amstrong *et al.*, 1994), el coloboma (Lupo *et al.*, 2011) o la microftalmia, acompañada de fallos electrofisiológicos de la retina (Le *et al.*, 2012).

Funciones de ácido retinoico en la retinogénesis

Así pues, a la luz de los estudios de teratogenia o de inhibición de la señal del AR se han determinado algunas de las funciones de esta molécula en la formación del ojo. Mientras que el AR ha sido claramente definido como una molécula indispensable para el establecimiento y la regionalización de partes del SNC como la médula espinal o el rombencéfalo (Maden, 2002), no parece necesario para el establecimiento del patrón dorso-ventral de la retina (Fan *et al.*, 2003; Matt *et al.*, 2005; Molotkov *et al.*, 2006). Sin embargo, el AR sí que es necesario para la formación de la vesícula óptica (Marsh-Armstrong *et al.*, 1994) y el cierre de la fisura coroidea (Stull y Wikler, 2000; Lupo *et al.*, 2011), así como para guiar los movimientos morfogénéticos que dan lugar a la copa óptica (Mic *et al.*, 2004; Molotkov *et al.*, 2006). Además, es necesario para la diferenciación de los fotorreceptores (Prabhudesai *et al.*, 2005) y el correcto desarrollo funcional de la retina (Le *et al.*, 2012).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El desarrollo del sistema visual de los vertebrados está dirigido, en parte, por moléculas secretadas que actúan como morfógenos, como el AR. Esta molécula es necesaria para la morfogénesis de la copa óptica (Mic *et al.*, 2004; Lupo *et al.*, 2011), así como para la diferenciación de los fotorreceptores (Hyatt *et al.*, 1996b; Prabhudesai *et al.*, 2005, Stevens *et al.*, 2011). También se ha propuesto que el AR puede intervenir en el crecimiento de los axones del nervio óptico (Nagashima *et al.*, 2009).

Las funciones del AR se han elucidado, en su mayoría, mediante experimentos de teratogenia, en los cuales se aumenta la señal del AR, o en experimentos basados en la deficiencia de retinol o la inhibición de la señalización. En relación con el sistema visual, la mayoría de los experimentos realizados en el pez cebra se han llevado a cabo en estadios tempranos del desarrollo, y no hay una descripción de las posibles alteraciones producidas sobre la histología, la neurogénesis y la diferenciación celular en estadios embrionarios y larvarios. Basándonos en los estudios previos, y dada la amplia experiencia de nuestro laboratorio en el estudio del sistema visual de peces teleósteos en general, y del pez cebra en particular, nos propusimos realizar el presente Trabajo.

La hipótesis general de la que partimos al inicio de la presente Tesis Doctoral y sobre la que planteamos los objetivos, es que la modificación de la señal del AR durante el desarrollo del sistema visual produce cambios en el proceso de retinogénesis y de formación del nervio óptico mediante la modificación de la expresión de genes y la alteración del patrón de distribución de proteínas. El análisis de dichas modificaciones en comparación con el desarrollo normal debe aportar nueva información sobre las funciones del AR en el desarrollo del sistema visual.

Así pues, el objetivo general de la presente Tesis Doctoral es el análisis de los efectos de la modificación de la señal del AR, bien mediante el aumento de la misma, bien mediante su inhibición, en el desarrollo del sistema visual del pez cebra, concretamente de la retina y el nervio óptico.

Los objetivos concretos de este Trabajo son los siguientes:

1. Analizar los efectos teratogénicos del AR en la neurogénesis y la diferenciación celular que tiene lugar en la retina a partir de la ZPG durante el desarrollo larval.
2. Analizar los efectos teratogénicos del AR durante la neurogénesis mayoritaria y el inicio de la diferenciación celular de la retina.
3. Analizar los efectos de la inhibición de la señal del AR mediante el bloqueo de su síntesis y mediante la inhibición de sus receptores celulares durante el desarrollo embrionario.
4. Estudiar en el pez cebra el fenotipo de la mutación del gen *raldh3*, que codifica para la enzima responsable de la síntesis de AR en la región ventral de la retina, a lo largo del desarrollo embrionario y larval.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animal de experimentación: pez cebra

El animal de experimentación utilizado para la realización de esta Tesis Doctoral ha sido el pez cebra *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822) (Fig. 8). Los ejemplares adultos utilizados como individuos reproductores fueron silvestres de la estirpe AB,



Figura 8: Pareja reproductora de pez cebra *Danio rerio* (macho a la derecha; hembra a la izquierda).

mantenidos en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCyL), y animales de la estirpe AB heterocigotos para la mutación *sal118*, mantenidos en el University College London (UCL).

Los animales fueron manipulados siguiendo las directrices de la Unión Europea (2010/63/UE) y la legislación española (RD 1201/2005, BOE 252/34367-91, 2005) vigentes para el uso y cuidado de animales de experimentación.

Mantenimiento y reproducción del pez cebra

Los ejemplares adultos fueron mantenidos en peceras a una temperatura de 28,5°C con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, como ha sido establecido previamente (Westerfield, 1995). La tarde anterior al día de la puesta, las parejas de ejemplares reproductores eran trasladadas a peceras de cría externas, mantenidas a 28.5°C. El estímulo luminoso tras la noche induce la liberación de los gametos. El uso de dichas peceras permite la recolección de los huevos al quedar estos depositados en una cámara separada de los adultos. Tras la recolección, los huevos fueron analizados bajo una lupa binocular para eliminar todos aquellos que no estaban fecundados o que presentaban anomalías morfológicas. Los embriones eran dispuestos en placas Petri -unos 80 embriones por placa- con solución E3 1x (Cuadro 1), donde se desarrollaban a 28.5°C hasta el momento de la fijación.

Cuadro 1. Composición de la solución E3 10x: 2.922g. de NaCl, 0.127g. de KCl, 0.366g. de CaCl₂ y 0.397g. de MgSO₄ en 1l de H₂O destilada más 2 gotas de azul de metileno fenicado (Panreac).

Exposición de los animales a AR

El AR liofilizado fue disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) para obtener alícuotas con una concentración de 0,1 M. Estas alícuotas se mantuvieron a -20°C. Las concentraciones de AR utilizadas, basadas en estudios previos (Hyatt *et al.*, 1992), fueron 0.1 μM y 1 μM . Estas concentraciones se obtenían diluyendo el AR 0,1 M en solución E3 justo antes de iniciar los tratamientos. A las 24 hpf, los embriones eran descorionados bajo lupa binocular utilizando micropinzas. A partir de este estadio, la solución E3 utilizada tanto para preparar los tratamientos como para el desarrollo de los controles contenía feniltiourea (PTU) a una concentración de 200 μM para inhibir la pigmentación de los animales.

Se dispusieron 80 embriones en cada placa Petri. Los tratamientos se llevaron a cabo en oscuridad y a 28,5°C durante dos etapas distintas del desarrollo del sistema visual, dependiendo del proceso sobre el que queríamos analizar el efecto del AR. En ambos casos, cada 24 horas se retiraba la solución E3 y se añadía solución nueva. Los animales utilizados como controles se desarrollaban en E3 sin AR.

Tratamiento con AR entre los 3 y 4 dpf

El tratamiento se llevó a cabo entre los 3 y 4 dpf, que es cuando la neurogénesis, retiniana, con excepción del linaje de los bastones, queda restringida a la ZPG, durante el resto de la vida del animal. Tras el tratamiento, las larvas eran trasladadas a placas Petri nuevas, se lavaban tres veces durante 15 minutos en E3 y se mantenían en esta solución hasta su fijación a los 4, 5 o 6 dpf.

Tratamiento con AR entre las 24 y 48 hpf

El tratamiento se realizó entre las 24 y las 48 hpf, momento en el que ocurre la neurogénesis mayoritaria y se diferencia la mayor parte de las neuronas dentro de la retina de los embriones. Además, dentro de esta ventana temporal se forma el nervio óptico y los axones, que comienzan a formarse en la retina, alcanzan su diana en el techo óptico. Tras el tratamiento, los embriones se trasladaban a placas Petri nuevas, se lavaban tres veces durante 15 minutos en E3 y se mantenían en esta solución hasta su fijación a las 48

hpf, 3 o 5 dpf. Cada 24 horas se retiraba la solución E3 y se añadía solución nueva. Para el análisis de TUNEL algunos embriones se fijaron a las 36 hpf.

Inhibición de la señalización del AR

Para inhibir la señalización del AR durante la neurogénesis mayoritaria y el inicio de la diferenciación de la retina durante el desarrollo embrionario, entre las 24 y las 48 hpf, expusimos a los embriones a dos tipos de moléculas en tratamientos independientes. Por un lado utilizamos dietilaminobenzaldehído (DEAB) (Sigma) y por otro el AGN194310 (AGN) [Allergan Inc. (Irvine, CA)]. Los embriones fueron descorionados justo antes de realizar los tratamientos, que se llevaron a cabo en oscuridad, disolviendo dichas moléculas en E3 con PTU. Se utilizaron 80 embriones en cada placa Petri. Tras los tratamientos, los embriones eran trasladados a placas Petri nuevas, se lavaban tres veces durante 15 minutos en E3 y se mantenían en esta solución hasta su fijación a los 3 dpf.

Tratamiento con DEAB entre las 24 y 48 hpf

El DEAB es un potente inhibidor de las enzimas Raldhs. Se almacena disuelto en DMSO a una concentración 25 mM a -20°C. La concentración de DEAB seleccionada para realizar los tratamientos fue de 20 µM. Los animales utilizados como control fueron expuestos a DMSO 20 µM entre las 24 y las 48 hpf.

Tratamiento con AGN entre las 24 y 48 hpf

El AGN es una molécula que actúa como antagonista de los tres tipos de RARs. Se almacena en alícuotas de concentración 10 mM disuelto en DMSO. La concentración de AGN utilizada para realizar los tratamientos fue de 10 µM. Los animales utilizados como control fueron expuestos a DMSO 10 µM, entre las 24 y las 48 hpf.

Administración de Bromo-deoxiuridina (BrdU)

Para analizar la proliferación celular, realizamos experimentos de administración de Bromo-deoxiuridina (BrdU) a los animales en los distintos estadios de cada tratamiento. La BrdU es un nucleótido sintético análogo al nucleótido de Timina. Tras administrar BrdU a los animales de experimentación, las células que se encuentran en

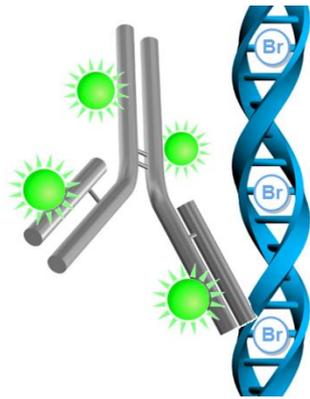


Figura 9: Inmunodetección de BrdU en el ADN.

fase de replicación del material genético (fase S), incorporarán preferentemente BrdU a su ADN en lugar del nucleótido de Timina. De esta manera, el ADN replicado puede detectarse mediante una inmunohistoquímica con anticuerpos específicos contra BrdU (Fig. 9). Los experimentos consistieron en disponer a los animales en placas de cultivo de 6 pocillos -10 ejemplares por pocillo- y administrarles BrdU (Roche) a una concentración de 10 mM con 12% de DMSO en E3 durante 30 minutos a 4°C, antes de la

fijación en las distintas edades. La BrdU es captada por el ADN de las células en división que se encuentran en fase S del ciclo celular. A continuación los animales fueron lavados durante 5 minutos en E3, fijados y seccionados como se indica posteriormente. Por último, se llevó a cabo la detección inmunohistoquímica de BrdU, que será explicada en el apartado “inmunohistoquímica en secciones de tejido”.

Inyección del morfolino de p53

Para estudiar si la muerte celular por apoptosis era la causa de la microftalmia observada en los animales tratados con AR 1 μ M entre las 24 y las 48 hpf, procedimos a bloquear la apoptosis mediante la inyección del morfolino (MO) contra *tumor suppressor p53* (*tp53-Zebrafish Information Network*), denominado p53MO (5'-GCGCCATTGCTTTGCAAGAATTG-3'; GeneTools). El morfolino se almacena disuelto en H₂O a una concentración de 1 mM a 4°C. Para realizar las inyecciones se prepara una mezcla de morfolino y rojo fenol (Sigma) de manera que el morfolino se inyecta a una concentración de 0,5 mM. El rojo fenol es un colorante inocuo que permite observar bajo lupa si la inyección se realiza correctamente. Para determinar la cantidad necesaria de

p53MO para bloquear la apoptosis se inyectaron diferentes cantidades de la mezcla de morfolino y rojo fenol. Las cantidades fueron 2 nl, 4 nl y 8 nl.

Las inyecciones se llevaron a cabo en el vitelo de embriones en el estadio de 1-4 células utilizando un microinyector (Eppendorf Fento Jet 5247). Para ello, se disponían

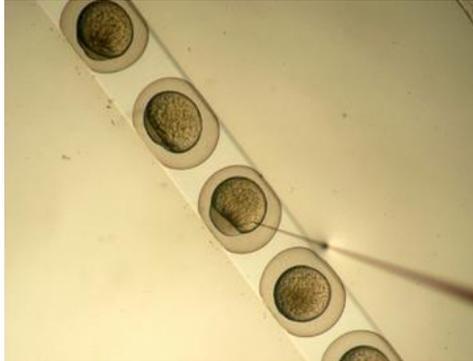


Figura 10: Microinyección del p53MO en el vitelo de huevos de pez cebra.

los huevos recién obtenidos en una placa Petri, alineados junto a un portaobjetos dispuesto en el fondo de la misma (Fig. 10). Tras la inyección, los embriones seguían su desarrollo en medio E3. Los huevos no fecundados fueron descartados, así como los embriones dañados o que presentaban alguna malformación. Entre las 24 y

las 48 hpf, algunos de los embriones inyectados fueron tratados con AR 1 μ M, mientras que otros se emplearon como grupo control. Todos los

embriones se fijaron como se indica en el apartado “fijación”, en el estadio de 3 dpf, para la medición del área de la retina y el análisis de la muerte celular por apoptosis. Además, como control adicional, se incluyó en cada experimento un grupo tratado con AR 1 μ M, y otro grupo no tratado que no había sido inyectado con p53MO.

Obtención y genotipado de embriones mutantes para *raldh3*

Identificación de los adultos reproductores

Los animales portadores de la mutación en el gen *raldh3* -alelo *sa118*- empleados en el presente Trabajo fueron amablemente cedidos por el Prof. Steve Wilson del University College London (UCL). Estos animales tienen una mutación puntual de manera que el transcrito (ENSDART00000055593) codifica para una proteína Raldh3 truncada no funcional.

El primer paso para la caracterización de los embriones mutantes homocigotos para la mutación de *raldh3* fue identificar a los adultos reproductores que eran portadores del alelo mutado *sa118* -heterocigotos para la mutación de *raldh3*-, que se encontraban mezclados con animales silvestres en un mismo tanque del acuario. Para ello, se anestesiaron los animales con Tricaina 1x (Sigma) (Cuadro 2) y se obtuvo una muestra de

tejido de la aleta caudal utilizando una cuchilla -técnica de *finclip*-. Cada muestra se dispuso en un pocillo de una placa de PCR de 96 pocillos (Applied Biosystems) y cada animal se aislaba en una pecera.

Cuadro 2: Composición de Tricaína 25x: 400 mg de Tricaína en polvo, 97,9 ml de H₂O y 2,1 ml de tampón Tris 1M a pH 9. Se disuelve en agua para obtener Tricaína 1x.

A continuación se realizó la extracción del ADN genómico mediante un procedimiento conocido como *hot shock*, que se basa en una lisis alcalina de las células. A cada pocillo se añadieron 50 µl de solución base 1x (cuadro 3) y se calentó la placa a 95°C durante 30 minutos en un termociclador. Después se añadieron 50 µl de solución de neutralización 1x (cuadro 3) y se mezclaron ambas soluciones con una pipeta multicanal para que el tejido quedara disgregado y el ADN disuelto.

Cuadro 3: Composición de las soluciones para extraer ADN genómico:

- Solución base 50x: 14,03 g KOH, 4 ml EDTA 0,5 M, en 200 ml de H₂O.
- Solución de neutralización 50x: 63,04 g TrisHCl, en 200 ml de H₂O.

Para determinar cuáles de los animales adultos eran portadores del alelo sa118 se realizó el genotipado utilizando un kit basado en un sistema de discriminación alélica denominado *PCR-based KASP™ genotyping assay* (LGC Genomics, KBioscience). Este sistema emplea dos *primers forward*, uno de los cuales reconoce la secuencia del alelo silvestre y el otro la del alelo mutado, y un *primer reverse* común para ambos alelos. Estos *primers* son diseñados por LGC Genomics a partir de las secuencias de los alelos enviadas. Cada *primer forward* posee una cola de nucleótidos que es complementaria a uno de los dos cassettes FRET (*fluorescence resonant energy transfer*) que incluye el *Master Mix* del kit. Cada cassette está marcado con un fluoróforo: FAM™ o HEX™.

Las PCRs se realizaron en una placa de 96 pocillos utilizando para cada pocillo 4 µl de *Master mix*, 0,1 µl de *primers*, 3 µl de H₂O y 1 µl de ADN genómico extraído de las aletas. En cada placa, se añadió a algunos pocillos H₂O en lugar de ADN para tener controles negativos. La placa se dispuso en un termociclador y el programa de PCR fue el siguiente:

15'	20''	1'	20''	1'	20''	1'	20''	1'	20''	1'	20''	1'
94°C	94°C	62°C	94°C	61,2°C	94°C	60,4°C	94°C	59,6°C	94°C	58,8°C	94°C	58°C
										26 ciclos		
20''	1'	20''	1'	20''	1'	20''	1'	20''	1'	20''	1'	4°C
94°C	57,2°C	94°C	56,4°C	94°C	55,6°C	94°C	54,8°C	94°C	54°C	94°C	54°C	

Tras realizar la PCR se llevó a cabo la lectura de la fluorescencia de cada pocillo de la placa en una máquina de Q-PCR. El software (Biorad CFX Manager 3.0) acoplado a la máquina de Q-PCR nos mostraba un diagrama de dispersión que representaba el genotipo de cada uno de los animales, ya fuera silvestre o heterocigoto para la mutación sa118. Tras conocer el genotipo de los animales adultos reproductores, los heterocigotos fueron reunidos en un mismo tanque del acuario y los silvestres fueron sacrificados.

Obtención y genotipado de los embriones mutantes

Los animales reproductores heterocigotos se cruzaron para obtener los embriones que hemos utilizado en el estudio del fenotipo de los animales mutantes. En cada puesta había un 25% de animales silvestres, un 50% de animales heterocigotos y un 25% de animales homocigotos. Los animales obtenidos en cada puesta fueron fijados a las 36 y 48 hpf y a los 3 dpf y después se lavaron como se indica en el apartado “fijación”.

Para conocer el genotipo de estos embriones se dispuso cada uno en un pocillo de una placa de 24 pocillos. A continuación se separó la cabeza de los embriones del resto del cuerpo con unas micropinzas. En el caso de los embriones de 36 hpf, se separó la cabeza junto con el vitelo, para no dañar la cabeza. Los cuerpos eran dispuestos en una placa de PCR de 96 pocillos y se realizó la extracción del ADN genómico del mismo modo que en el caso de los ejemplares adultos, se empleó la mitad de volumen de la solución base y de la solución de neutralización.

Para conocer el genotipo de los embriones se empleó el mismo método *PCR-based KASP™ genotyping assay* que en los adultos, con los mismos *primers*. En este caso, el diagrama de dispersión obtenido en la máquina de Q-PCR nos mostraba tres poblaciones: homocigotos, heterocigotos y silvestres (Fig 11). Las cabezas de los embriones homocigotos y silvestres se almacenaron para los estudios posteriores y los heterocigotos fueron descartados.

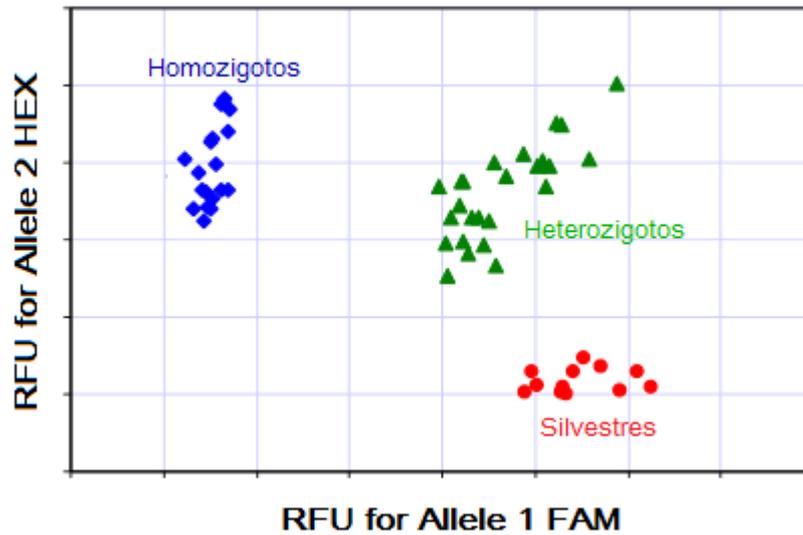


Figura 11: Esquema de un diagrama de dispersión de discriminación alélica para genotipar embriones.

Procesamiento histológico

Fijación

La fijación de los animales se llevó a cabo por inmersión en una solución de paraformaldehído al 4% (PFA 4%), durante 24 horas a 4°C. El PFA 4 % se preparó en tampón fosfato 0.1 M y pH 7,4 (PB, del inglés *phosphate buffer*) (Cuadro 4). Tras la fijación se eliminó el PFA mediante 5 lavados de 5 minutos en tampón fosfato salino 0.1 M y pH 7,4 (PBS, del inglés *phosphate buffer saline*). A continuación los animales se sometieron a otro lavado con 50% de PBS y 50% de metanol (Panreac) y se almacenaron deshidratados en metanol a -20°C.

Para la obtención de cortes semifinos, los embriones fueron fijados en una solución de PFA al 2% y glutaraldehído al 2% en tampón cacodilato 0,1 M (CB, del inglés *cacodilate buffer*) (Cuadro 4), durante una noche a 4°C.

Obtención de secciones en criostato

Los pasos previos a la obtención de las secciones en el criostato fueron rehidratar los animales con PBS, encastrarlos en agar y crioprotegerlos. Primero se lavaron con 50%

de metanol y 50% de PBS durante 5 minutos y después se sometieron a 5 lavados de 5 minutos en PBS.

A continuación se encastraron en una mezcla de agar (Panreac) al 1.5% y sacarosa (Panreac) al 10% en PB. La mezcla se calentó primero en un horno microondas hasta alcanzar la ebullición para que se disolviese y se añadió a los moldes de 16 mm de diámetro (Deltalab), en los cuales los animales eran orientados para obtener secciones horizontales de los mismos. Después de que la mezcla se solidificara, los embriones ya encastrados se crioprotegieron, para lo cual los bloques de agar endurecido se extrajeron de los moldes de plástico y posteriormente se sumergieron en una solución de sacarosa al 30% en PBS a temperatura ambiente (TA) durante 24 horas. Tras este proceso, los bloques de agar pueden ser congelados sin que el tejido de los animales encastrados se rompa por la formación de cristales de hielo.

Los bloques de agar con los embriones crioprotegidos se congelaron en el criostato (Microm HM 560) donde fueron cortados a -28°C en secciones seriadas de 10 μm de grosor, que se recogieron en portaobjetos de polysina[®] (Thermo Scientific) o del tipo superfrost ultra plus[®] (Thermo Scientific) para la inmunodetección de BrdU. Estos portaobjetos con las secciones se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

Obtención y tinción de secciones semifinas

Para el análisis de la histología de los embriones tratados con AR entre las 24 y las 48 hpf, obtuvimos secciones semifinas que teñimos con azul de toluidina. Tras la retirada del fijador, los embriones se sometieron a cuatro lavados de 30 minutos en CB a TA. Después, se postfijaron en una solución acuosa de tetróxido de osmio con ferricianuro potásico al 1%, durante 45 minutos a 4°C . Los animales se lavaron 8 veces durante dos horas en CB. Tras la postfijación, se procedió a la deshidratación de las muestras en baños de 5 minutos en soluciones crecientes de etanol de 50° , 70° , 80° , 90° , 96° y 100° a 4°C . A continuación los animales se sometieron a 3 lavados de 10 minutos en óxido de propileno (Panreac) y después se incluyeron en resina EMBED-812 (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, EE.UU.), ambos pasos a TA. La inclusión se realizó progresivamente manteniendo los animales en mezclas sucesivas de resina Embed-812:óxido de propileno (1:3, 1:1, 3:1), durante 1 hora en cada una de ellas. Finalmente, tras mantenerlos en resina durante 2 horas -cambiándola una vez- se mantuvieron en la resina durante toda la noche a TA. Al día siguiente, los animales se dispusieron en la

misma resina en moldes que permiten la correcta orientación de los mismos bajo la lupa. Estos moldes se introdujeron en una estufa a 68°C durante 24 horas, para que la resina polimerizase y se endureciera.

Posteriormente se realizaron cortes semifinos de 1 µm de grosor en un ultramicrotomo Reichert-Jung Ultracut E (Nussloch, Alemania). Se realizaron secciones coronales que fueron recogidas de forma seriada en portaobjetos tratados con Polysina y posteriormente fueron teñidas con azul de toluidina. A continuación las secciones se montaron con Entellan® y cubreobjetos para el posterior análisis a microscopía óptica.

Determinación de la muerte celular por apoptosis mediante TUNEL

Para analizar la muerte celular por apoptosis en los animales tratados con AR entre las 24 y las 48 hpf empleamos la técnica TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*). La técnica se realizó *in toto*, por lo que los animales necesitaron un tratamiento previo de permeabilización.

Primero, los animales almacenados en metanol se rehidrataron progresivamente en PBS con un 0,1 % de detergente Triton® X-100 (Sigma) (PBS-T 0,1 %), lavándolos en 50% de metanol y 50% de PBS-T 0,1 % durante 5 minutos, y después se realizaron 5 lavados de 5 minutos en PBS-T 0,1 %. A continuación se trataron con proteinasa K (PK) (Sigma) disuelta en PBS-T 0,1% a una concentración y durante un tiempo que depende de la edad de los animales (Tabla 1). LA PK se almacena en alícuotas de concentración 10mg/ml.

Edad	Concentración PK	Duración del tratamiento
36 hpf	10 µg/µl	20 minutos
48 hpf	10 µg/µl	30 minutos
3 dpf	20 µg/µl	30 minutos
4 dpf	30 µg/µl	30 minutos
5 dpf	40 µg/µl	30 minutos
6 dpf	50 µg/µl	30 minutos

Tabla 1: Concentración y duración de los tratamientos con PK.

Tras la acción de la PK, se realizaron 2 lavados de 5 minutos en PBS-T 0,1%. A continuación se realizó una postfijación en PFA 4% durante 20 minutos. Se retiró el fijador, y tras un aclarado se realizaron 6 lavados de 10 minutos en PBS-T 0,1%. Después se realizó otra postfijación de 10 minutos a -20°C en una mezcla de etanol y ácido acético (2:1), enfriada previamente en el congelador. Tras la postfijación se realizaron 3 lavados de 10 minutos en PBS-T 0,1% a TA.

A continuación se realizó la técnica TUNEL utilizando el *ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit* (Chemicon international). Los ejemplares fueron mantenidos en *equilibration buffer* durante 1 hora a TA, tras la cual se sustituyó por una mezcla de *reaction buffer* y la *TdT enzyme*, en la que fueron mantenidos una noche a 37°C. La *TdT enzyme* añade nucleótidos de timina marcados con digoxigenina a los extremos rotos del DNA de las células apoptóticas.

Al día siguiente, los animales se lavaron con *stop/wash buffer* durante 90 minutos a 37°C y después se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS-T 0,1%. Los animales se mantuvieron en una solución de un 5% de suero de cabra y un 10% de seroalbúmina bobina en PBS-T 0,1%, durante 1 hora a TA. Tras este paso, se añadió una solución como la anterior más un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con el fluorocromo Cy3 a una dilución de 1/250, en la que se mantuvieron los ejemplares durante una noche a 4°C. A continuación, los animales fueron expuestos a una solución acuosa de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma) a una dilución 1/10⁴, para marcar los núcleos de las células, y después se realizaron 8 lavados de 15 minutos para lavar el anticuerpo y el DAPI. Finalmente, los animales fueron seccionados en el criostato como se ha descrito anteriormente. Las secciones obtenidas en los portaobjetos se cubrieron con un cubreobjetos y el medio de montaje *ProLong® Antifade Reagent* (Invitrogen), que preserva la fluorescencia, para su análisis en el microscopio de epifluorescencia.

Inmunohistoquímica

Inmunohistoquímica ABC *in toto*

Esta técnica nos permite analizar la distribución de determinadas proteínas que reconocemos con anticuerpos específicos. Los animales almacenados en metanol se rehidrataron progresivamente en PBS con detergente Triton® X-100 al 0,8 % (PBS-T 0,8

%). Para ello, se lavaron en 50% de metanol y 50% de PBS-T 0,8% durante 5 minutos y se realizaron 5 lavados de 5 minutos en PBS-T 0,8%. A continuación se trataron con PK disuelta en PBS-T 0,8% durante 30 minutos a TA, a una concentración dependiente de la edad de los animales (Tabla 1). Tras la acción de la PK, se realizaron 2 lavados de 5 minutos en PBS-T 0,8%. Después se realizó una postfijación en PFA 4% durante 20 minutos. Se retiró el fijador, y tras un aclarado en PBST 0,8% se realizaron 6 lavados de 10 minutos en PBS-T 0,8%.

Posteriormente se mantuvieron los embriones en una solución compuesta por un 10% de suero de caballo (Sigma) y un 1% de DMSO en PBS-T 0.8%, durante 1 hora a TA. Se añadió una solución como la anterior más el anticuerpo primario (Tabla 2) y se mantuvieron durante 24 horas a TA. Al día siguiente se realizaron 8 lavados de 15 minutos en PBS-T 0.8%, para eliminar el exceso de anticuerpo, y a continuación se mantuvieron los animales en una solución igual con el anticuerpo secundario (Tabla 3), durante 24 horas a TA. Se realizaron 8 lavados de 15 minutos en PBS-T 0.8%, para eliminar el exceso de anticuerpo. Para amplificar la intensidad del marcaje de las células, los embriones se mantuvieron después en el complejo ABC (avidina-biotina-peroxidasa) (Vector) durante 24 horas a TA. Los componentes A (avidina) y B (biotina-peroxidasa), que constituyen el ABC, se utilizaron a una concentración de 0,4% en PBS-T 0.8% y se mezclaron al menos 30 minutos antes de su utilización. Al día siguiente se realizaron 8 lavados de 15 minutos cada uno en PBS-T 0.8%, más otros 2 lavados de 15 minutos en tampón Tris-HCl a una concentración 0,1 M con pH 7.6 (Tris-HCl) (Cuadro 4). La figura 12 representa un esquema de la técnica inmunohistoquímica ABC.

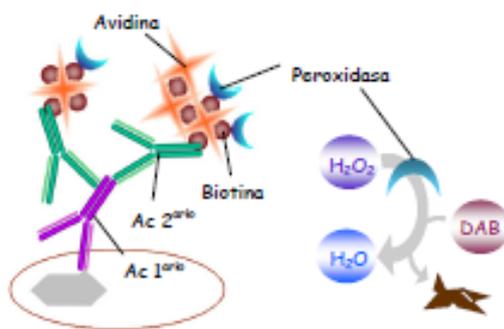


Figura 12: Técnica inmunohistoquímica ABC.

Finalmente, para la visualización del marcaje se utilizó diaminobencidina (DAB) (Sigma) a una concentración de 0.02% y H₂O₂ a 0.012 ‰ en Tris-HCl. La reacción de revelado, por la cual la DAB va formando un precipitado marrón en las células inmunorreactivas, se para con un lavado en Tris-HCl. Tras otros 3 lavados de 10 minutos cada uno en Tris-HCl, los embriones se mantuvieron en PFA 4% durante 24 horas a 4°C.

Para almacenar los embriones se eliminó el PFA con 2 lavados de 5 minutos en PBS y después se deshidrataron en una batería de gliceroles (Panreac) de concentración

creciente: 30%, 50%, 70% y 90% en PBS (el glicerol de 90% tiene un 10% de PFA 4%), donde se almacenan a 4°C. El glicerol es viscoso y permite su orientación en el microscopio para su fotografiado.

Inmunofluorescencia sobre secciones de tejido

Las secciones almacenadas a -20°C se descongelaron durante 30 minutos a TA y se rehidrataron mediante 3 lavados de 10 minutos en PB. Para la detección de BrdU, después de este paso las secciones se mantuvieron en HCl a una concentración 2N durante 30 minutos a 37°C, se lavaron en tampón borato de pH 8,5 (Cuadro 4), y posteriormente en PB.

A continuación se mantuvieron en una solución compuesta por 5% de suero de cabra, 0.02% de detergente Triton[®] X-100 y 1% de DMSO en PB, durante 1 hora a TA. Después se añadió una solución como la anterior más el anticuerpo primario (Tabla 2), en la que se incubaron las secciones durante 24 horas a TA. Al día siguiente se realizaron 3

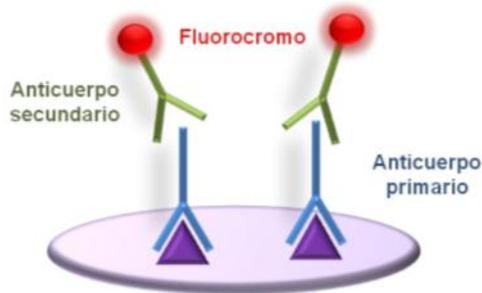


Figura 13: Inmunofluorescencia.

lavados de 10 minutos en PBS y a continuación se incubaron las secciones en una solución como las anteriores con el anticuerpo secundario (Tabla 3) utilizado a una dilución de 1/250 y el DAPI a una dilución de 1/10⁴, durante 24 horas a TA. Después, tras 3 lavados de 10 minutos en PB, las secciones se cubrieron con un cubreobjetos y el medio de montaje *ProLong*[®]. La figura 13 representa un esquema de la técnica de inmunofluorescencia.

Cuadro 4: Composición de los tampones utilizados:

- PB: Na₂HPO₄ 26,86 g/l y NaH₂PO₄ 3,9 g/l, en H₂O; pH 7.4 a 25°C.
- PBS: NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, Na₂HPO₄ 1,44 g/l y KH₂PO₄ 0,21 g/l, en H₂O; pH 7.4 a 25°C.
- Tris-HCl: Tris-(hidroximetil)-aminometano 5,56 g/l y Tris (hidroximetil)-aminometano clorhidrato 24,24 g/l en H₂O; pH 7.6 a 25°C.
- CB: C₂H₆AsNaO₂·3H₂O 0,1M en H₂O; pH 7,4 a 25°C
- Tampón borato: Ácido bórico 6 g/l, en agua destilada; pH 8,5 a 25°C.

Antígeno	Anticuerpo	Dilución de uso	Casa comercial
Histona H3 fosforilada	IgG de conejo, monoclonal	1/5000	Abcam
BrdU	IgG de rata, monoclonal	1/5000	Sigma
Sox2	IgG de conejo, policlonal	1/500	Abcam
Pax6	IgG de conejo, policlonal	1/1000	Covance
Calretinina	IgG de conejo, policlonal	1/10000	Swant
Pax2	IgG de conejo, policlonal	1/500	Covance
Neuroлина	IgG de ratón, monoclonal	1/500	Hybridoma bank
Glutamina sintetasa	IgG de ratón, monoclonal	1/500	Chemicon
GFAP	IgG de ratón, monoclonal	1/500	ZIRC
Zpr1	IgG de ratón, monoclonal	1/500	ZIRC
Zpr3	IgG de ratón, monoclonal	1/500	ZIRC

Tabla 2: Anticuerpos primarios utilizados en la técnica inmunohistoquímica.

Antígeno	Anticuerpo	Conjugado con	Casa comercial
IgG de ratón, monoclonal	IgG de cabra	Cy2	Jackson Immunoresearch
IgG de ratón, monoclonal	IgG de caballo	biotina	Vector
IgG de rata, monoclonal	IgG de cabra	Cy2	Jackson Immunoresearch
IgG de conejo, policlonal	IgG de cabra	Cy2	Jackson Immunoresearch
IgG de conejo, policlonal	IgG de cabra	Cy3	Jackson Immunoresearch

Tabla 3: Anticuerpos secundarios utilizados en la técnica inmunohistoquímica.

Diseño y obtención de las ribosondas de *neuroлина-a* y *neuroлина-b*

Diseño de los cebadores o *primers*

El primer paso para la síntesis de las ribosondas fue clonar la secuencia de interés del ADN correspondiente a los genes *neuroлина-a* y *neuroлина-b*. La ribosonda reconocerá el ARNm correspondiente a dichas secuencias. Las secuencias completas de cada gen se encuentran disponibles en la base de datos de *pubmed*. Para el diseño de los *primers* que se necesitan para clonar las secuencias de interés utilizamos los programas *Sequence Manipulation Suite (SMS)* y *Custom primers OligoPerfect™ Designer* (Invitrogen). Los *primers* deben tener unas propiedades físicas adecuadas y no deben unirse a ninguna otra región del genoma. Por ello, la calidad de los cebadores fue analizada con el programa *Ensemble*. Las secuencias y *Tm* prevista de los *primers* se detallan en la Tabla 4. Finalmente, una vez diseñadas y analizadas, enviamos las secuencias a la casa comercial (Isogen) para que realizara su síntesis.

Gen	Primer	Secuencia	<i>Tm</i>
<i>neuroлина-a</i>	<i>Forward</i>	GCCTCACTCCTACAGGCAAG	60°C
	<i>Reverse</i>	CGACACCCACAATCACTTTG	60°C
<i>neuroлина-b</i>	<i>Forward</i>	ACTGACGTACGCAACGAGTG	60°C
	<i>Reverse</i>	CTTGAACCACGTGATGTTGG	60°C

Tabla 4: *Primers* utilizados para la síntesis de las ribosondas.

Extracción del ARN y obtención del ADN copia

Una vez que tuvimos los *primers* en el laboratorio, el siguiente paso fue realizar una extracción del ARN de embriones de 48 hpf. Elegimos este estadio porque es cuando la expresión de estos genes está más extendida durante el desarrollo. Para ello, se dispusieron unos 60 embriones vivos en un microtubo de centrífuga de 2 ml (Eppendorf) y se les añadió 1 ml de Trizol® LS Reagent (Invitrogen), tras lo cual se disgregaron mecánicamente utilizando un POLYTRON® PT 2100 (KINEMATICA AG). Se añadieron 200 µl de cloroformo (Panreac) y se dejaron reposar 3 minutos a TA. Se

centrifugaron a 12000 G durante 15 minutos a 4°C y se recogió la fase acuosa donde se encuentra el ARN, que se introdujo en un microtubo de centrifuga de 1,5 ml. A continuación se añadieron 500 µl de isopropanol (Panreac), se mezcló agitando y se dejó reposar 10 minutos para que el ARN precipitase tras una centrifugación a 12000 G durante 10 minutos a 4°C. Se retiró el líquido, se añadió 1 ml de etanol 70° al precipitado y se centrifugó a 7000 G durante 5 minutos a 4°C. Se retiró el etanol, se añadieron 20 µl de agua ultrapura y se resuspendió el ARN en un termobloque a 60°C durante 10 minutos. Por último, se cuantificó el ARN en un nanofotómetro para comprobar la extracción.

A continuación se realizó la retrotranscripción del ARNm para obtener el ADN complementario o ADNcopia (ADNc). El método que elegimos fue el que utiliza cebadores de unión aleatoria o *random primers*. Para ello utilizamos el *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems), con el que preparamos una solución con 2 µl de *buffer RT 10x*, 0,8 µl de *dNTPs 25x*, 2 µl de *primer RT 10x*, 1 µl de *reverse transcriptase multiscribe*, 4,2 µl de H₂O y 10 µl del ARN extraído anteriormente. Para el control negativo se añadió H₂O en lugar de *reverse transcriptase*. Esta mezcla se incubó en un termociclador *Verity* (Applied Biosystems) con el siguiente programa: 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C y 5 minutos a 85°C.

Obtención y ligación de los amplicones al plásmido

Una vez que tenemos los *primers* de neurolina-a y neurolina-b y el ADNc, obtuvimos la región de interés de cada gen a partir de la cual sintetizamos las sondas. Para ello se reconstituyeron en H₂O los *primers* liofilizados enviados por la casa comercial y se diluyeron a la concentración de uso de 10 µM. Para la reacción de PCR que nos generará los fragmentos de interés o amplicones utilizamos el *Go Taq Polimerase Kit* (Promega) con el cual preparamos, para cada gen, una solución con 11 µl de *Buffer 5x*, 6,6 µl de MgCl₂, 1,1 µl de dNTPs, 1,1 µl de *primer forward (primer fw)*, 1,1 µl de *primer reverse (primer rev)*, 0,25 µl de *Go Taq Polimerase* y 30,68 µl de H₂O. Cada una de estas dos soluciones se repartió en dos microtubos de centrifuga de PCR, de manera que en uno se añadieron 2 µl de ADNc y en otro 2 µl de H₂O para tener un control negativo. Cada primer tiene una temperatura de unión al ADN óptima, que es la *temperature melting* o *Tm*. Al diseñar los *primers* se procura que las *Tms* del *forward* y del *reverse* sean iguales y se selecciona esa *Tm* en el programa de PCR. No obstante, probamos diferentes *Tms* para determinar cuál es la que generaba un amplicón mayor, lo

que comprobamos haciendo una electroforesis de los amplicones. La T_m óptima para los dos genes fue de 63°C. La solución anterior se incubó en un termociclador con el siguiente programa de PCR:

	35 ciclos				
2 minutos 95°C	1 minuto 95°C	1 minuto 63°C	1 minuto 72°C	7 minutos 95°C	4°C

Los amplicones fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% en tampón TBE al 0,5x (Cuadro 5). Se añadió *Red Safe* (iNtRON Biotechnology) al gel para poder visualizar el ADN en la lámpara ultravioleta y un marcador de pesos moleculares (Promega) para confirmar que el tamaño de los amplicones era el esperado.

Cuadro 5: Composición de TBE 10x: 108 g de Trizma base, 55 g de ácido bórico, 40 ml de EDTA 0.5M pH 8 en 1 de H₂O

A continuación se purificó el ADN correspondiente a las bandas visualizadas en el gel de agarosa. Para ello, cortamos con una cuchilla la parte del gel que contenía cada banda y realizamos la extracción y purificación del ADN utilizando el QIAquick[®] Gel Extraction Kit 250 (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Una vez purificados los amplicones correspondientes a *neuroлина-a* y *neuroлина-b*

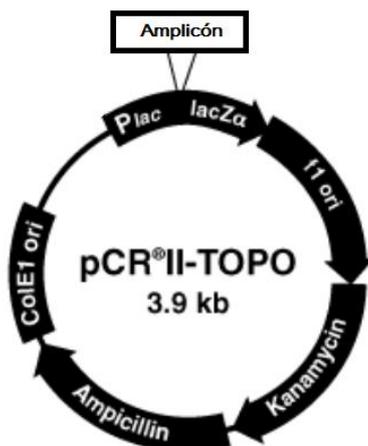


Figura 14: Esquema de la inserción del amplicón en el plásmido pCR[®]II (modificado de www.invitrogen.com).

utilizamos el *TOPO TA Cloning[®] Kit* para ligar cada uno de ellos al plásmido pCR[®]II (figura 14) contenido en el kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. Así, tras la unión del plásmido con el amplicón obtuvimos en un microtubo de centrifuga el plásmido pCR[®]II/amplicón de *neuroлина-a* y en otro el plásmido pCR[®]II/amplicón de *neuroлина-b*.

El sitio de inserción de los amplicones en el plásmido o *polylinker* se encuentra en medio de la región denominada *LacZα*, donde se encuentra el gen de la β-galactosidasa. A un lado del *polylinker* se encuentra el promotor de la ARN polimerasa del fago T7 y al otro, en la hebra complementaria, se localiza el promotor de la ARN polimerasa del fago SP6.

Clonación del plásmido

Los plásmidos resultantes de las ligaciones fueron introducidos en bacterias *E. coli* competentes, mediante un proceso denominado transformación. A cada microtubo de los anteriores se añadieron 50 µl de bacterias y se mantuvieron 5 minutos en hielo, 1.5 minutos a 42°C en un termobloque y otros 5 minutos en hielo, para que se produzca la transformación. Después, se añadieron 250 µl de medio LB Broth, preparado a una concentración del 3,7% en H₂O, para que las bacterias se recuperen de la transformación manteniéndolas a 37°C durante 1 hora.

A continuación se sembraron las bacterias en placas Petri con medio LB Agar Miller (Sigma) a una concentración del 2% en H₂O y se mantuvieron una noche a 37°C en una estufa. Tanto el medio LB Broth como el LB Agar Miller fueron suplementados con Ampicilina (Sigma) a una dilución de 1/1000 a partir de alícuotas de concentración 50 mg/ml. Además, se añadieron a cada placa 40 µl de *XGal* y 40 µl *IPTG*, que forman un precipitado azul por acción de la β-galactosidasa. De este modo, sólo las bacterias transformadas pudieron vivir, pues el gen de resistencia a ampicilina se encuentra en el plásmido. Por otra parte, las que vivieron pero no tenían ligado el amplicón al plásmido formaron colonias azules, por acción de la β-galactosidasa sobre el *XGal-IPTG*. Las bacterias que portaban el plásmido con el amplicón ligado formaron colonias blancas, que fueron las que nos interesaron.

Al día siguiente se sacaron las placas de la estufa, se guardaron a 4°C unos minutos y se comprobó que se habían formado colonias. De entre las blancas elegimos 6 colonias aisladas correspondientes a cada amplicón (6 colonias de *neuroлина-a* y 6 de *neuroлина-b*), las resembramos en otras dos placas que se mantuvieron a 37°C y cultivamos una muestra de cada una de las colonias resembradas en un tubo de centrifuga de 15 ml con 3 ml de medio LB Broth. Esta muestra se mantuvo durante 6 horas a 37°C en un agitador orbital a 200 rpm.

Pasadas las 6 horas, centrifugamos los tubos a 3000 rpm para precipitar las bacterias. Después las lisamos y extrajimos el ADN utilizando el *QIAprep[®] Spin Miniprep Kit 50* (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para comprobar que en los plásmidos se encuentran ligados los amplicones de los genes de interés, realizamos una digestión enzimática de los plásmidos correspondientes a cada colonia. Mezclamos 8,5 µl de plásmido, 1 µl de *buffer* 10x, y 0.5 µl de la enzima de

restricción EcoRI e incubamos la mezcla a 37°C durante 2 horas. Esta enzima corta el plásmido en las regiones que flanquean el amplicón dentro del *polylinker*.

El producto de la digestión fue sometido a electroforesis en gel de agarosa a una concentración de 1,2% en tampón Bionic 1x (sigma). Utilizamos *Red Safe* y un marcador de pesos moleculares (Promega). Se comprobó la presencia de una banda correspondiente al amplicón y otra al plásmido.

El siguiente paso fue seleccionar una de las colonias en las que habíamos comprobado que se encontraba el amplicón ligado al plásmido, para cultivarla en 100 ml de LB Broth durante 1 noche a 37°C en agitador orbital a 200 rpm. Después, tomamos 20 ml del medio con las bacterias para extraer el ADN tal como fue descrito anteriormente. La concentración de ADN obtenida fue de unos 100 ng/μl.

Determinación de la orientación del amplicón en el plásmido

Para determinar la orientación en la que se insertó el amplicón correspondiente a cada uno de los genes, llevamos una muestra del ADN extraído de las bacterias al Servicio de Secuenciación de la Universidad de Salamanca. La secuenciación se llevó a cabo por el método de Sanger, utilizando el promotor M13 que se encuentra en el *polylinker* del plásmido.

El Servicio de Secuenciación nos envió el cromatograma de las secuencias del plásmido con cada amplicón. Para visualizarlas utilizamos el programa Chromas[®]. La orientación con la que se haya insertado el amplicón en el *polylinker* determinará la ARN polimerasa -del fago T7 o del fago SP6- que habrá que utilizar para transcribir la ribosonda a partir de una hebra de ADN o de su complementaria. Para saber dicha orientación utilizamos el programa ClustalW, para comparar la secuencia de los amplicones con las obtenidas en la secuenciación. El análisis reveló que la ribosonda de *neurolina-a* habría que transcribirla utilizando la ARN polimerasa T7 y la de *neurolina-b* con la SP6.

Síntesis de las ribosondas

Antes de transcribir la ribosonda linealizamos los plásmidos. Para ello elegimos una enzima de restricción que cortase en algún sitio de restricción del *polylinker* que flanquea al amplicón en su extremo 3'. Para la *neurolina-a* elegimos BamHI y para

neuroлина-b XbaI. Mezclamos 5 µl de plásmido circular -unos 500 ng-, 2 µl de la enzima de restricción, 10 µl del *buffer* de la enzima, 1 µl de BSA, 83 µl de H₂O y lo incubamos 2,5 horas a 37°C en un termobloque. Después purificamos el producto de la digestión con el *QIAquick*[®] *PCR-Purification Kit 50* (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para llevar a cabo la síntesis de la ribosonda mezclamos 10 µl de plásmido lineal - 1µg-, 4 µl de *buffer* de la ARN polimerasa, 2 µl de ditioneitol (DTT) 100 mM, 2 µl de NTPs marcados con digoxigenina, 1 µl de RNasina y 1 µl RNA Polimerasa -T7 o SP6- y lo incubamos durante 2,5 horas a 37°C.

A continuación, añadimos 80 µl de H₂O miliQ, 200 µl de etanol frío y 10 µl LiCl₂ y lo mantuvimos una noche a -20°C. Al día siguiente centrifugamos la mezcla a 21000 G durante 15 minutos a 4°C, retiramos el líquido y dejamos evaporar el etanol unos minutos. Finalmente añadimos 25 µl de Hyb+ y lo mantuvimos a 4°C unas horas para que se disolviera el precipitado de la sonda. Lo guardamos a -80°C. En la hibridación *in situ* se utilizó una dilución de la ribosonda de 1/100 en Hyb+.

Hibridación *in situ in toto*

Esta técnica nos permite determinar el patrón de expresión de un gen determinado, utilizando ribosondas específicas para detectar su ARNm que están unidas a moléculas de digoxigenina. La Fig. 15 representa un esquema de la técnica de hibridación *in situ*.

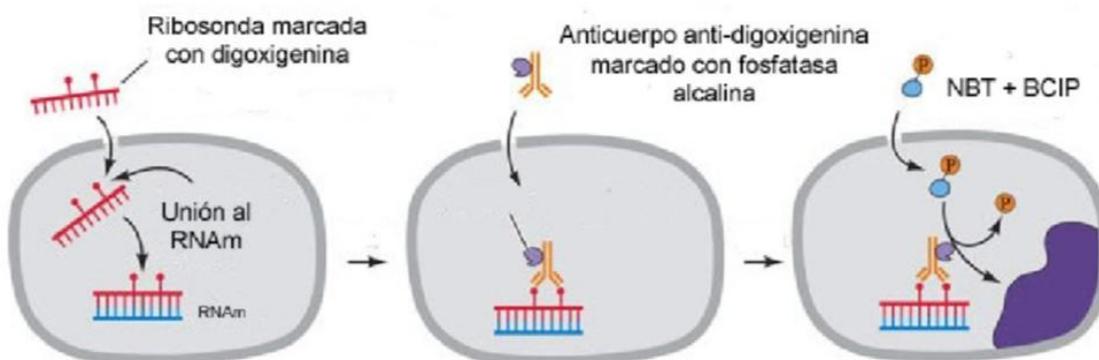


Figura 15: Esquema de la técnica de hibridación *in situ*.

El primer paso para la realización de las hibridaciones *in situ* fue la síntesis de las ribosondas, que se llevó a cabo a partir de plásmidos circulares. Excepto en el caso de las

ribosondas para *neurolin-a* y *neurolin-b*, que fueron diseñadas en el presente Trabajo, el proceso de obtención se realizó como se detalla en el apartado “Síntesis de las ribosondas”, a partir de plásmidos circulares y utilizando diferentes enzimas de restricción y ARN polimerasas (Tabla 5). El protocolo de la hibridación *in situ* se explica a continuación.

Los animales almacenados en metanol se rehidrataron progresivamente en PBS-T 0,1%. Se lavaron en 50% de metanol y 50% de PBS-T 0,1% durante 5 minutos y después se realizaron 5 lavados de 5 minutos en PBS-T 0,1%. Se trataron con PK disuelta en PBS-T 0,1% durante 30 minutos a TA, a una concentración dependiente de la edad de los animales (Tabla 1). Tras la acción de la PK, se realizaron 2 lavados de 5 minutos en PBS-T 0,1%. A continuación se realizó una postfijación en PFA4 % durante 20 minutos, se retiró el fijador y, tras un aclarado en PBST 0,1%, se realizaron 6 lavados de 10 minutos en PBS-T 0,1%.

A continuación, los animales se mantuvieron en una mezcla de 50% de solución de hibridación Hyb+ (Cuadro 6) y 50% de PBS-Tx 0.1% durante 5 minutos, y después en solución Hyb+ durante 1 hora a 68°C en un termobloque. Se retiró la solución Hyb+ y se añadió la ribosonda. Las ribosondas se almacenan diluidas en Hyb+ a una concentración del 1%. La hibridación de la ribosonda con el ARNm se realiza durante una noche a 68°C. Después, se retiró la ribosonda y se guardó para poder reutilizarla de nuevo.

Para eliminar el exceso de ribosonda se realizaron 4 lavados de 30 minutos cada uno en la solución Hyb- (Cuadro 6), un aclarado en la solución SSC 2x, y 2 lavados de 30 minutos cada uno en la solución SSC 0.2x (las soluciones SSC 2x y 0.2x se prepararon a partir de SSC 20x (Cuadro 6). Todos estos lavados se hicieron a 68°C. Después, se realizaron otros 5 lavados de 10 minutos cada uno en PBST 0.1% a TA. Los siguientes lavados hasta el final de la técnica se hicieron también a TA.

Antes de ser incubados con el anticuerpo, los embriones se incubaron en medio MAB 2% (Cuadro 6) durante al menos 2 horas a TA. Después se incubaron en el mismo medio, al que se añadió el anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Roche) a una dilución de 1/6000, durante una noche a 4°C. Al día siguiente, se hicieron 5 lavados de 30 minutos cada uno en PBST 0.1%, más otros 3 lavados de 10 minutos cada uno en la solución de revelado Xpho (Cuadro 6).

Para el revelado se utilizó NBT (Roche) a una dilución de 1/1000 y BCIP (Roche) a una dilución de 1/285 en la solución Xpho. La fosfatasa alcalina del anticuerpo convierte el NBT en un precipitado morado en las células que expresan el ARNm

detectado por la ribosonda. La reacción de revelado se detuvo lavando los ejemplares en PBS durante 5 minutos y después postfijándolos en PFA 4 % durante 24 horas a 4°C. Finalmente, se deshidrataron en una batería de gliceroles de concentración creciente: 30%, 50%, 70% y 90% en PBS (el glicerol de 90% tiene un 10% de PFA 4 %). Se guardaron a 4°C hasta su fotografiado.

Cuadro 5: Composición de las soluciones y medios utilizados en la hibridación *in situ*:

- Hyb+: Formamida (Sigma) 25 ml, SSC 20x 12.5 ml, Triton x-100 al 10% 500 µl, tampón citrato 1M 460 µl, RNA tórula (Sigma-Aldrich) 500 µl, Heparina (Sigma-Aldrich) 25 µl, agua ultrapura hasta 50 ml.
- Hyb-: Formamida (Sigma) 25 ml, SSC 20x 12.5 ml, Triton x-100 al 10% 500 µl, agua ultrapura hasta 50 ml.
- SSC 20x: NaCl 175.3 g y citrato sódico 88.2 g en 1 l de agua ultrapura, pH 7 a 25°C.
- MAB 2%: Blocking reagent (Sigma) 2 g en 100 ml de tampón málico 1x.
- Tampón málico 5x: Ácido málico 58 g, NaOH 40 g, NaCl 43 g, en 1 l de agua ultrapura, pH 7.5 a 25°C.
- Xpho: Tris-HCl 1 M pH 9.5 2 ml, MgCl 1M 1 ml, NaCl 4M 500 µl, Triton x-100 al 10% 200 µl, agua ultrapura hasta 20 ml.

Ribosonda	Procedencia	Enzima de restricción	ARN polimerasa
<i>Pax6a</i>	S. Wilson (UCL)	SmaI	Fago T7
<i>Ath5</i>	S. Wilson (UCL)	EcoRI	Fago T7
<i>Sox2</i>	S. Wilson (UCL)	EcoRI	Fago SP6
<i>Pax2-a</i>	S. Wilson (UCL)	BamHI	Fago T7
<i>Slit2</i>	S. Wilson (UCL)	XhoI	Fago T3
<i>Neuroлина-a</i>	presente Trabajo	BamHI	Fago T7
<i>Neuroлина-b</i>	presente Trabajo	XbaI	Fago SP6
<i>Raldh2</i>	S. Wilson (UCL)	KpnI	Fago T7

Tabla 5: Características de las ribosondas utilizadas en el presente Trabajo.

Análisis de imágenes

Las fotografías de secciones de embriones y larvas procesadas por inmunofluorescencia, y las fotografías de inmunohistoquímica *in toto* e hibridación *in situ in toto*, fueron tomadas en un microscopio equipado con campo claro y epifluorescencia (Olympus Provis AX70) acoplado a una cámara digital (DP70, Olympus).

Por último, para ajustar los niveles de brillo y contraste a los observados directamente en el microscopio se utilizó el programa Adobe® Photoshop CS5®.

Conteos de células y medición de áreas

Para analizar las posibles alteraciones en diferentes tipos de células dentro de la retina, realizamos el conteo de células positivas para cada marcador estudiado en secciones fotografiadas en el microscopio. Se analizaron 3 secciones de retina mediales - que contuvieran el cristalino- de cada animal en un mínimo de 3 animales de cada grupo experimental. Las secciones eran no consecutivas para evitar la posibilidad de contar dos veces las mismas células. Tanto la medición del área de las secciones como el conteo de células se realizó con el programa ImageJ®. Los datos de las mediciones de las áreas fueron utilizados para comparar los tamaños de la retina entre los diferentes grupos experimentales.

Ya que el área de las secciones de retina es menor en los ejemplares tratados con AR, con DEAB y con AGN, es esperable que haya menos células de cada tipo en estos animales. Para determinar si la reducción del número de células es proporcional a la reducción del tamaño de la retina o es mayor, debida a los tratamientos, expresamos el número de células en relación al área de la sección en la que fueron contadas, como n° de células positivas para cada marcador/1000 μm^2 .

En el caso de la técnica TUNEL, ya que la microftalmia no implica menor número de células apoptóticas, el resultado fue expresado en n° de células TUNEL positivas/sección. Los resultados de los conteos de los diferentes marcadores en los animales mutantes para *raldh3* también fueron expresados como n° de células positivas para cada marcador/sección, dado que no hay diferencias en el tamaño de la retina entre los animales mutantes y los silvestres utilizados como control.

Análisis estadístico de los datos

Se compararon, en cada estadio y para cada marcador -también para el TUNEL-, las medias de las mediciones realizadas en las retinas de los animales del grupo control con las mediciones de los grupos tratados con AR, DEAB o AGN. El estadígrafo utilizado fue el test *t*-Student. El valor $p < 0,05$ fue considerado significativo. Las representaciones gráficas de los resultados se realizaron con el programa Excel[®].

RESULTADOS

En los últimos años se está profundizando en el conocimiento de la función de los retinoides, y en particular del AR, en el desarrollo del sistema visual de vertebrados, mediante diversas aproximaciones que se basan en el aumento o en la inhibición de la señalización mediada por dichas moléculas. Dadas las ventajas que ofrece, el pez cebra es un organismo modelo muy adecuado para este tipo de experimentos.

En el presente Trabajo, y con el objetivo de aportar nuevos datos sobre la función del AR, hemos expuesto larvas de pez cebra a AR para conocer su efecto en la formación de la retina a partir de la ZPG, durante el desarrollo larvario entre los 3 y 4 dpf. También hemos expuestos a los animales a AR durante la retinogénesis embrionaria que se produce a partir de la copa óptica, entre las 24 y las 48 hpf. Además, en esta misma ventana temporal, hemos bloqueado la señal del AR inhibiendo su síntesis endógena y la unión del AR a sus receptores intracelulares. Por último, analizamos la retinogénesis embrionaria en animales mutantes para *raldh3*, la enzima que sintetiza AR en la retina ventral.

Efectos del tratamiento con ácido retinoico entre los 3 y 4 dpf

Morfología y tamaño de la retina

El tratamiento de las larvas de pez cebra con AR entre los 3 y 4 dpf no produce alteraciones morfológicas evidentes de la cabeza y los ojos a los 4, 5 o 6 dpf (Fig. 16 a-i). Sin embargo, cuando medimos el área de la retina en secciones histológicas del ojo obtenidas de estos animales, comprobamos que sí se produce una reducción del tamaño de la retina en los tratados con AR 0,1 o 1 μM , aunque no es evidente bajo lupa binocular (Fig. 16 j).

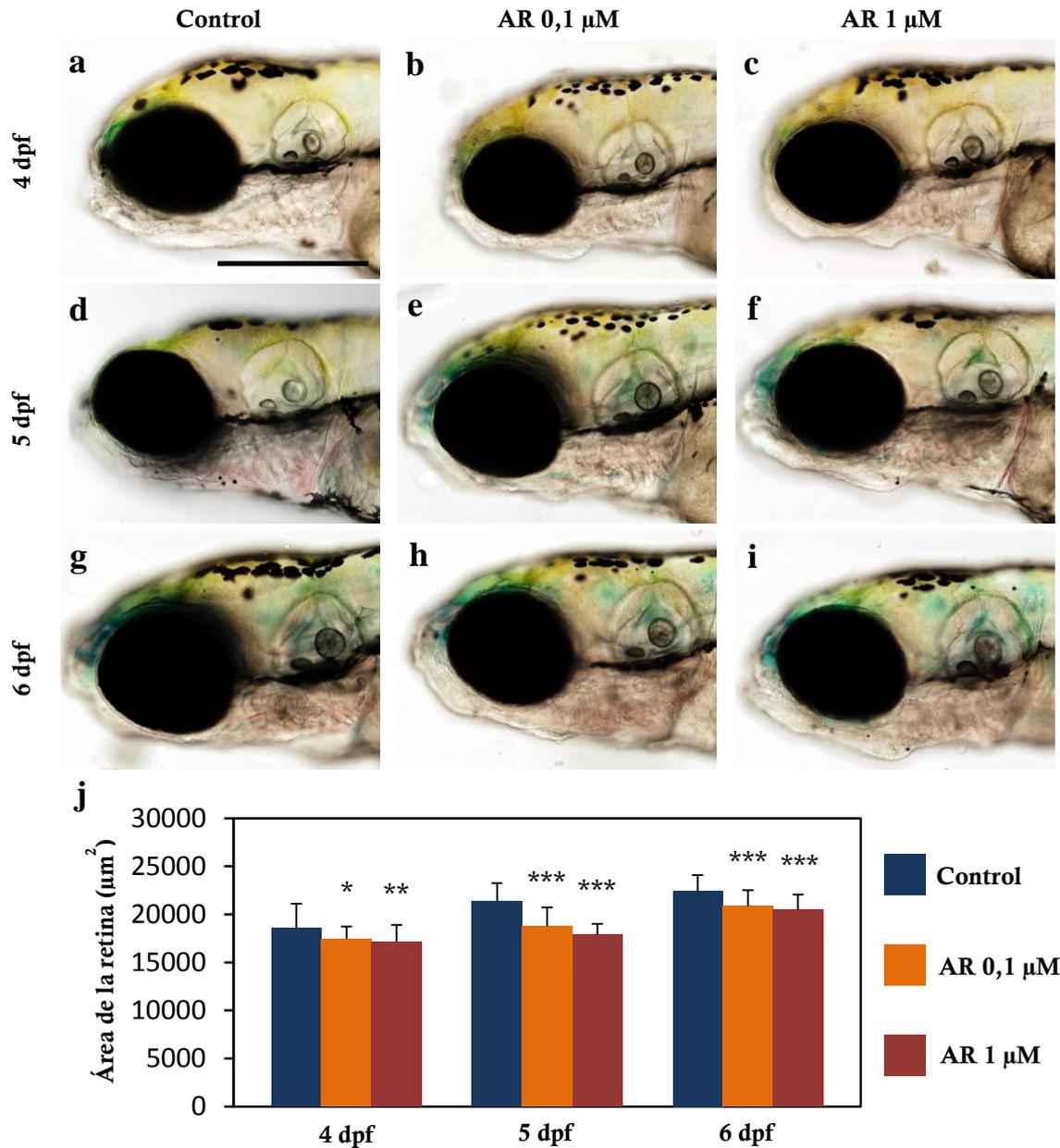


Figura 16: a-i) Vistas laterales de animales vivos, control y tratados con AR de 4, 5 y 6 dpf. El tratamiento no produce alteraciones morfológicas evidentes de la cabeza y del ojo. **j)** Gráfica que muestra la reducción del tamaño de la retina de los animales tratados con AR. AR: ácido retinoico, dpf: días postfecundación. Barra de escala: 200 μm. *: $P < 0.05$; **: $0.05 > P > 0.001$; ***: $P < 0.001$.

Proliferación celular

Para saber si la reducción del tamaño del ojo, o microftalmia, podía deberse a una reducción en la tasa de proliferación celular, realizamos la inmunodetección de PH3 y de BrdU en los animales tratados con AR 0,1 y 1 μM a los 4, 5 y 6 dpf, para compararlos con los animales controles no tratados.

PH3

A los 4 dpf (Fig. 17 a, b, c), las células inmunorreactivas a PH3 se localizan en los márgenes de la retina, en la ZPG, y el patrón de distribución de estas células es el mismo en los controles que en los tratados con AR. El marcaje para H3P se mantiene sin cambios respecto a los 4 dpf, tanto en los animales control como en los tratados con AR de 5 y 6 dpf (Fig. 17 d-i).

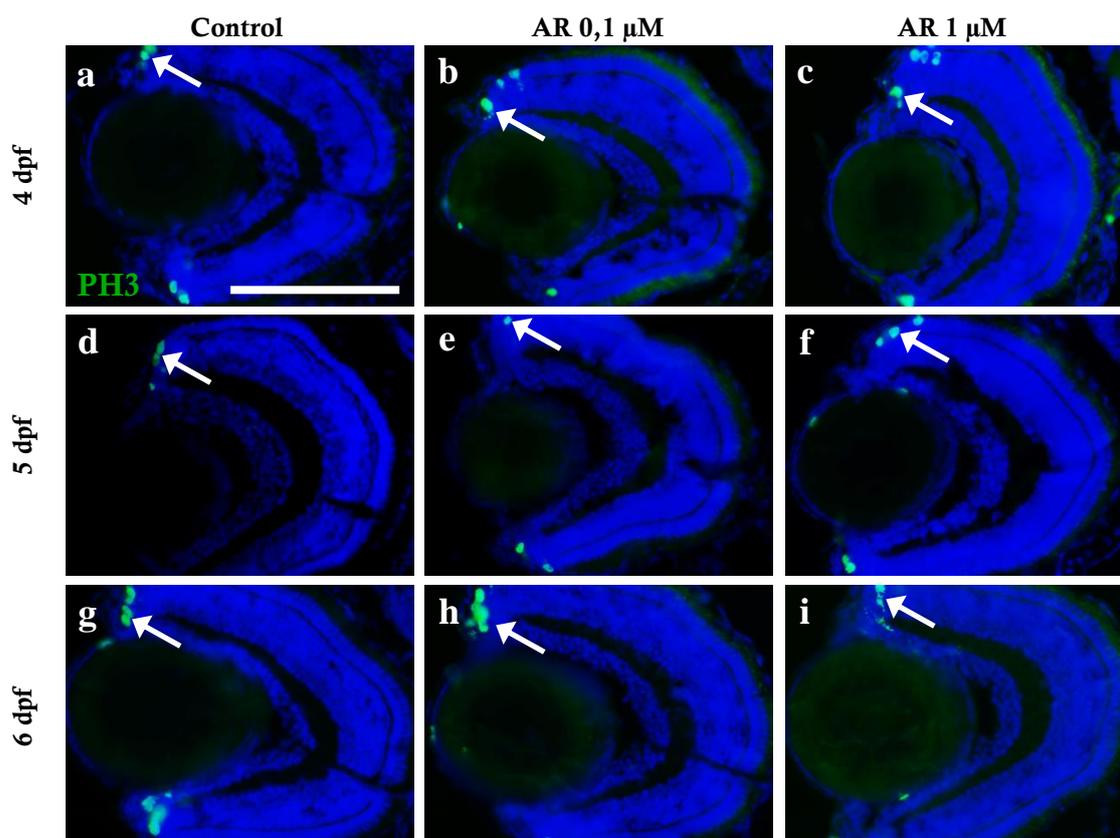


Figura 17: Distribución de PH3 en animales control y tratados con AR. Las células PH3 positivas se localizan en la ZPG tanto en los animales control como en los tratados con AR (flecha en **a-i**). AR: ácido retinoico, dpf: días postfecundación. Barra de escala: 100 μm .

Para comprobar si había diferencias o no en el número de células positivas a PH3, realizamos un conteo de las mismas. Dada la microftalmia de los animales tratados con AR, el resultado del número de células positivas para PH3 y para todos los marcadores que hemos analizado se expresará en relación al área de la sección de retina donde fueron contadas dichas células, o sea, como densidad celular.

Mediante el análisis estadístico, hemos comprobado que aunque a los 4 dpf no hay diferencias entre controles y tratados con AR, a los 5 dpf, el número de células PH3

positivas en la retina de los animales tratados con AR se reduce a la mitad respecto a los controles. A los 6 dpf, se mantiene la reducción del número de células PH3 positivas en la retina de los animales tratados con AR 1 μM , pero la diferencia con respecto a los controles no es tan grande como a los 5 dpf (Fig. 23 a).

BrdU

De manera similar a lo descrito para el marcaje con PH3, las células BrdU positivas se localizan en la ZPG de la retina. No hay modificaciones en el patrón de distribución de estas células en ninguna de las edades analizadas (Fig. 18).

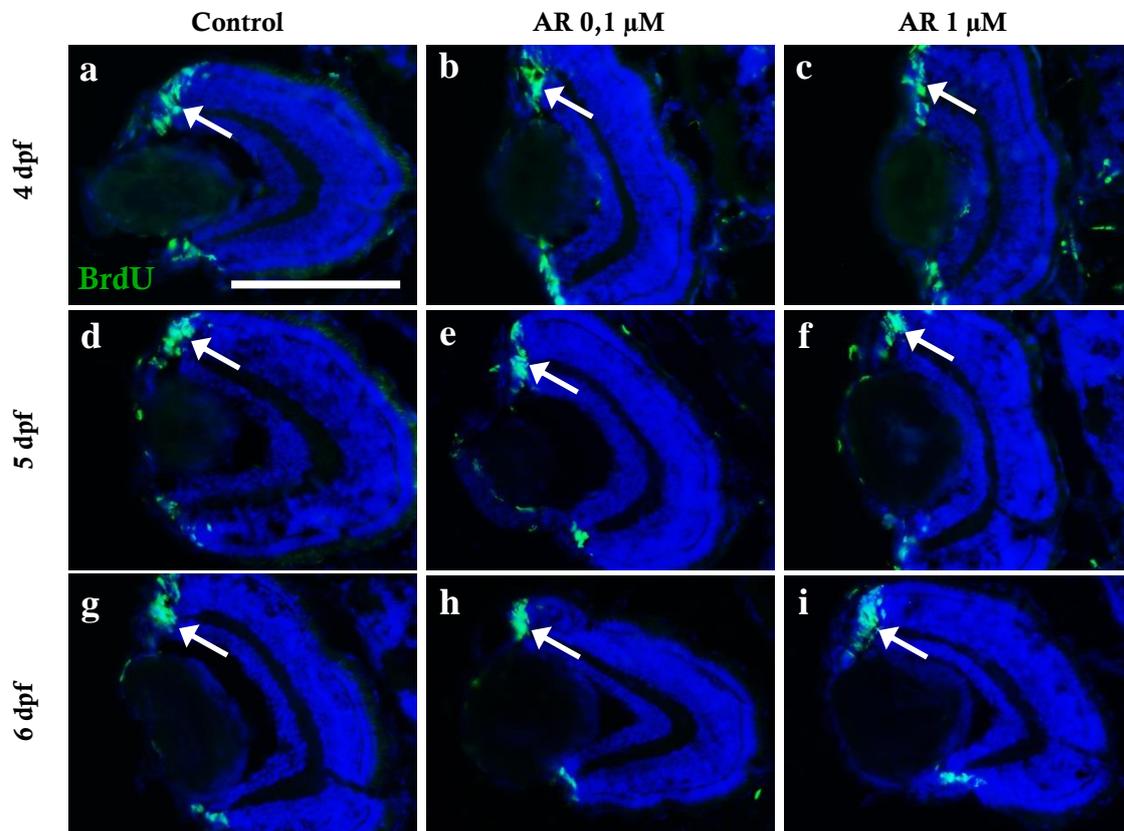


Figura 18: Distribución de BrdU en animales control y tratados con AR. Las células BrdU positivas se localizan en la ZPG tanto en los animales control como en los tratados con AR (flecha en a-i). AR: ácido retinoico, dpf: días postfecundación. Barra de escala: 100 μm .

Sin embargo, cuando realizamos el conteo comprobamos que hay mayor densidad de células BrdU positivas en las retinas de animales tratados con AR 0,1 μM a los 4 y 5 dpf, y también en los tratados con AR 1 μM , pero en estos sólo a los 5 dpf (Fig. 23 b).

Neurogénesis

Para conocer el posible efecto del AR sobre la retinogénesis, analizamos la distribución de las proteínas Pax6 y Sox2, implicadas en la neurogénesis y el inicio de la diferenciación celular.

Pax6

La técnica inmunohistoquímica para detectar la proteína Pax6 en secciones de retina muestra que, a los 4 dpf (Fig. 19 a, b, c), las células Pax6 positivas se localizan en la CCG y en la parte vitreal de la CNI, tanto en los animales control como en los tratados con AR. A los 5 y 6 dpf (Fig. 19 d-i), se mantiene el mismo patrón de marcaje en los tres grupos experimentales.

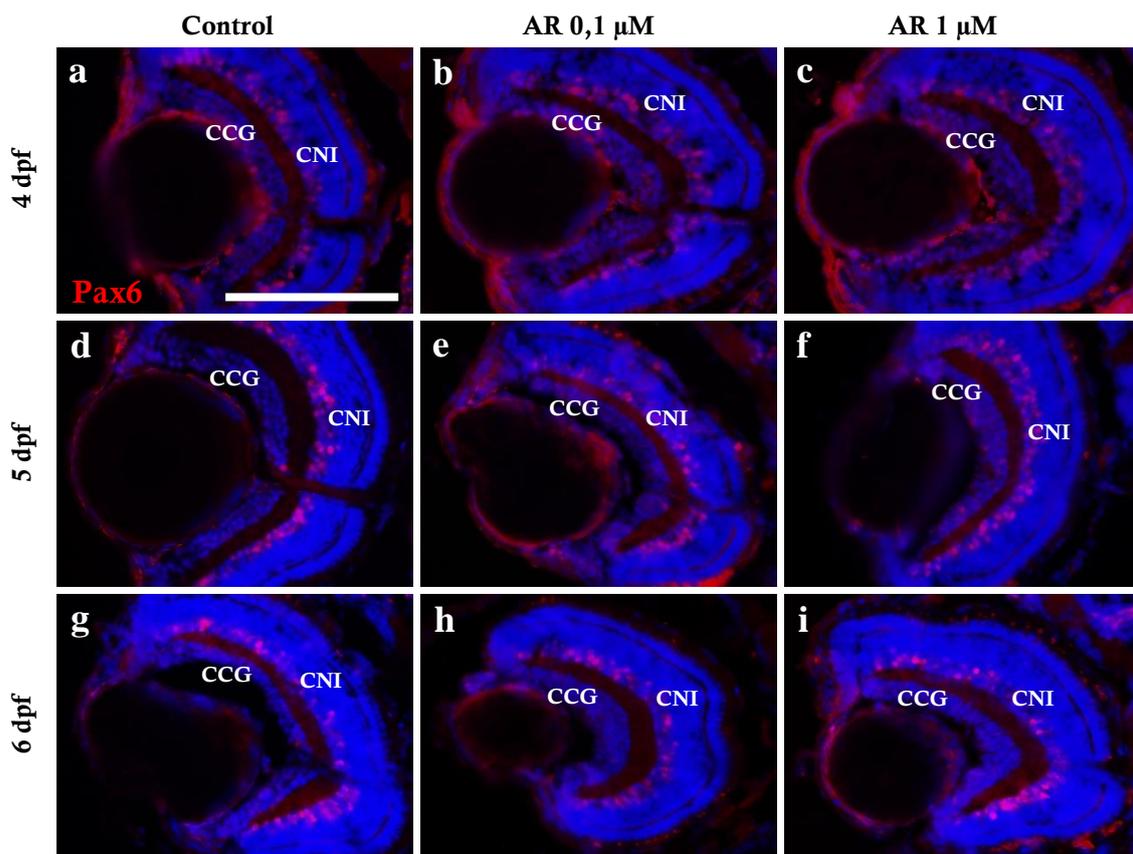


Figura 19: Distribución de Pax6 en la retina de animales control y tratados con AR. AR: ácido retinoico, CCG: capa de las células ganglionares, CNI: capa nuclear interna, dpf: días postfecundación. Barra de

Sin embargo, los conteos de las células positivas para Pax6 muestran que sí hay diferencias. En las retinas de los animales tratados con AR 0,1 μ M, hay menor densidad de células Pax6 positivas que en los controles a los 5 y 6 dpf. En el caso de los tratados con AR 1 μ M, hay menor densidad relativa de dichas células en las tres edades analizadas (Fig. 23 c).

Sox2

La inmunohistoquímica para Sox2 muestra que a los 4 dpf, en los animales control (Fig. 20 a), las células Sox2 positivas se localizan en la ZPG, donde presentan morfología alargada. Hemos observado también una hilera de células Sox2 positivas situada en el centro de la CNI. Estas células son fusiformes y están orientadas radialmente. Hay también células positivas a Sox2 situadas a ambos lados de la CPI, donde presentan una morfología redondeada, y en la salida del nervio óptico, donde son fusiformes. Los animales tratados con AR (Fig. 20 b, c) presentan el mismo patrón de marcaje que los controles, aunque la densidad de células positivas es menor que en los controles (Fig. 23 d).

A los 5 y 6 dpf (Fig. 20 d-i), el patrón de distribución de Sox2 es similar al descrito anteriormente, tanto en los controles como en los tratados con AR. Al realizar los conteos observamos que a los 5 dpf, en los animales tratados también hay menor densidad de células positivas. Sin embargo, a los 6 dpf, el número de estas células es similar en los tres grupos experimentales (Fig. 23 d).

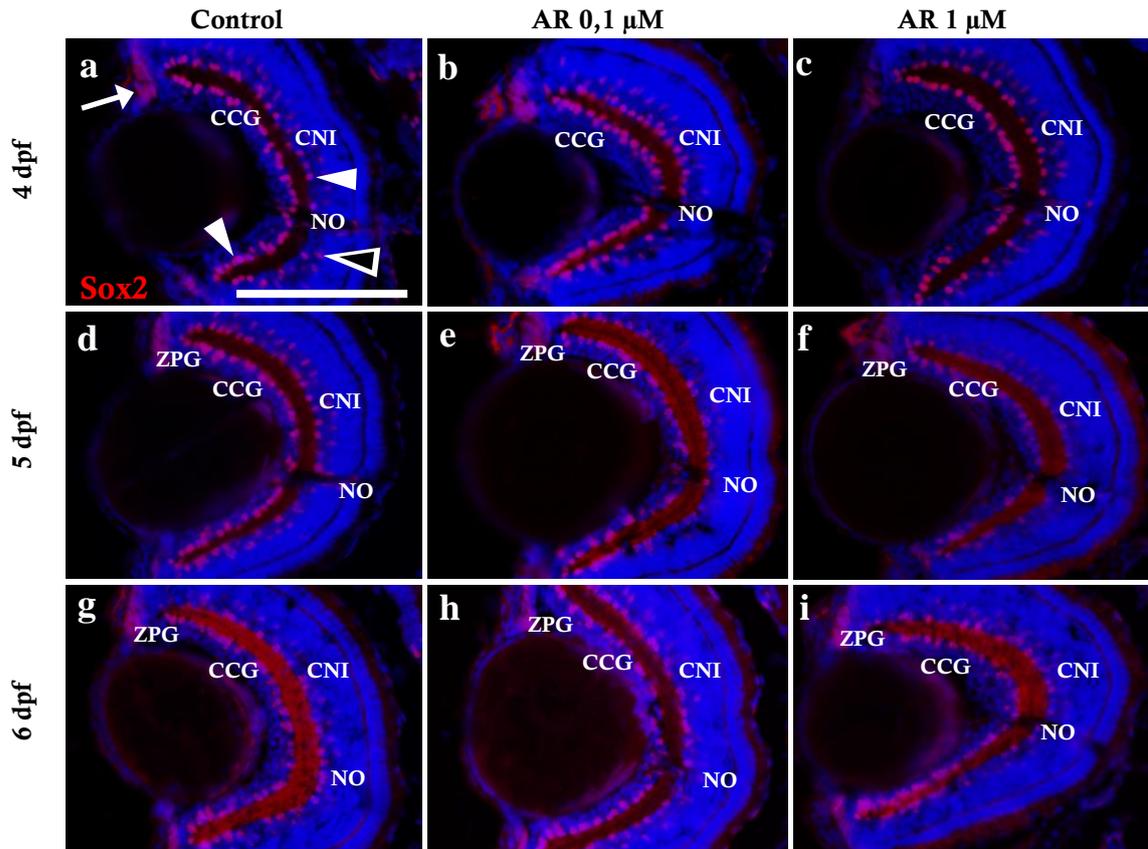


Figura 20: Distribución de Sox2 en la retina de animales control y tratados con AR. En los controles de 4 dpf, las células Sox2 positivas se localizan en la ZPG (flecha en **a**), en la parte escleral de la CCG y la parte vitreal de la CNI (cabezas de flecha en **a**), en el centro de la CNI (cabeza de flecha hueca en **a**) y en el NO. En los tratados con AR el patrón de marcaje es similar. AR: ácido retinoico, CCG: capa de las células ganglionares, CNI: capa nuclear interna, dpf: días postfecundación, NO: nervio óptico, ZPG: zona periférica germinal. Barra de escala: 100 μ m.

Diferenciación celular

Para estudiar el posible efecto del exceso de AR sobre la diferenciación de las células que emergen de la ZPG durante los tratamientos, analizamos mediante inmunohistoquímica el patrón de distribución de las proteínas CR y GS, que marcan neuronas y las células de Müller respectivamente.

CR

A los 4 dpf (Fig. 21 a, b, c), el marcaje para CR se localiza en el citoplasma de células de la CCG, así como en células de la CNI, más intensamente en las situadas en la parte vitreal de esta capa. También hay marcaje para CR en la CPI, en la capa de las fibras del nervio óptico (CFNO) y en axones del nervio óptico.

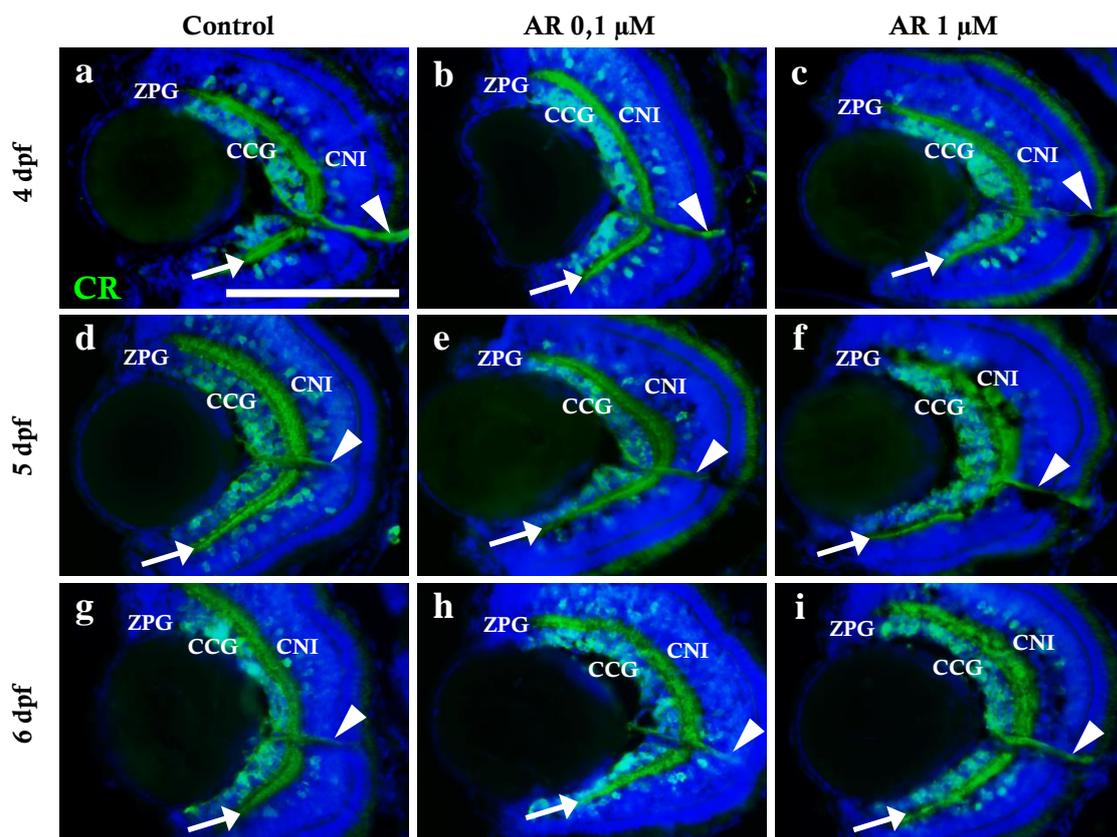


Figura 21: Distribución de CR en la retina de animales control y tratados con AR. Tanto en los animales control como en los tratados con AR, las células CR positivas se encuentran en la CCG y la CNI. También hay marcaje en la CPI (flecha en a-i) y en el nervio óptico (cabeza de flecha en a-i). AR: ácido retinoico, CCG: capa de las células ganglionares, CNI: capa nuclear interna, CPI: capa plexiforme interna, dpf: días postfecundación, ZPG: zona periférica germinal. Barra de escala: 100 μ m.

La distribución del marcaje es similar en los animales tratados con AR respecto a los controles, pero en los tratados con AR 1 μ M hay menor densidad de células CR positivas que en los controles (Fig. 23 e).

A los 5 dpf (Fig. 21 d, e, f), el patrón de marcaje para CR no se modifica, y hay células positivas para CR en las regiones de la CCG y la CNI adyacentes a la ZPG, igual que ocurre a los 6 dpf (Fig. 21 g, h, i). No obstante, la densidad de células positivas para CR en los animales tratados es menor que en los controles en estas dos edades (Fig. 23 e).

GS

A los 4 dpf (Fig. 22 a, b, c), el marcaje para GS se localiza en las células de Müller, que están completamente diferenciadas. Presentan sus núcleos situados en el centro de la CNI y los procesos celulares recorren las capas de la retina de forma radial. No hay diferencias en el patrón de marcaje para esta proteína entre los animales control y los tratados con AR, al igual que tampoco hay diferencias en el número de células de Müller marcadas (Fig. 23 f).

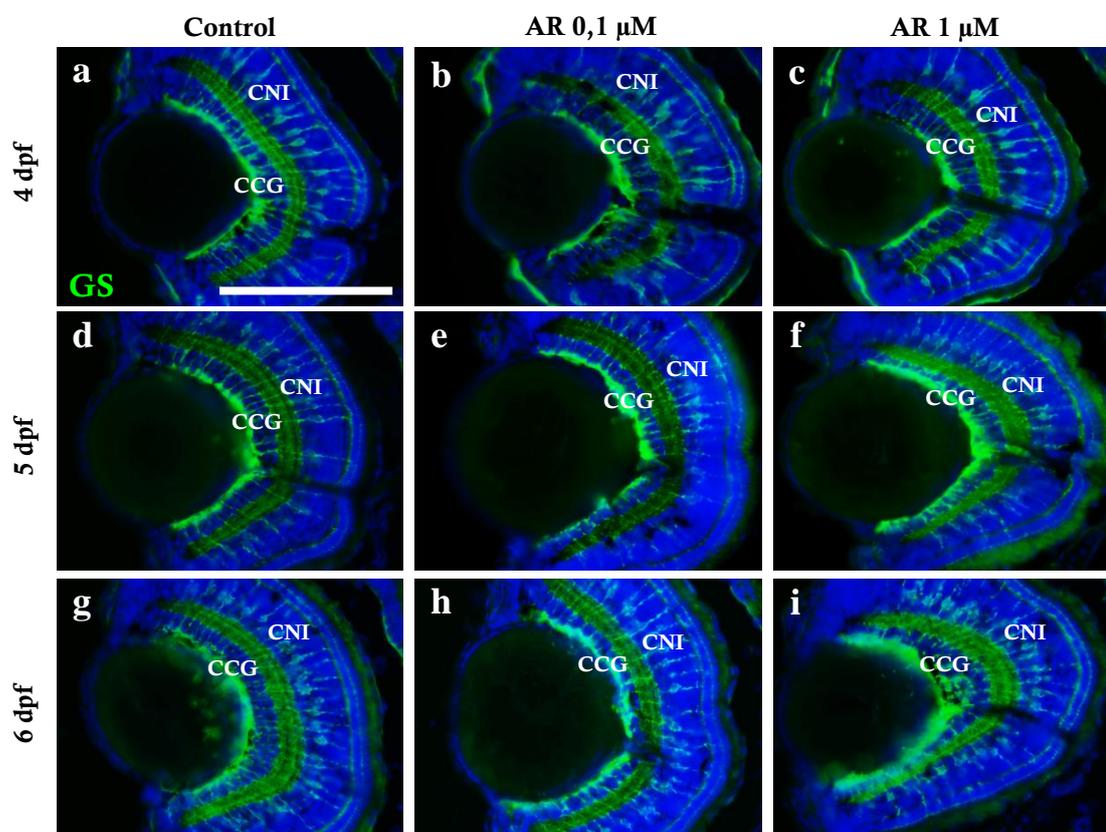
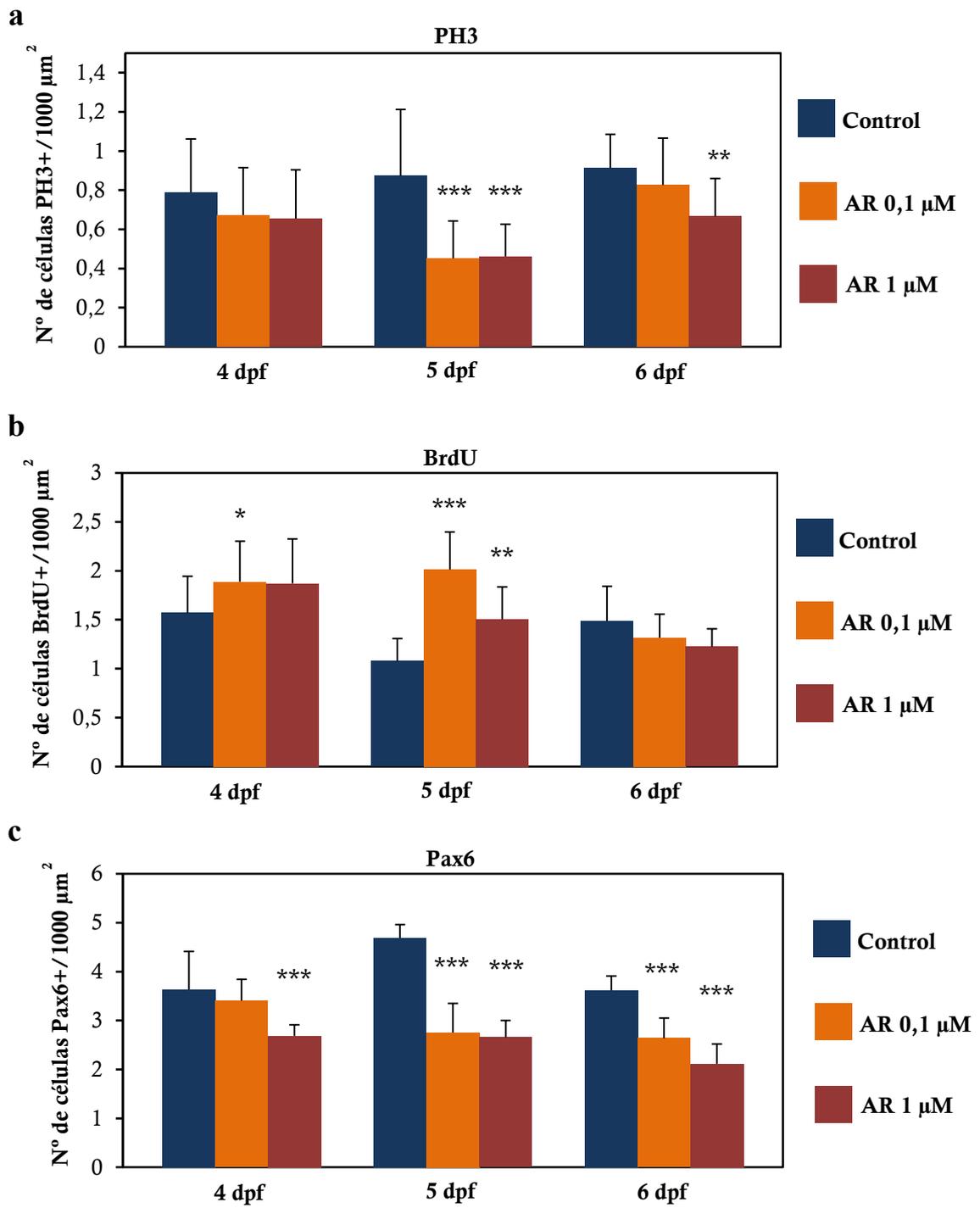


Figura 22: Distribución de GS en retinas de animales control y tratados con AR. El marcaje para GS se localiza en las células de Müller. AR: ácido retinoico, CCG: capa de las células ganglionares, CNI: capa nuclear interna, dpf: días postfecundación. Barra de escala: 100 μ m.

A los 5 dpf (Fig. 22 d, e, f), el patrón de distribución del marcaje para GS se mantiene sin cambios en los distintos grupos experimentales, aunque en los animales tratados con AR 0,1 μ M hay menor densidad de células de Müller, positivas para GS, que en los animales control (Fig. 23 f).

A los 6 dpf (Fig. 22 g, h, i), el marcaje para GS permanece sin modificaciones, y únicamente aumenta la densidad relativa de células de Müller en los animales tratados con AR 1 μ M respecto a los controles (Fig. 23 f).



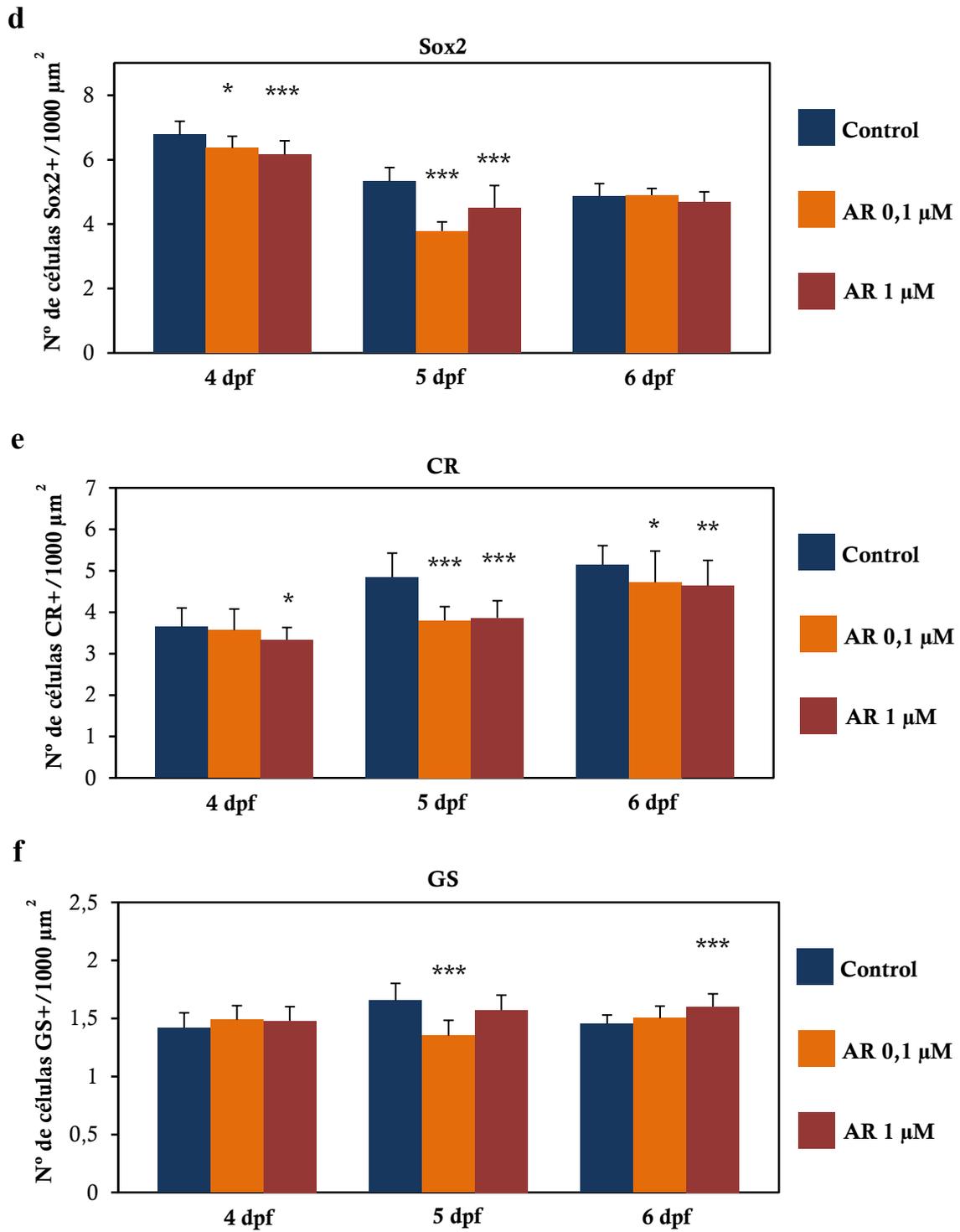


Figura 23: Representaciones gráficas que muestran los resultados de los conteos de las células positivas para PH3 (a), BrdU (b), Pax6 (c), Sox2 (d), CR (e) y GS (f) en las retinas de animales control y tratados con AR. AR: ácido retinoico; dpf: días postfecundación. *: $P < 0.05$; **: $0.05 > P > 0.001$; ***: $P < 0.001$.

Nervio óptico

Para estudiar los posibles efectos del tratamiento con AR sobre el crecimiento de los axones jóvenes del nervio óptico hemos realizado la técnica inmunohistoquímica *in toto* con el anticuerpo Zn8. Este anticuerpo marca la Neurolina, una proteína que, en el sistema visual del pez cebra, se encuentra en la membrana plasmática de los axones en crecimiento de las células ganglionares de la retina. Además, para obtener más información sobre las posibles alteraciones en el nervio óptico, realizamos la técnica inmunohistoquímica doble frente a Neurolina y Pax2 en secciones de tejido.

Neurolina

La técnica inmunohistoquímica *in toto* con el anticuerpo Zn-8 muestra que, a los 4 dpf (Fig. 24 a, b, c), el marcaje para Neurolina se encuentra de forma muy débil en la CCG, de manera más nítida en la CFNO, y en axones del nervio óptico que cruzan el quiasma e inervan el techo óptico contralateral de cada ojo. El marcaje es similar en los animales control y en los tratados con AR.

A los 5 dpf, en los animales control (Fig. 24 d) observamos el mismo patrón de marcaje que a los 4 dpf, aunque en la CCG apenas hay inmunorreactividad para Neurolina. Sin embargo, en los animales tratados con AR, no encontramos marcaje para esta proteína ni en la retina ni en el nervio óptico (Fig. 24 e, f).

A los 6 dpf, en los animales control (Fig. 24 g) observamos un marcaje similar para Neurolina. En los animales tratados con AR (Fig. 24 h, i) hay inmunorreactividad para esta proteína. El marcaje en la CFNO y el nervio óptico es similar al de los animales control de esta misma edad.

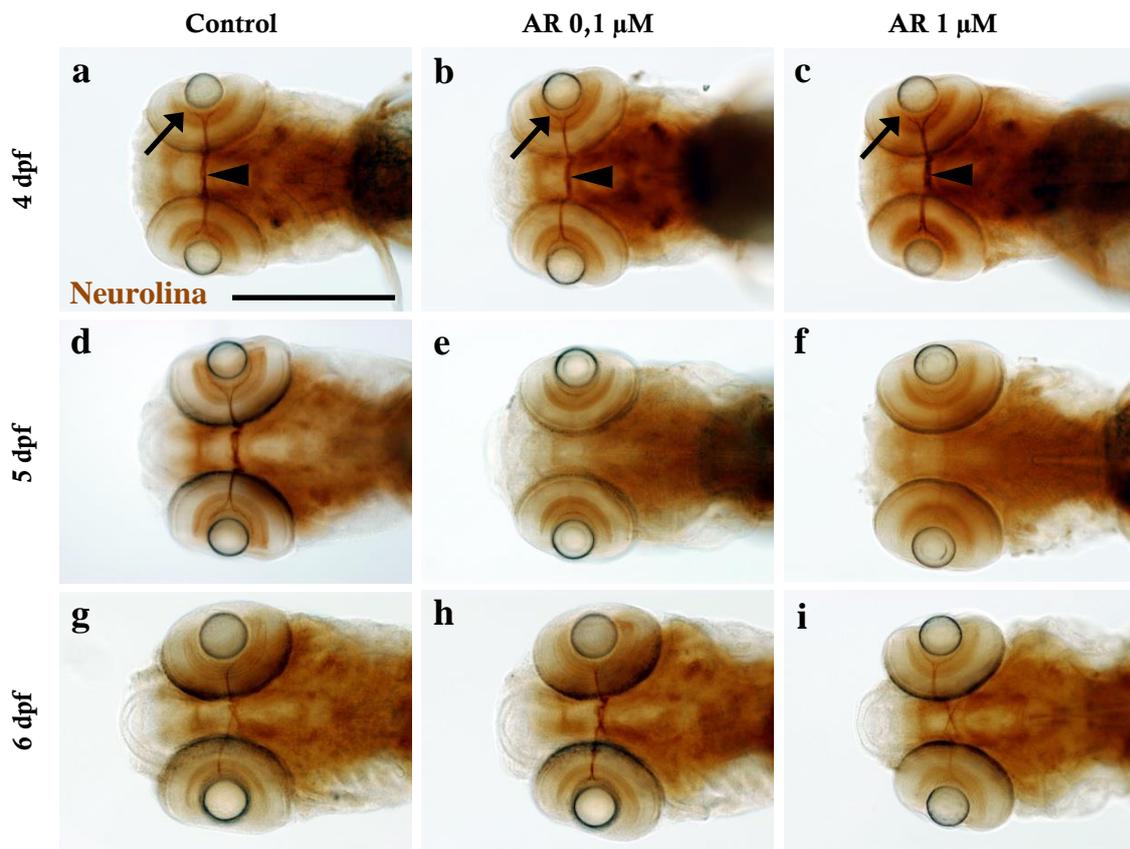


Figura 24: Distribución de Neurolinea observada mediante inmunohistoquímica *in toto* en animales control y tratados con AR. **a-c)** A los 4 dpf hay marcaje para Neurolinea en la CFNO (flecha) y en el nervio óptico (cabeza de flecha). **d-f)** A los 5 dpf, en los controles (**d**) el marcaje es similar al de los 4 dpf, pero en los tratados con AR (**e, f**) no detectamos inmunorreactividad para Neurolinea. **g-h)** A los 6 dpf, el marcaje para Neurolinea es igual en los controles y en los tratados con AR. AR: ácido retinoico, dpf: días postfecundación. Barra de escala: 200 μ m.

Neurolinea-Pax2

La realización de la técnica inmunohistoquímica doble para detectar las proteínas Neurolinea y Pax2 en secciones de tejido muestra que, a los 4 dpf, en los animales control (Fig. 25 a), la inmunorreactividad para Neurolinea se localiza en procesos celulares que se disponen de forma radial en toda la extensión de la CCG, en la CFNO, y en axones del nervio óptico que salen de la retina hacia el encéfalo. Asociadas a estos axones vemos células fusiformes positivas para Pax2. En los animales tratados con AR 0,1 μ M o 1 μ M (Fig. 25 b, c) no encontramos diferencias respecto a los controles en el marcaje para Neurolinea. Sin embargo, además de las células fusiformes Pax2 positivas que forman

parte del nervio óptico, se ven algunas células fusiformes positivas situadas en el centro de la CNI, dispuestas en una hilera y cerca del nervio óptico. El marcaje para Pax2 en estas células es débil y se distinguen con más claridad en la parte ventral de la CNI que en la dorsal.

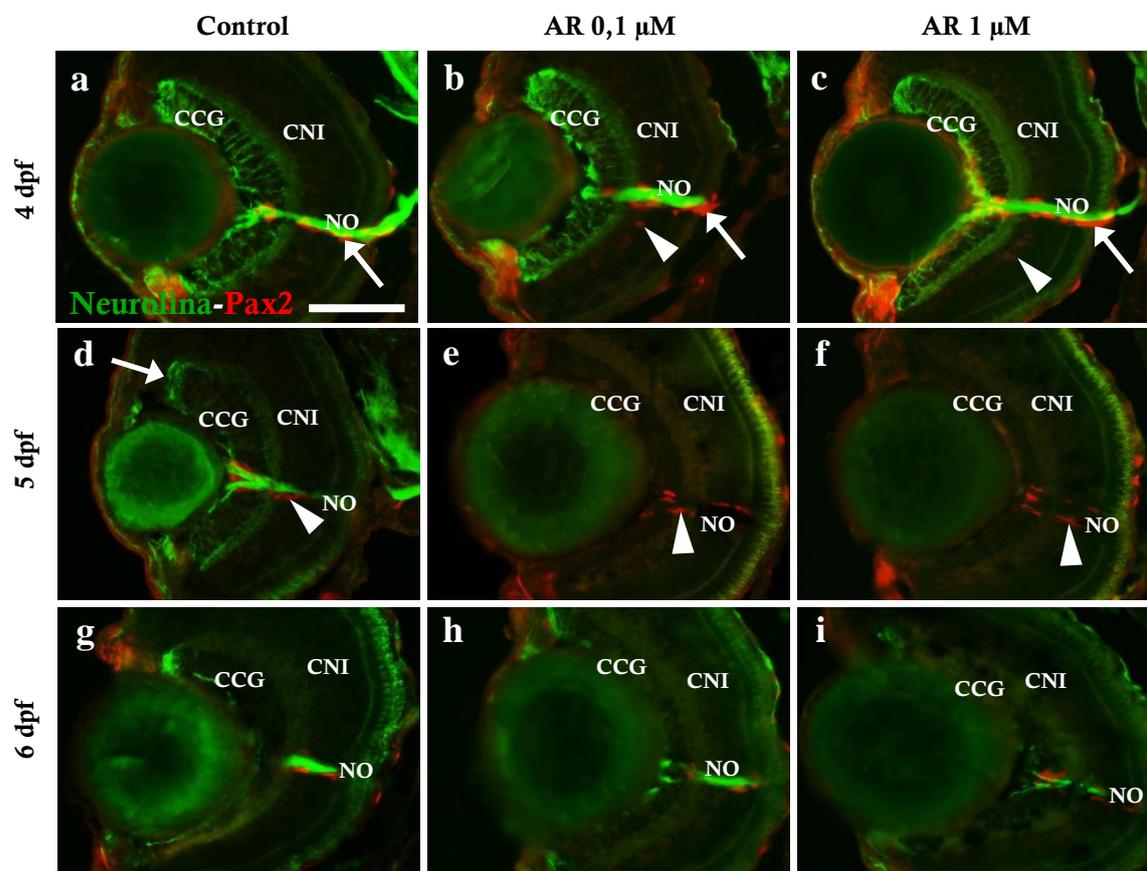


Figura 25: Secciones de retina con doble marcaje para Neurolinea y Pax2 en animales control y tratados con AR. **a-c)** A los 4 dpf, el marcaje para Neurolinea se localiza en la CCG y el NO, donde hay células positivas para Pax2 (flecha). En los tratados con AR, además hay células Pax2 positivas en el centro de la CNI (cabeza de flecha). **d-f)** A los 5 dpf, en los controles, el marcaje para Neurolinea se localiza en los márgenes de la CCG (flecha) y en el NO, al que se asocian células fusiformes Pax2 positivas (cabeza de flecha). En los tratados con AR no hay marcaje para Neurolinea y las únicas células Pax2 positivas están en el nervio óptico (cabezas de flecha). **g-i)** A los 6 dpf, tanto en los controles como en los tratados con AR el patrón de marcaje es similar. AR: ácido retinoico, CCG: capa de las células ganglionares, CNI: capa nuclear interna, dpf: días postfecundación, NO: nervio óptico. Barra de escala: 50 μ m.

En los animales control de 5 dpf (Fig. 25 d) el marcaje para Neurolina se localiza en los márgenes de la CCG, dónde se encuentran las células ganglionares más jóvenes, que se han formado en la ZPG. Estas células emiten sus axones hacia la CFNO, de manera que solamente estos axones jóvenes que se incorporan al nervio óptico presentan marcaje para Neurolina. Las células fusiformes Pax2 positivas están asociadas al nervio óptico. En los animales tratados con AR (Fig. 25 e, f) no hay inmunorreactividad para Neurolina. Hemos visto marcaje para Pax2 en células del nervio óptico, pero no en la CNI.

A los 6 dpf (Fig. 25 g), en los animales control el patrón de marcaje para Neurolina y Pax2 es similar al descrito para 5 dpf. En los animales tratados con AR (Fig. 25 h, i), hay marcaje para Neurolina en las células ganglionares marginales y en sus axones, que viajan por la CFNO y el nervio óptico. El marcaje para Pax2 se encuentra sólo en las células fusiformes del nervio óptico.

En cuanto al marcaje para Neurolina y Pax2 en el resto del nervio óptico, tanto en los animales control como en los tratados con AR, encontramos que a los 4 dpf (Fig. 26 a, b, c) los axones positivos para Neurolina que salen de ambas retinas se cruzan formando el quiasma óptico y ascienden por el encéfalo hasta las diferentes regiones que inervan. Asociadas a estos axones hay células de morfología alargada que son Pax2 positivas.

A los 5 dpf, en los animales control el patrón de marcaje para ambas proteínas es igual al de 4 dpf (Fig. 26 d). Sin embargo, en los tratados con AR 0,1 μ M o 1 μ M (Fig. 26 e, f), no detectamos inmunorreactividad para Neurolina.

A los 6 dpf, en los tres grupos experimentales (Fig. 26 g, h, i) el marcaje para Neurolina y Pax2 es similar. En este caso, también se produce la misma recuperación en el marcaje para Neurolina que en la retina.

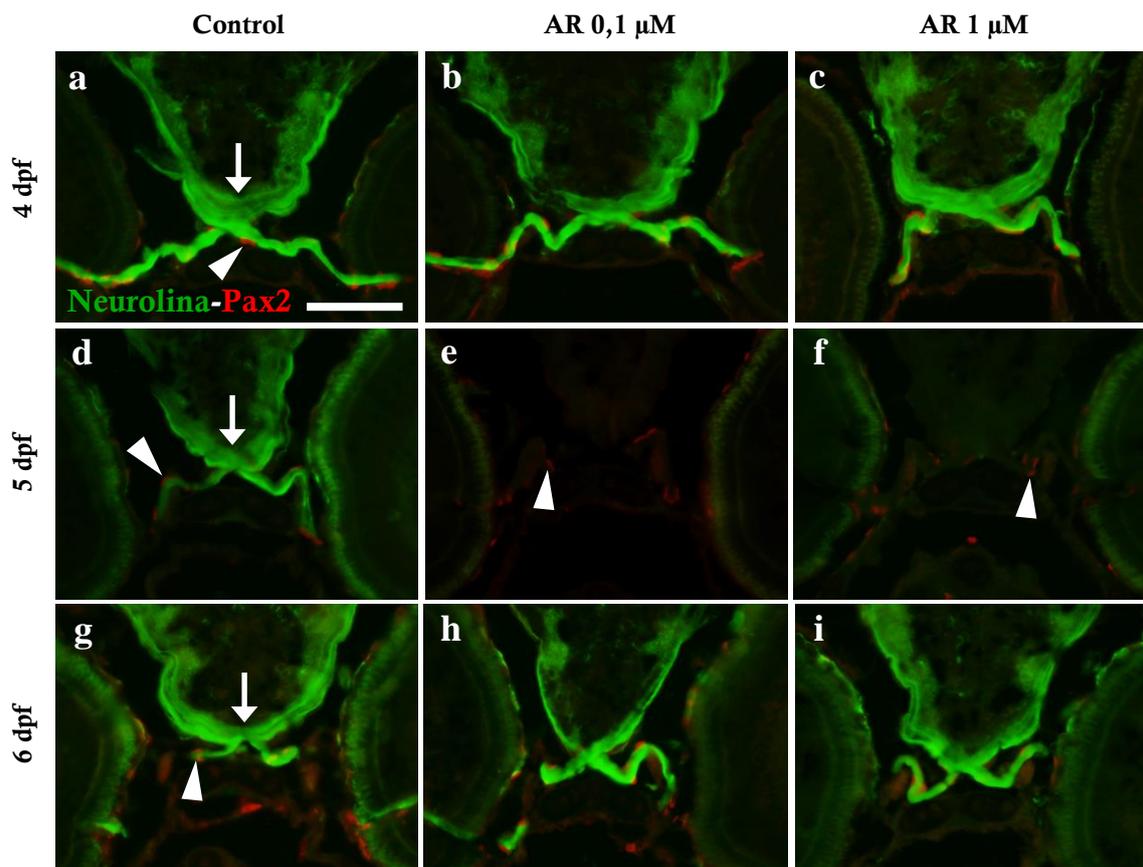


Figura 26 : Distribución de Neurolina y Pax2 en el nervio óptico de animales control y tratados con AR. **a-c)** Desde los 4 dpf, los axones Neurolina positivos forman el quiasma (flecha en **a, d, g**) y están asociados a células Pax2 positivas (cabeza de flecha en **a, d, g**). **d-f)** A los 5 dpf, en los animales tratados con AR no hay marcaje para Neurolina, pero sí para Pax2 (cabeza de flecha en **e, f**). **g- i)** A los 6 dpf no hay diferencias en el marcaje para Neurolina entre los controles y los tratados. AR: ácido retinoico, dpf: días postfecundación. Barra de escala: 50 μ m.

Neurolina-a

Tras observar modificaciones en el marcaje de la proteína Neurolina mediante la inmunohistoquímica con el anticuerpo Zn-8, decidimos sintetizar las ribosondas de los genes parálogos que codifican para esta proteína en el pez cebra, *neurolina-a* y *neurolina-b*, para analizar mediante hibridación *in situ* si se producían alteraciones en sus patrones de expresión tras el tratamiento con AR.

A los 4 dpf (Fig. 27 a, b, c), la expresión de *neurolina-a* se localiza en la zona marginal de la CCG, donde el marcaje es débil y forma un anillo en los tres grupos

experimentales. El mismo patrón de marcaje se observa a los 5 y 6 dpf (Fig. 27 d-i) sin que haya diferencias entre los controles y los tratados con AR 0,1 o 1 μ M.

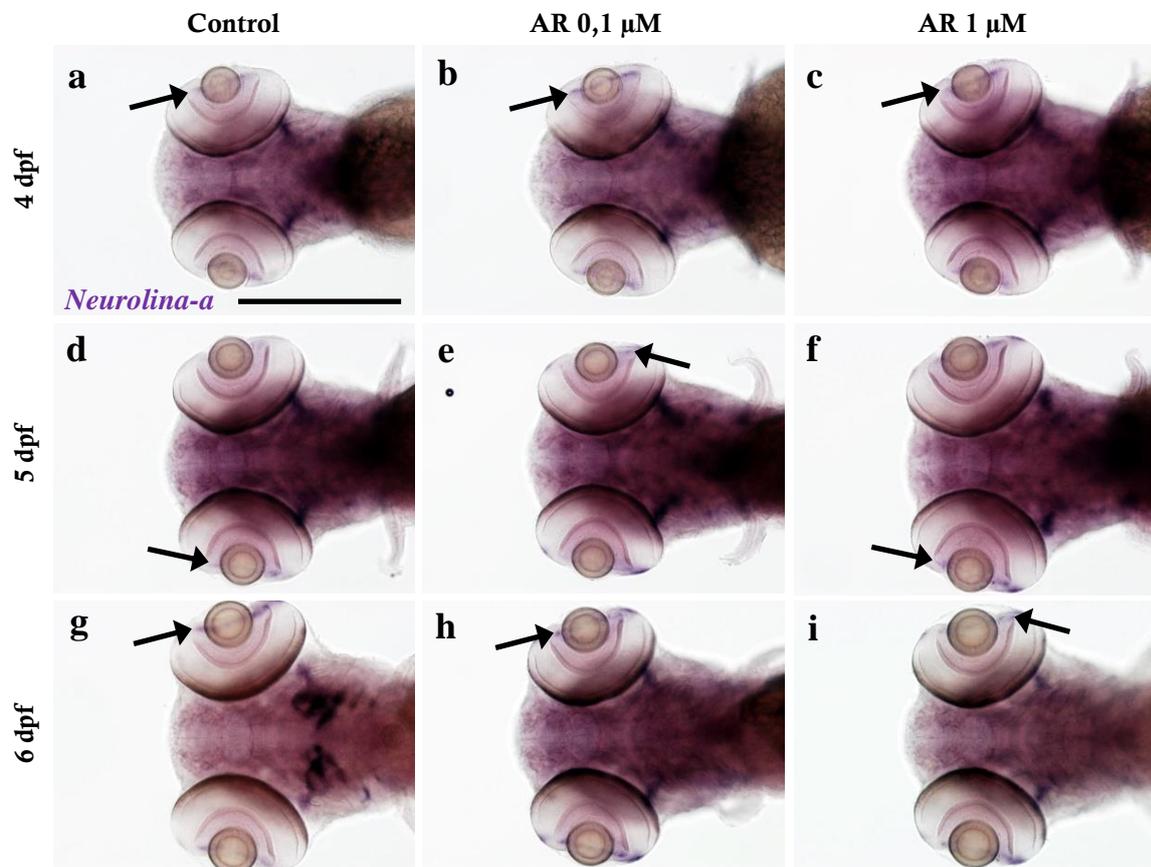


Figura 27: Expresión de *neuroлина-a* en animales control y tratados con AR. Vistas ventrales. La expresión de *neuroлина-a* se localiza en la región marginal de la CCG (flecha). AR: ácido retinoico. CCG: capa de las células ganglionares, dpf: días postfecundación. Barra de escala: 200 μ m.

Neuroлина-b

En los animales control de 4 dpf (Fig. 28 a), la expresión de *neuroлина-b* se localiza de forma casi inapreciable en la región marginal de la CCG. En los animales tratados con AR (Fig. 28 b, c) hay marcaje para este gen en la misma zona, aunque es más intenso y se distingue con claridad. A los 5 dpf (Fig. 28 d, e, f), el marcaje para *neuroлина-b* se ve en la región marginal de la CCG, y de manera más intensa en los tratados que en los controles. A los 6 dpf, mientras que en los animales control y los tratados con AR 0,1 μ M (Fig. 28 g, h) la expresión de *neuroлина-b* se localiza con nitidez en la región marginal de la CCG, en los animales tratados con AR 1 μ M apenas se aprecia el marcaje para este gen (Fig. 28 i).

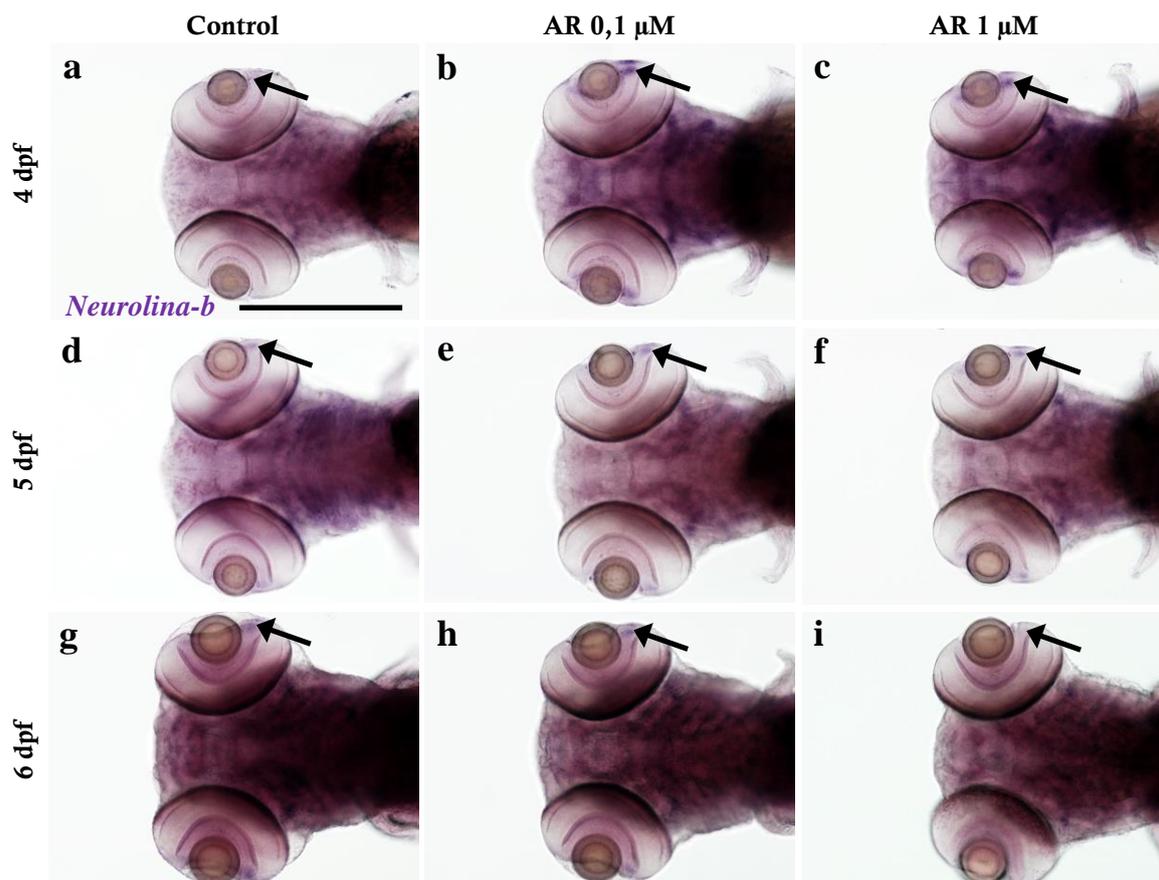


Figura 28: Expresión de *neurolina-b* en animales control y tratados con AR. Vistas ventrales. **a-c)** La expresión de *neurolina-b* se localiza de manera muy débil en los márgenes de la CCG en los controles de 4 dpf (flecha en **a**) y más intensamente en los tratados (flecha en **b, c**). **d-f)** A los 5 dpf el marcaje en los márgenes de la CCG (flecha en **d, e, f**) es similar en los tres grupos experimentales. **g-i)** A los 6 dpf, la expresión de *neurolina-b* se encuentra en la región marginal de la CCG, aunque es muy débil en los tratados con AR 1 μM (flecha en **g, h, i**). AR: ácido retinoico. CCG: capa de las células ganglionares, dpf: días postfecundación. Barra de escala: 200 μm .

Pax2a

Tras observar que en los animales tratados con AR 0,1 y 1 μM detectábamos mediante inmunohistoquímica algunas células positivas para Pax2 dentro de la CNI de la retina, realizamos hibridación *in situ* para determinar si el tratamiento con AR estimulaba la expresión del gen *Pax2a*.

En todos los grupos experimentales el marcaje para el ARNm de *pax2a* se encuentra exclusivamente en células que forman parte del nervio óptico, y no encontramos diferencias entre animales control y tratados con AR (Fig. 29).

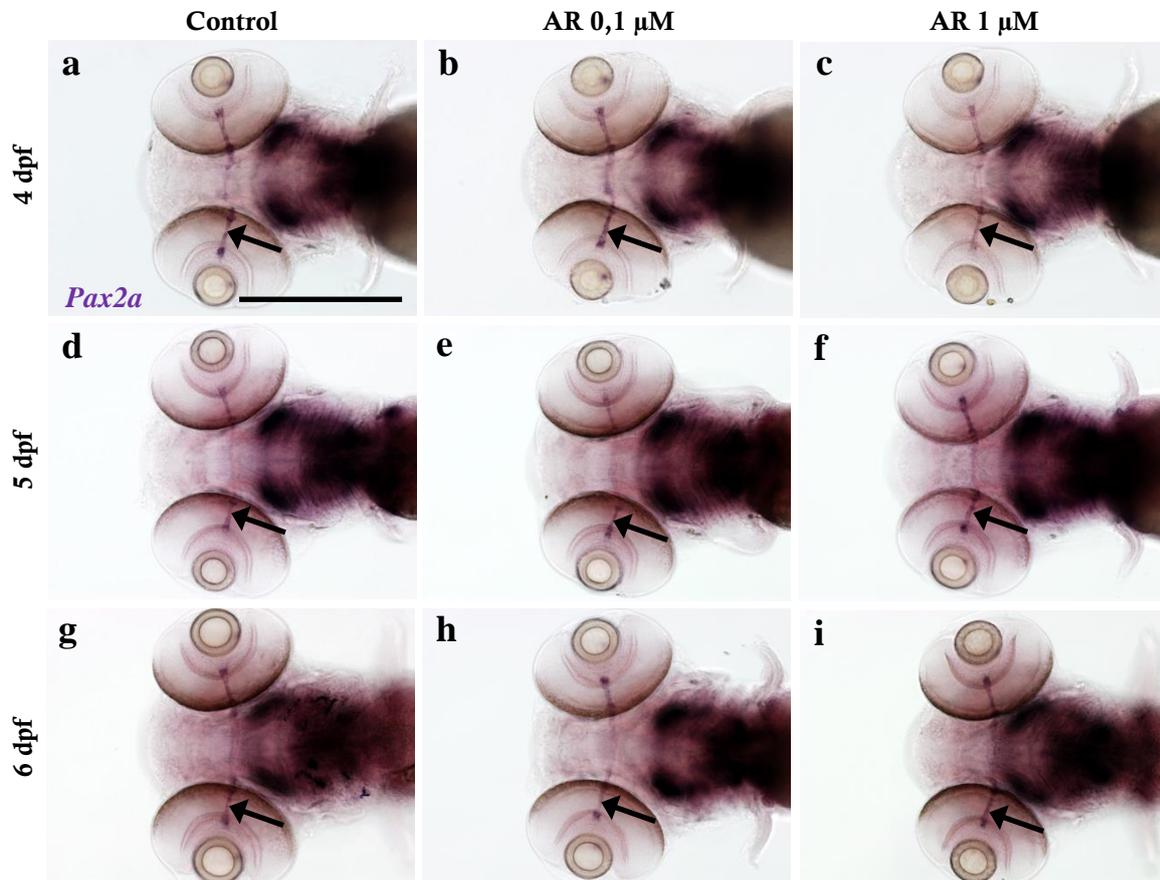


Figura 29: Expresión de *pax2a* en animales control y tratados con AR. Vistas ventrales. En todos los grupos la expresión de *pax2a* se localiza en células del nervio óptico (flecha en a-i). AR: ácido retinoico, dpf: días postfecundación. Barra de escala: 200 μm.

Identidad de las células Pax2 positivas.

Teniendo en cuenta la morfología alargada de los núcleos Pax2 positivos que encontramos en la retina de los animales tratados con AR de 4 dpf, su posición en la parte central de la CNI y su orientación radial, pensamos que podría tratarse de células de Müller que en respuesta al AR habrían activado la producción de esta proteína. Para confirmarlo realizamos una inmunohistoquímica doble para Pax2 y GS. Hemos comprobado que el débil marcaje para Pax2 se encuentra en el núcleo de las células de Müller GS positivas, próximas al nervio óptico (Fig. 30).

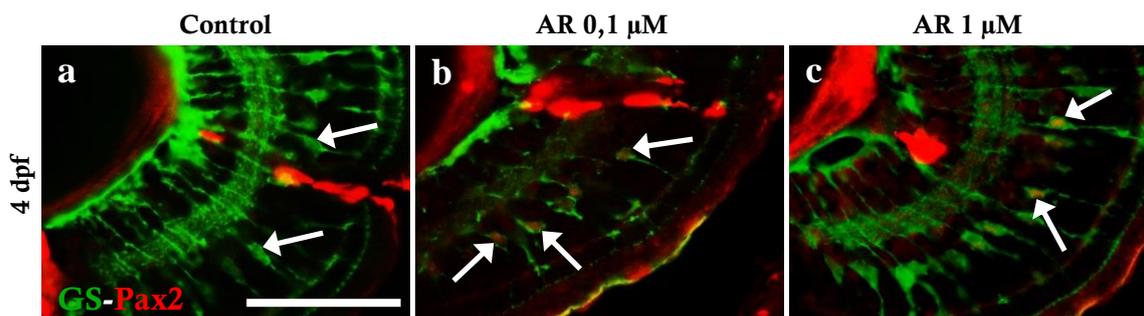


Figura 30: Distribución de Pax2 y GS en retinas de animales control y tratados con AR de 4 dpf. **a)** En los controles, las células de Müller no son Pax2 positivas (flechas en **a**). **b, c)** En los tratados con AR el núcleo de las células de Müller es positivo para Pax2 (flechas en **b, c**). AR: ácido retinoico, dpf: días postfecundación. Barra de escala: 50 μ m.

Slit-2

La ausencia de la inmunorreactividad para Neurolina que se produce transitoriamente a los 5 dpf en los animales tratados con AR, sugiere que puede haber un fallo, también transitorio, en la guía de axones jóvenes desde la retina hasta el nervio óptico. De entre las moléculas y receptores que controlan los procesos de guía axonal, analizamos la expresión de *slit-2*.

El marcaje para *slit-2* en los animales control de 4 dpf (Fig. 31 a) se localiza en la ZPG, así como en la CPI, la CCG y la región vitreal de la CNI, mientras que en los animales tratados con AR (Fig. 31 b, c) no hay marcaje en la ZPG, aunque sí en las otras regiones mencionadas de la retina. A los 5 dpf (Fig. 31 d, e, f) el patrón de marcaje es similar al observado a los 4 dpf tanto en los controles como en los tratados. A los 6 dpf, en los animales control (Fig. 31 g) no hay cambios en el marcaje respecto a los dos estadios anteriores, pero en los tratados con AR (Fig. 31 h, i) se ve el marcaje para *slit-2* en la ZPG, de manera que no hay diferencias entre tratados y controles.

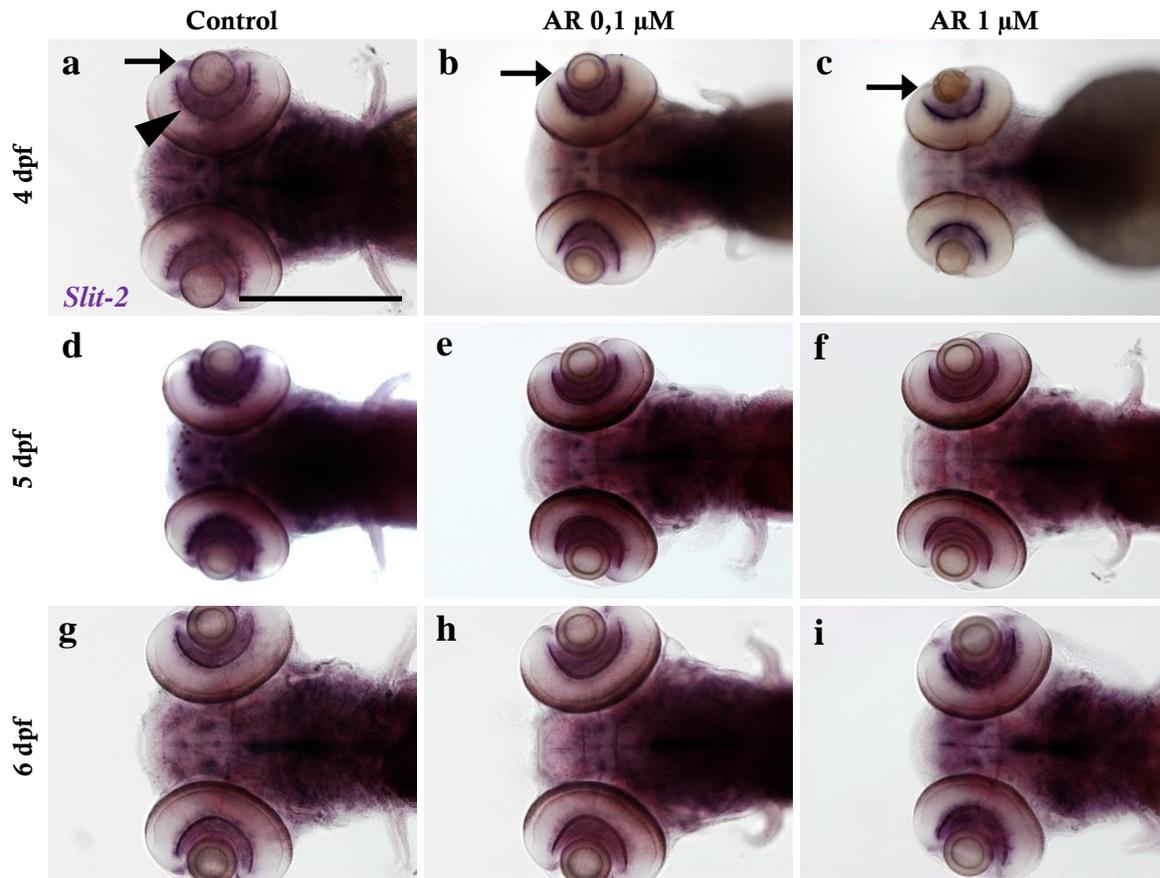


Figura 31: Expresión de *slit2* en animales control y tratados con AR. Vistas ventrales. **a-c)** A los 4 dpf, la expresión de *slit2* en los controles se localiza en la ZPG (flecha en **a**), en la CPI, la CCG y la región vitreal de la CNI (cabeza de flecha en **a**). En los tratados con AR no hay marcaje para *slit2* en la ZPG (flecha en **b**, **c**) **d-f)** A los 5 dpf, el marcaje para *slit2* es similar al observado a los 4 dpf tanto en los controles como en los tratados. **g-i)** A los 6 dpf, en los animales tratados hay marcaje para *slit2* en la ZPG, sin que haya diferencias respecto a los controles. AR: ácido retinoico, CCG: capa de las células ganglionares, CNI: capa nuclear interna, CPI: capa plexiforme interna, dpf: días postfecundación, ZPG: zona periférica germinal. Barra de escala: 200 μ m.

Efectos del tratamiento con ácido retinoico entre las 24 y 48 hpf

Morfología

La exposición de embriones de pez cebra a AR entre las 24 y las 48 hpf produce una serie de alteraciones morfológicas, evidentes bajo lupa binocular. A las 48 hpf (Fig. 32 a, b, c) los ejemplares tratados con la concentración de AR 0,1 μM (Fig. 32 b) tienen apariencia normal, pero los tratados con AR 1 μM (Fig. 32 c) presentan edemas pericárdicos y dentro del vitelo, así como ojos aparentemente de menor tamaño que los embriones control no tratados. A los 3 dpf (Fig. 32 d, e, f), los animales tratados con AR presentan edemas pericárdicos prominentes. Además, el tamaño del ojo y de la cabeza parece menor que en los controles. A los 5 dpf (Fig. 32 g, h, i) estas alteraciones persisten, e incluso se hacen más evidentes, especialmente en los ejemplares tratados con la concentración de AR 1 μM .

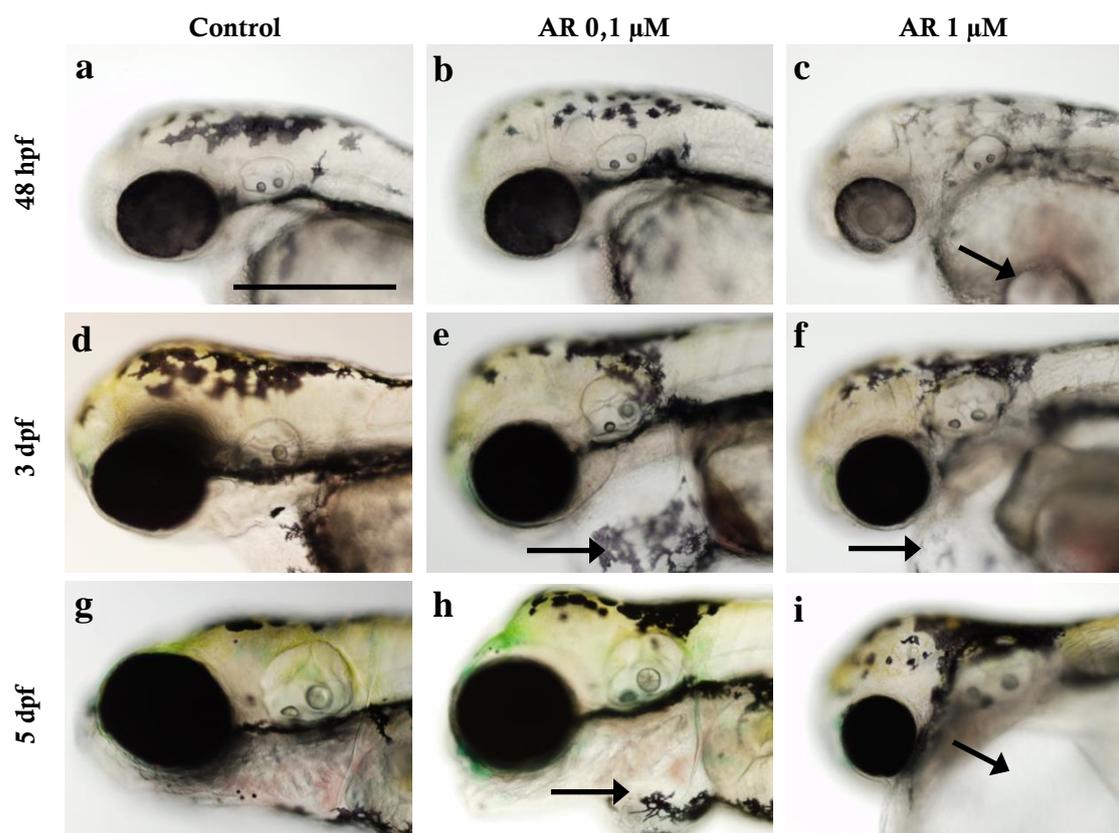


Figura 32: Vistas laterales de animales vivos control y tratados con AR de 48 hpf, 3 y 5 dpf. El tratamiento produce edemas pericárdicos (flecha en c, e, f, h, i) y reducción del tamaño de la cabeza y del ojo. AR: ácido retinoico; dpf: días postfecundación; hpf: horas postfecundación. Barra de escala: 200 μm .

Citoarquitectura y tamaño de la retina

Para estudiar si la histología de la retina se encontraba afectada por la exposición a AR, realizamos secciones semifinas de los ojos de los diferentes grupos experimentales. La tinción de las secciones con azul de toluidina nos permitió estudiar con claridad la organización de las células y de las regiones donde hay neuropilo.

A las 48 hpf (Fig. 33 a, b, c), la organización histológica de la retina es similar en los embriones control no tratados que en los tratados con ambas concentraciones de AR, y no hay alteraciones morfológicas. Las diferentes capas de la retina aún no están bien establecidas, pero se distinguen con claridad la morfología de la retina y la del cristalino. El nervio óptico también es visible. No obstante, en el grupo tratado con AR 1 μ M (Fig. 33 c), el tallo óptico persiste a las 48 hpf y aún se encuentra unido a la retina. En este estadio, los núcleos celulares son alargados, orientados de forma radial en toda la retina, y puede verse el citoplasma teñido débilmente entre ellos. En la retina de los embriones tratados con AR 1 μ M se identifican algunos núcleos picnóticos.

A los 3 dpf (Fig. 33 d, e, f), se pueden distinguir las diferentes capas de la retina tanto en los animales control como en los tratados con AR, de manera que se diferencian la ZPG, la CCG, la CPI, la CNI, la CPE, la CNE y la CF. En los animales control (Fig. 33 d) y en los tratados con AR 0,1 μ M (Fig. 33 e), el citoplasma de las células se distingue débilmente, y los núcleos presentan una apariencia compacta. Sin embargo, en la retina de los animales tratados con AR 1 μ M (Fig. 33 f) los núcleos presentan una apariencia menos compacta y se ve más citoplasma celular, teñido débilmente, de forma similar a como ocurre en los embriones de 48 hpf. También hay núcleos picnóticos en las retinas de los ejemplares expuestos a AR 1 μ M y algunos fagosomas. El tallo óptico ya no se encuentra unido a la retina en este estadio.

A los 5 dpf (Fig. 33 g, h, i), la retina de los animales control (Fig. 33 g) tiene organización histológica madura, similar a la de los adultos. Los animales tratados con AR 0,1 μ M (Fig. 33 h) presentan una histología similar a los controles, si bien la retina tiene una forma más redondeada. En los animales tratados con AR 1 μ M (Fig. 33 i) la retina es aún más redondeada y aparentemente de menor tamaño que la de los controles. Estos animales también presentan núcleos picnóticos y algunos espacios acelulares dentro de la retina.

Las mediciones del área de la retina en secciones de tejido confirman que la retina de los animales tratados con AR 1 μ M es menor que la de los controles en todos los

estadios analizados, mientras que los tratados con AR 0,1 μM sólo muestran esta reducción de tamaño a los 5 dpf (Fig. 33 j).

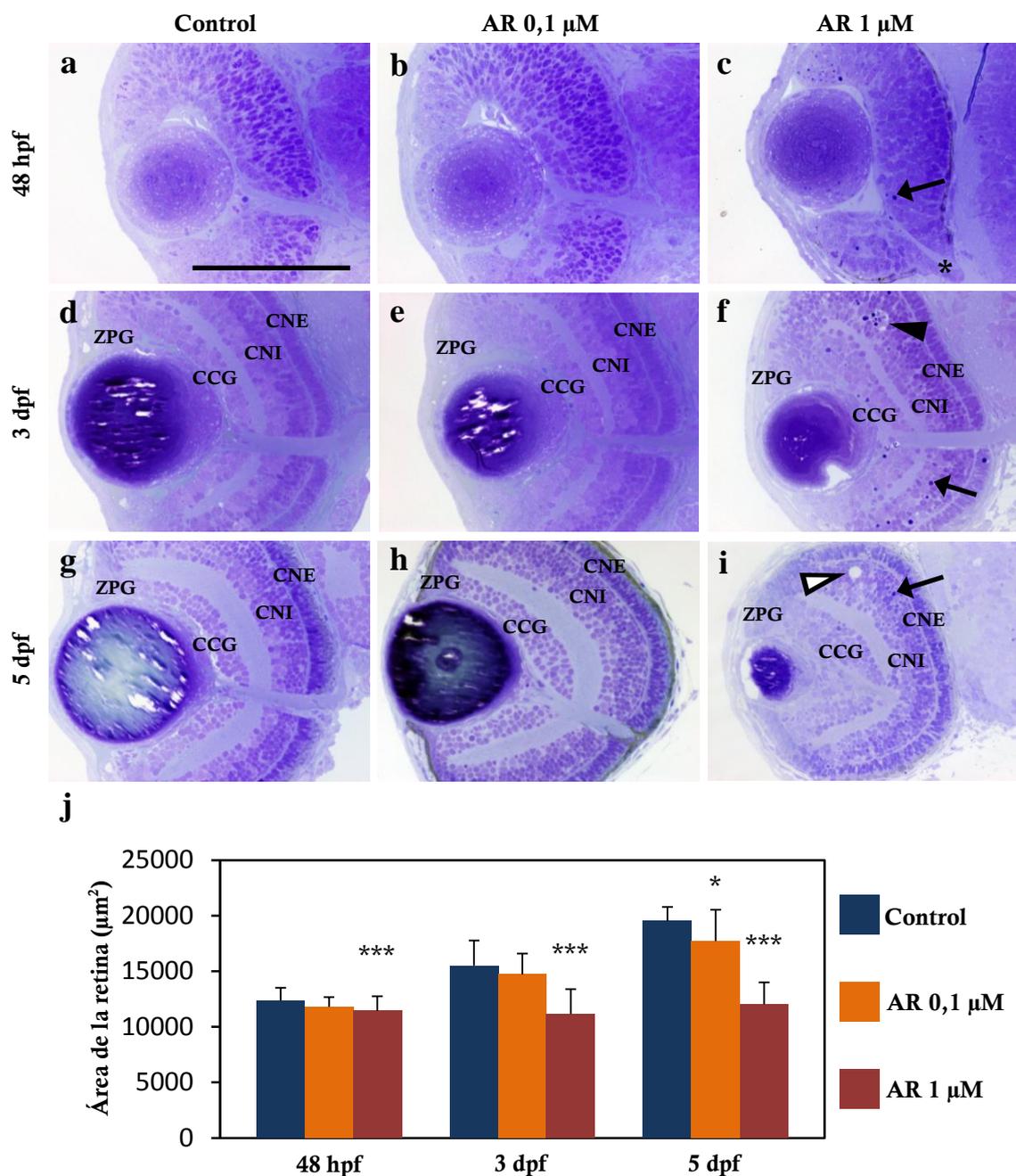


Figura 33: a-i) Secciones semifinas frontales de ojos de animales control y tratados con AR. Los ejemplares tratados con AR 1 μM tienen tallo óptico a las 48 hpf (asterisco en c) y presentan núcleos picnóticos en todos los estadios (flechas en c, f, i), fagosomas (cabeza de flecha en f) y espacios acelulares (cabeza de flecha hueca en i). **j)** Gráfico que muestra la reducción el tamaño de la retina de los animales tratados con AR. AR: ácido retinoico, CCG: capa de las células ganglionares, CNI: capa nuclear interna, CNE: capa nuclear externa, dpf: días postfecundación, hpf, horas postfecundación, ZPG: zona periférica germinal. Barra de escala: 100 μm . *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$.

Muerte celular: TUNEL

La presencia de núcleos picnóticos en las secciones semifinas de las retinas de los animales tratados con AR 1 μM , indica que hay células que están sufriendo muerte celular. Este proceso podría ser una causa importante del reducido tamaño de la retina de dichos animales. Para analizar si la muerte celular por apoptosis aumenta en los animales expuestos a AR, realizamos la técnica de TUNEL y comparamos el número de células apoptóticas entre los diferentes grupos. A las 48 hpf, el tamaño de la retina ya es menor en los embriones tratados con AR 1 μM que en los embriones control. Por ello incluimos también en el estudio de TUNEL embriones de 36 hpf, para determinar si durante el tratamiento, entre las 24 y las 48 hpf, ya se estaba produciendo un aumento de la apoptosis.

En los animales control no tratados, en todos los estadios analizados, las células TUNEL positivas son escasas (Fig. 34 a, d, g, j) y raramente se encuentran en las secciones utilizadas para realizar los conteos. En los animales tratados con AR 0,1 μM las células positivas para TUNEL son también escasas (Fig. 34 b, e, h, k). Sin embargo, en las retinas de los animales tratados con AR 1 μM detectamos numerosas células TUNEL positivas, que se distribuyen a lo largo de toda la retina, tanto en la ZPG como en la CCG y en la CNI, aunque no se encuentran en la CNE (Fig. 34 c, f, i, l).

Para comprobar si el aumento de la muerte celular por apoptosis era significativamente mayor en los animales tratados, realizamos los conteos de las células positivas para TUNEL en todos los grupos analizados. El conteo y posterior análisis estadístico de los datos nos muestra que el tratamiento con AR 1 μM produce un incremento del número de células apoptóticas en la retina a las 36 hpf, y a los 3 y 5 dpf, sin que haya diferencias respecto a los animales control a las 48 hpf (Fig. 34 m). Así pues, la microftalmia puede deberse, al menos en parte, a la apoptosis que tiene lugar en la retina.

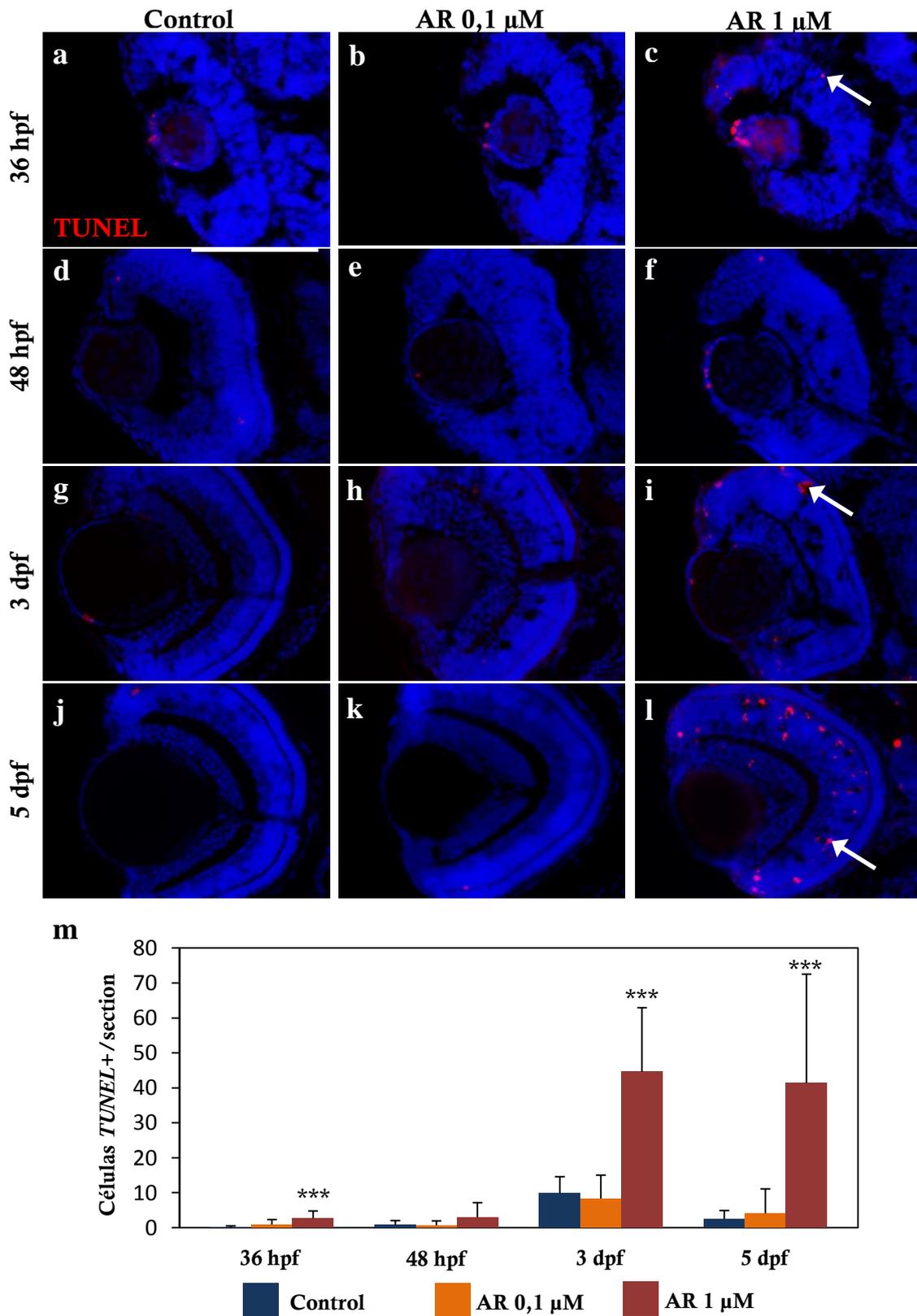


Figura 34: a-l) Secciones de retina procesadas para TUNEL para detectar las células apoptóticas en animales control y tratados con AR. El tratamiento con AR 1 μM produce un incremento del número de células apoptóticas (flechas en **c**, **i**, **l**), que son escasas en los controles. **m)** Cuantificación de las células TUNEL positivas. AR: ácido retinoico; dpf: días postfecundación, hpf: horas postfecundación. Barra de escala: 100 μm. ***: P<0.001.

Inyección del morfolino de p53

Para contrastar la hipótesis de que la apoptosis produce la microftalmia, intentamos inhibir la muerte celular durante los tratamientos y analizar si el fenotipo se mantenía. De ser así, debería haber otras causas que condujesen a la microftalmia, además de la apoptosis. Para ello inyectamos diferentes cantidades del morfolino de p53 (p53MO) en embriones en el estadio de 1-4 células, y después realizamos el tratamiento con AR a la concentración de 1 μM entre las 24 y las 48 hpf. Tras el tratamiento, dejamos que los animales se desarrollaran en condiciones normales hasta los 3 dpf, cuando la retina está casi completamente formada y la apoptosis es elevada. En este estadio medimos el tamaño de las retinas y analizamos la muerte celular mediante TUNEL.

La mayor parte de los embriones sobrevivieron a la inyección de las diferentes cantidades de p53MO y se desarrollaron correctamente hasta las 24 hpf. En ese estadio, algunos fueron tratados con AR 1 μM , mientras que otros siguieron su desarrollo normal y fueron utilizados como control. También incluimos como grupos experimentales animales no inyectados con p53MO, tratados y no tratados con AR.

Las mediciones del área de la retina de los animales no tratados con AR muestran que la inyección de p53MO no produce por sí sola una reducción del tamaño de la misma en los animales inyectados con 2 y 8 nl, mientras que en los inyectados con 4 nl sí la produce (Fig. 35). La apariencia bajo la lupa binocular de los embriones inyectados es idéntica a la de los no inyectados.

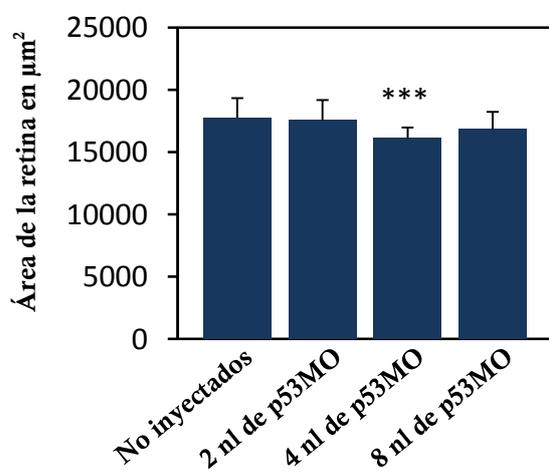


Figura 35: Gráfica que muestra el área de la retina de animales de 3 dpf no inyectados e inyectados con diferentes cantidades de p53MO, que no fueron tratados con AR. El grupo inyectado con 4 nl de p53 presenta una reducción del tamaño respecto al no inyectado. AR: ácido retinoico.

***: $P < 0.001$.

A continuación, estudiamos la retina de los animales tras la exposición a AR en los animales inyectados con las diferentes cantidades de morfolino y lo comparamos con la retina de los no inyectados. Al observar bajo la lupa los animales a los 3 dpf, vemos que el tratamiento con AR 1 μ M parece producir el mismo efecto en los animales inyectados que en los no inyectados con el morfolino, ya que la retina es de apariencia similar en ambos grupos.

Las mediciones del área de la retina de los diferentes grupos muestran que los animales tratados con AR presentan una reducción del tamaño de la misma respecto a los no tratados (Fig. 36). Además, hay diferencias en el tamaño de la retina entre los animales tratados con AR, de manera que los inyectados con 4 u 8 nl de p53MO presentan una retina menor que los no inyectados (Fig. 36).

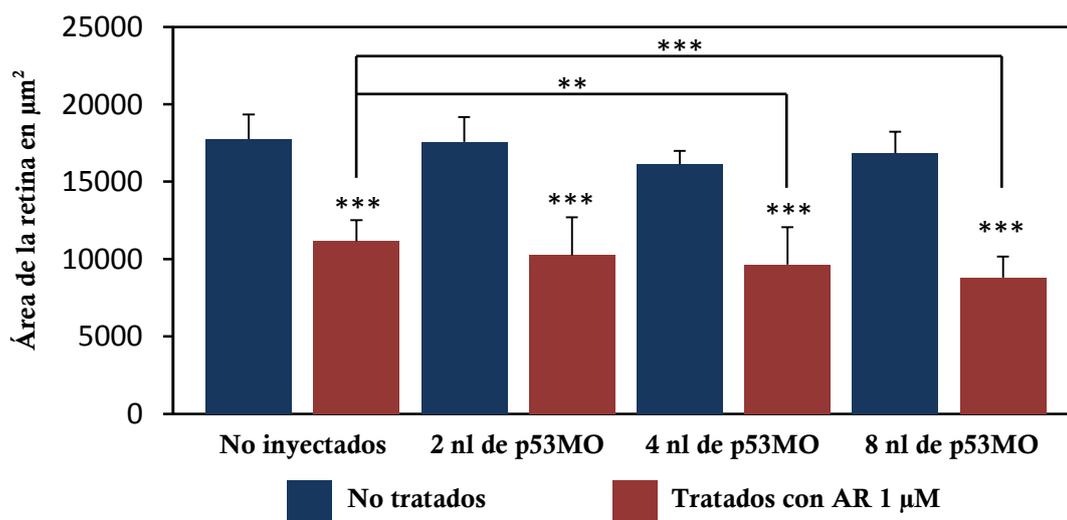


Figura 36: Mediciones del área de la retina de larvas de 3 dpf inyectadas y no inyectadas con diferentes cantidades de p53MO, que fueron tratadas o no tratadas con AR 1 μ M. En la gráfica se comparan por parejas los tratados con los no tratados. Además, entre los animales tratados con AR, se compara el tamaño de la retina entre los inyectados y no inyectados. AR: ácido retinoico. **: $0.05 > P > 0.001$; ***: $P < 0.001$.

Tras comprobar que la microftalmia se mantenía a pesar de la inyección del morfolino de p53, realizamos la técnica TUNEL en todos los grupos para analizar si realmente se estaba inhibiendo la apoptosis o no.

El patrón de marcaje mediante la técnica de TUNEL en los diferentes grupos muestra que en los animales no tratados con AR las células TUNEL positivas son escasas, tanto en los animales no inyectados (Fig. 37 a) como en los inyectados con las diferentes concentraciones de p53MO (Fig. 37 b, c, d). En cambio, en los animales tratados con AR las células apoptóticas son numerosas y se extienden por toda la retina a pesar de las inyecciones de morfolino (Fig. 37 e, f, g, h).

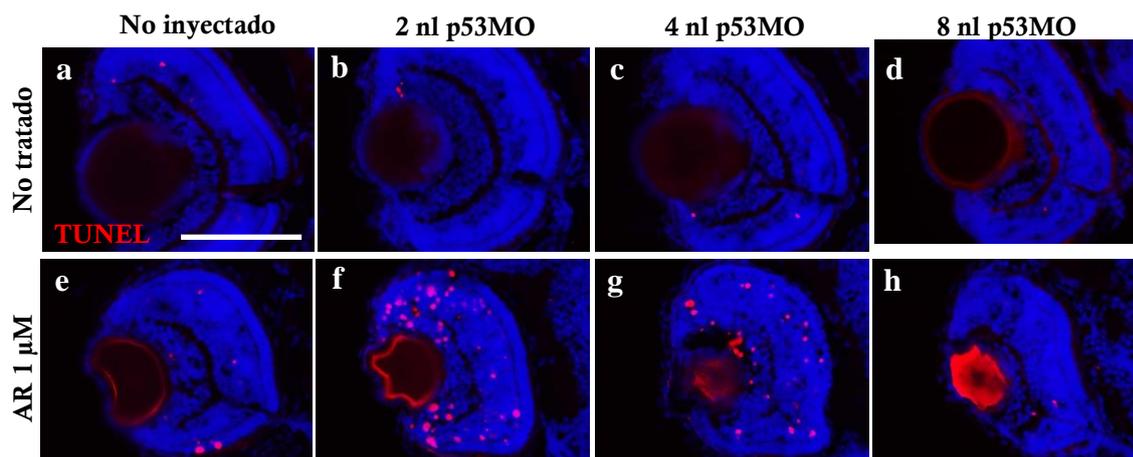


Figura 37: Técnica de TUNEL en secciones transversales de retinas de larvas de 3 dpf inyectadas y no inyectadas con diferentes cantidades de p53MO, que fueron tratadas o no tratadas con AR 1 μ M. En los animales tratados hay numerosas células TUNEL+, especialmente en los inyectados con 2 nl de p53MO. AR: ácido retinoico. Barra de escala: 100 μ m.

Los conteos de las células TUNEL+ en los grupos no tratados con AR muestran que la inyección de las diferentes cantidades de p53MO no produce cambios en el número de células apoptóticas respecto al grupo no inyectado (Fig. 38).

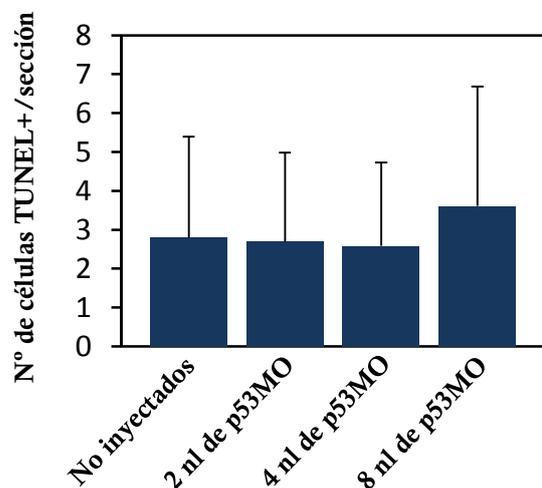


Figura 38: Gráfica que muestra los conteos de células TUNEL+ en la retina de larvas de 3 dpf no inyectadas e inyectadas con diferentes cantidades de p53MO, no tratadas con AR. AR: ácido retinoico. No hay diferencias entre los grupos experimentales.

En cuanto a los animales tratados con AR, el número de células TUNEL+ en todos los grupos fue superior que en los grupos no tratados (Fig. 39). En el caso de los inyectados con 2 nl de p53MO y tratados con AR, el número de células apoptóticas fue incluso mayor que en los no inyectados y tratados con AR (Fig. 39).

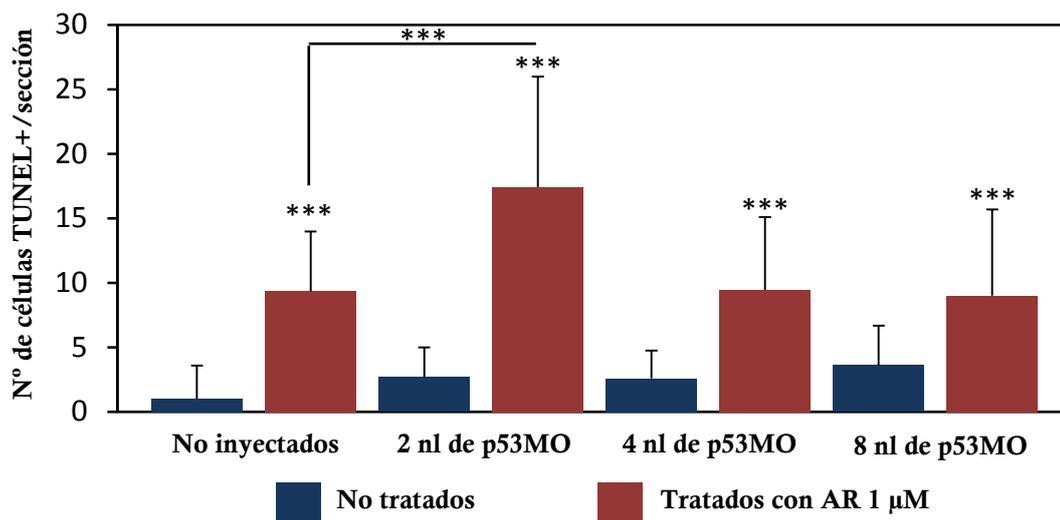


Figura 39: Conteo de células TUNEL+ en la retina de larvas de 3 dpf inyectadas y no inyectadas con diferentes cantidades de p53MO, que fueron tratadas o no tratadas con AR 1 µM. En la gráfica se comparan por parejas los tratados con los no tratados. Además, entre los animales tratados con AR, se comparan los inyectados y no inyectados. AR: ácido retinoico. ***: P<0.001

Proliferación celular

Para analizar los posibles efectos del AR sobre la proliferación celular realizamos la inmunodetección de PH3 y de BrdU en la retina de los animales tratados con AR 0,1 y 1 µM a las 48 hpf, 3 y 5 dpf, para compararlos con los animales control no tratados.

PH3

A las 48 hpf (Fig. 40 a, b, c), hay numerosas células PH3 positivas tanto en los controles como en los tratados con AR. Están distribuidas por los márgenes y la región escleral de la retina. Estas células son más numerosas en los tratados con AR 0,1 µM que en los otros grupos (Fig. 50 a). A los 3 dpf (Fig. 40 d, e, f), las células PH3 positivas se localizan en la ZPG, aunque en los ejemplares tratados con AR 1 µM hay algunas células

también en la CNI. En este estadio, las células positivas para PH3 son más numerosas en los animales tratados con AR (Fig. 50 a). A los 5 dpf (Fig. 40 g, h, i) el patrón de marcaje de la PH3 en los controles es similar al de 3 dpf, pero en los tratados con AR sólo encontramos células PH3 positivas en algunas secciones de retina analizadas, y se localizan exclusivamente en la ZPG. Los conteos muestran que en los tratados con AR 1 μM hay una reducción del número de dichas células (Fig. 50 a).

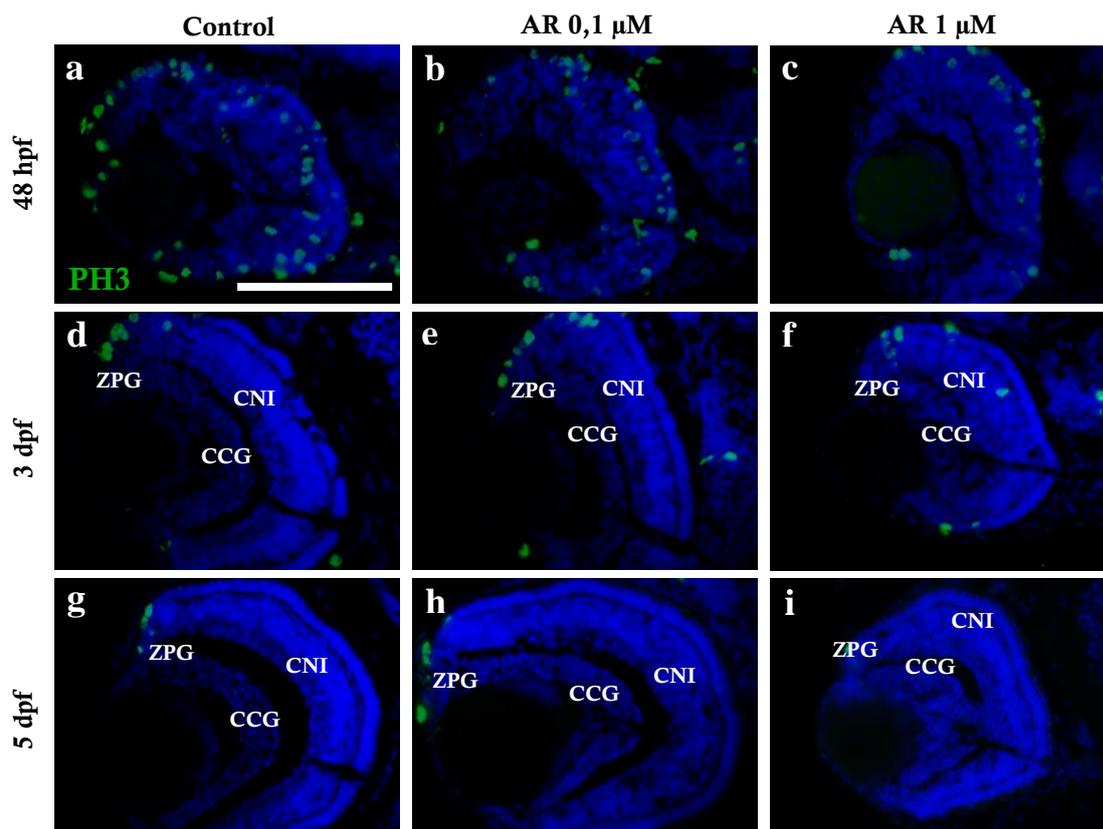


Figura 40: Distribución de PH3 en la retina de animales control y tratados con AR. **a-c)** A las 48 hpf, las células PH3 positivas están en los márgenes y la región escleral de la retina. **d-i)** A los 3 y 5 dpf, las escasas células PH3 positivas se encuentran en la ZPG, sin diferencias entre controles y tratados. AR: ácido retinoico, CCG: capa de las células ganglionares, CNI: capa nuclear interna, dpf: días postfecundación, hpf: horas postfecundación, ZPG: zona periférica germinal. Barra de escala: 100 μm .

BrdU

A las 48 hpf, en los embriones control (Fig. 41 a), el marcaje para BrdU se localiza en los márgenes y la región escleral de la retina. El mismo patrón de marcaje se encuentra en los embriones tratados con AR 0,1 μM (Fig. 41 b). En los tratados con AR 1 μM (Fig. 41 c) el marcaje para BrdU se extiende por toda la retina, a excepción de las

regiones central y vitreal de la misma, donde se está diferenciando la CCG. En los grupos tratados con AR hay más células que en los controles (Fig. 50 b).

A los 3 dpf, las células BrdU positivas están restringidas a la ZPG, tanto en los controles (Fig. 41 d) como en los tratados con AR 0,1 μ M (Fig. 41 e), en los que el número de estas células es menor (Fig. 50 b). En los ejemplares tratados con AR 1 μ M (Fig. 41 f) hay algunas células BrdU positivas también en la CNE y son más numerosas que en los controles (Fig. 50 b).

A los 5 dpf el patrón de marcaje de BrdU sigue restringido a la ZPG en las retinas de los controles (Fig. 41 g) y los tratados con AR 0,1 μ M (Fig. 41 h). En las retinas tratadas con AR 1 μ M (Fig. 41 i) la extensión del marcaje en la ZPG es menor que en los otros grupos pero se pueden identificar algunas células BrdU positivas en otras regiones de la retina. El número de células es menor que en los controles (Fig. 50 b).

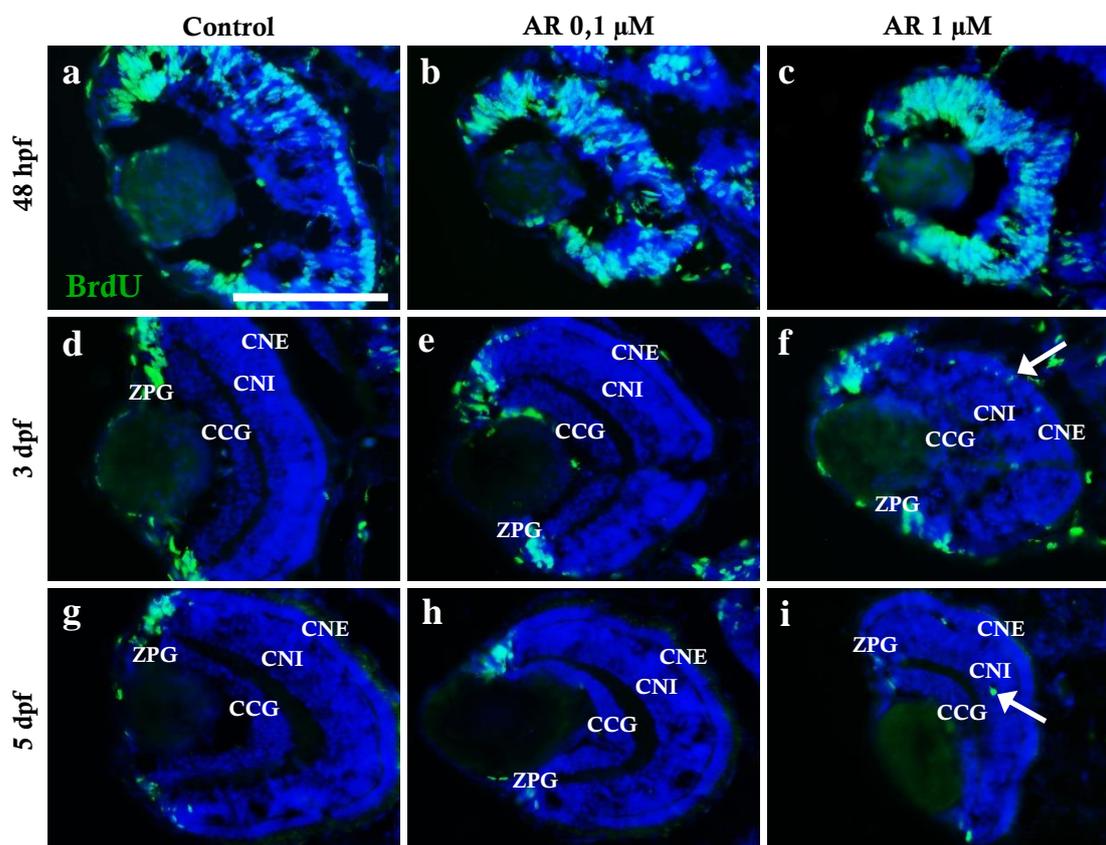


Figura 41: Distribución de células positivas para BrdU en la retina de animales control y tratados con AR. Casi toda la retina de los animales tratados con AR 1 μ M es positiva para BrdU a las 48 hpf (c). A los 3 y 5 dpf hay células BrdU positivas fuera de la ZPG a diferencia de los otros grupos (flecha en f, i). AR: ácido retinoico, CCG: capa de las células ganglionares, CNE: capa nuclear externa, CNI: capa nuclear interna, dpf: días postfecundación, hpf: horas postfecundación, ZPG: zona periférica germinal. Barra de escala: 100 μ m.

Neurogénesis

Para analizar el posible efecto del AR sobre la retinogénesis estudiamos la expresión de *pax6a*, *sox2* y *ath5*, que son marcadores implicados en el control de la neurogénesis y el inicio de la diferenciación celular de la retina. También analizamos la distribución de las proteínas Pax6 y Sox2.

Pax6

Mediante hibridación *in situ in toto* vemos que el patrón de expresión del ARNm del gen *pax6a* en los animales control y en los tratados con AR es similar tanto a las 48 hpf, como a los 3 y 5 dpf. Se localiza en la región central de la retina a las 48 hpf (Fig. 42 a, b, c), y en la CCG y la región vitreal de la CNI a los 3 dpf (Fig. 42 d, e, f) y 5 dpf (Fig. 42 g, h, i).

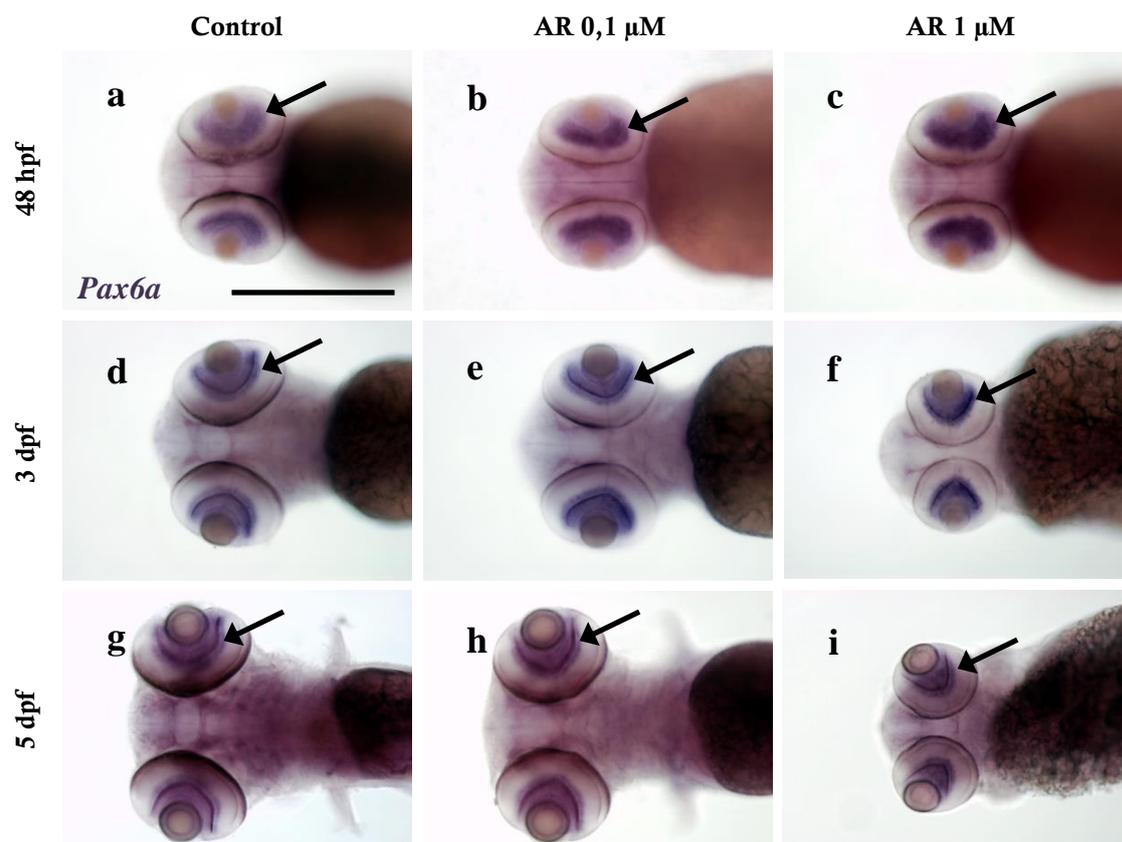


Figura 42: Expresión de *pax6a* en animales control y tratados con AR. Vistas ventrales. **a-c)** A las 48 hpf, el marcaje se localiza en la retina central (flecha). **d-i)** A los 3 y 5 dpf, el marcaje se localiza en la CCG y la parte vitreal de la CNI (flecha). AR: ácido retinoico, CCG: capa de las células ganglionares, CNI: capa nuclear interna, dpf: días postfecundación, hpf: horas postfecundación. Barra de escala: 200

La técnica inmunohistoquímica para detectar la proteína Pax6 en secciones de retina muestra que a los 3 dpf (Fig. 43 a, b, c), las células Pax6 positivas se localizan en la CCG y, sobre todo en la región vitreal de la CNI. Este patrón de distribución no se modifica en los diferentes grupos experimentales, aunque la intensidad del marcaje parece menor en los tratados con AR. A los 5 dpf, en la retina control (Fig. 43 d), las células Pax6 positivas se encuentran en la parte vitreal de la CNI. En los animales tratados con AR (Fig. 43 e, f) parece que hay menor intensidad en el marcaje de las escasas células Pax6 positivas de la CNI.

Los conteos de las células Pax6 positivas muestran que tanto a los 3 como a los 5 dpf hay una reducción en el número de estas células en los animales tratados con AR (Fig. 50 c).

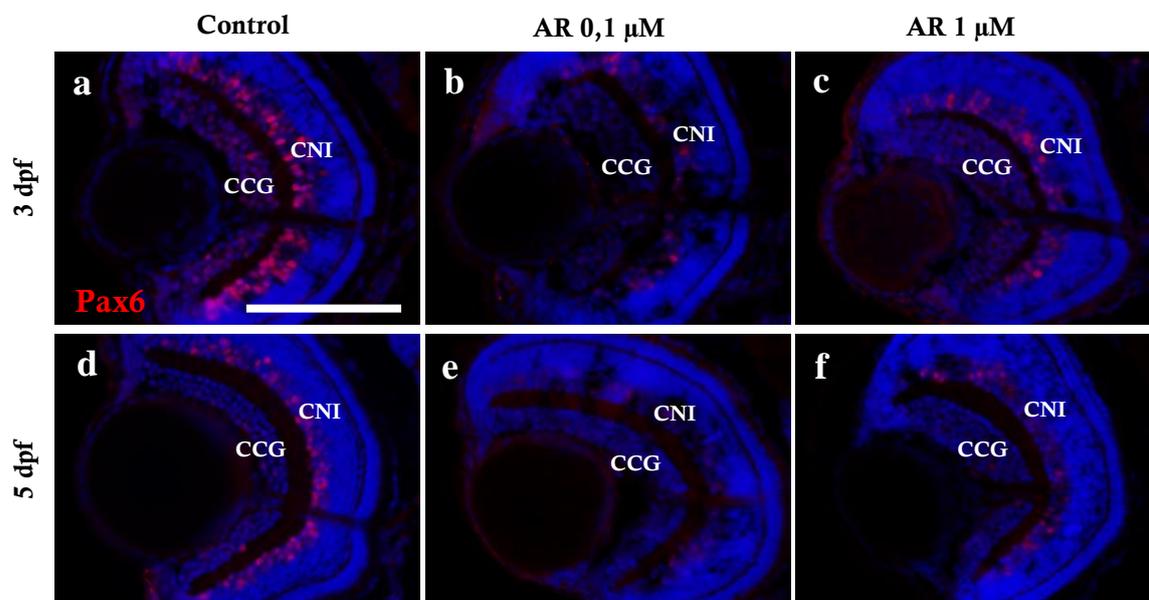


Figura 43: Distribución de Pax6 en la retina de animales control y tratados con AR. Las células Pax6 positivas se localizan en la CCG y en la región vitreal de la CNI tanto en los controles como en los tratados con AR, si bien en éstos la intensidad del marcaje parece menor a los 3 y 5 dpf. AR: ácido retinoico, CCG: capa de las células ganglionares, CNI: capa nuclear interna, dpf: días postfecundación, hpf: horas postfecundación. Barra de escala: 100 μ m

Sox2

La hibridación *in situ* para *sox2* muestra que, a las 48 hpf (Fig. 44 a, b, c), la expresión de este gen se localiza en los márgenes de la retina y en una banda situada en la retina central que marca la separación de la CCG y la CNI, tanto en los animales control como en los tratados con AR. A los 3 dpf (Fig. 44 d, e, f), hay un marcaje débil para *sox2* en la ZPG, en la CCG y en la región vitreal de la CNI. A los 5 dpf se mantiene el mismo patrón de marcaje en los controles (Fig. 44 g), pero en los animales tratados con AR no encontramos marcaje en la ZPG (Fig. 44 h, i).

También hay expresión de *sox2* en la región medial del encéfalo, tanto en los animales control como en los tratados, y el patrón de marcaje se mantiene sin modificaciones en todos los grupos analizados (Fig. 44).

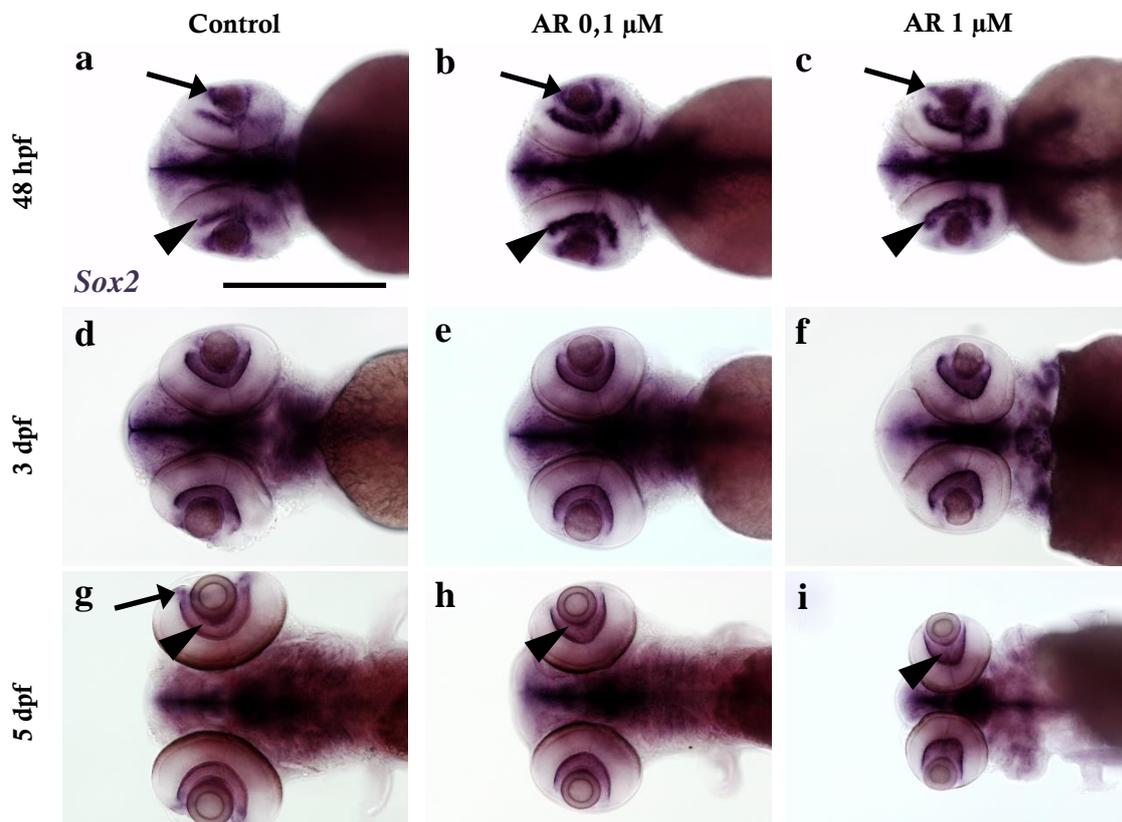


Figura 44: Expresión de *sox2* en animales control y tratados con AR. **a-c)** A las 48 hpf, el marcaje se localiza en los márgenes de la retina (flecha) y en la retina central (cabeza de flecha). **d-f)** A los 3 dpf el patrón es el mismo pero el marcaje es más débil. **g-i)** A los 5 dpf sólo se mantiene la expresión de *sox2* en la ZPG en los animales control (flecha), aunque en la CCG hay marcaje débil tanto en los controles como en los tratados con AR (cabeza de flecha). AR: ácido retinoico. CCG: capa de las células ganglionares, dpf: días postfecundación, hpf: horas postfecundación, ZPG: zona periférica germinal. Barra de escala: 200 μ m.

La técnica inmunohistoquímica para Sox2 muestra que a las 48 hpf no hay diferencias en el patrón de distribución de esta proteína entre los controles y los animales tratados (Fig. 45 a, b, c). En este estadio se distinguen tres tipos de células Sox2 positivas, atendiendo a la morfología de sus núcleos y su posición. Hay núcleos positivos alargados en los márgenes y en la región escleral de la retina. También vemos núcleos redondeados en la región escleral de la CCG y en la región vitreal de la CNI, dispuestos en hilera a ambos lados de la CPI, que está empezando a organizarse. Además, hay núcleos fusiformes situados en la salida del nervio óptico. En los animales tratados con AR 0,1 μM hay menor número de células Sox2 positivas que en los controles (Fig. 50 d).

A los 3 dpf, en los animales control (Fig. 45 d) las células Sox2 positivas se localizan en la ZPG, donde presentan morfología alargada y un marcaje débil. Se disponen también en una hilera en el centro de la CNI, donde son fusiformes, se orientan radialmente y presentan un marcaje débil. A ambos lados de la CPI vemos también células Sox2 positivas de morfología redondeada y un marcaje intenso, y en la salida del nervio óptico, donde también son fusiformes. Los animales tratados con AR 0,1 μM (Fig. 45 e) tienen el mismo patrón de marcaje para Sox2 que los controles. Sin embargo, en los tratados con AR 1 μM (Fig. 45 f), los núcleos Sox2 positivos de la CNI, en lugar de formar una hilera en posición medial, se localizan a diferentes alturas dentro de la capa, de manera que algunos se encuentran desplazados hacia la región escleral, junto a la CPE. Esta disposición es similar a la que presentan las células Sox2 positivas en la región escleral de la retina a las 48 hpf. En este estadio no hay diferencias en el número de células Sox2 positivas en la retina entre controles y tratados (Fig. 50 d).

A los 5 dpf, los animales control (Fig. 45 g) presentan la misma distribución de células Sox2 positivas en la retina que a los 3 dpf. Sin embargo, en las células redondeadas que se disponen a ambos lados de la CPI el marcaje también se localiza en el citoplasma, y no sólo dentro del núcleo como en los estadios anteriores. En los animales tratados con AR 0,1 μM (Fig. 45 h) únicamente hay células positivas para Sox2 en la CNI. Estas células tienen morfología fusiforme y se distribuyen a diferentes alturas; no detectamos las células dispuestas en hilera a ambos lados de la CPI que observamos a los 3 dpf. En los animales tratados con AR 1 μM (Fig. 45 i) se pierde casi por completo el marcaje para Sox2 en la retina, de forma que sólo identificamos unas pocas células positivas fusiformes distribuidas por la CNI y otras redondeadas junto a la CPI. Los conteos muestran que a los 5 dpf los animales tratados con ambas concentraciones de AR

tienen un número menor de células Sox2 positivas en la retina que los controles de esa misma edad, ya que apenas detectamos inmunoreactividad para esta proteína (Fig. 50 d).

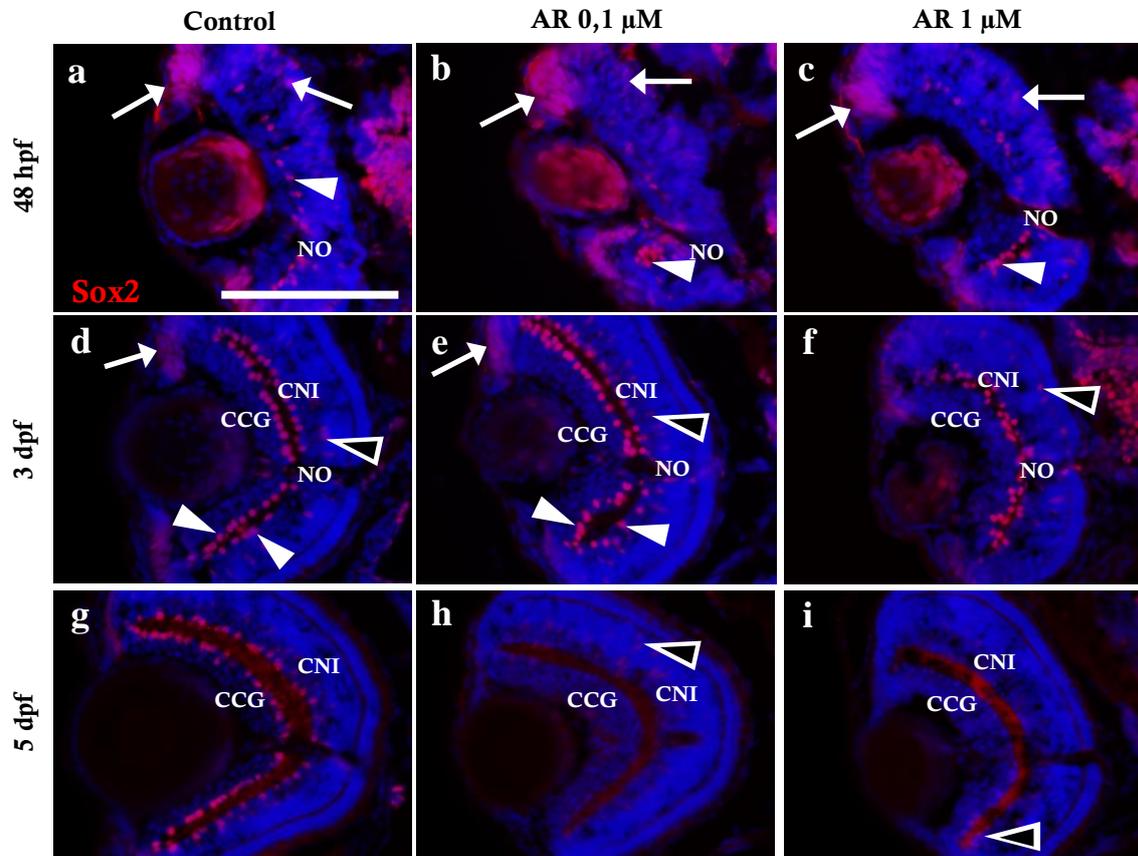


Figura 45: Distribución de Sox2 en la retina de animales control y tratados con AR. **a-c)** A las 48 hpf las células Sox2 positivas se encuentran en los márgenes y la región escleral de la retina (flecha), entre la CCG y la CNI en formación (cabeza de flecha), y en el NO, sin que haya diferencias entre los controles y los tratados con AR. **d-f)** A las 72 hpf, en los controles y los tratados con AR 0,1 μM hay células Sox2 positivas en la ZPG (flecha), en la parte escleral de la CCG y la parte vitreal de la CNI (cabezas de flecha), en el centro de la CNI (cabeza de flecha hueca en **d**, **e**) y en el NO. En los tratados con AR 1 μM hay además células Sox2 positivas situadas a diferentes alturas en la CNI (cabeza de flecha hueca en **f**). **g-h)** A los 5 dpf, en la retina de los tratados con AR sólo hay marcaje para Sox2 en algunas células a diferentes alturas de la CNI (cabeza de flecha hueca en **h**, **i**). AR: ácido retinoico, CCG: capa de las células ganglionares, CNI: capa nuclear interna, dpf: días postfecundación, hpf: horas postfecundación; NO: nervio óptico. Barra de escala: 100 μm .

Ath5

La hibridación *in situ* para *ath5* muestra que la expresión de este gen, a las 48 hpf (Fig. 46 a, b, c), se localiza en la región central y vitreal de la retina, donde se diferenciará la CCG, tanto en los embriones control como en los tratados con ambas concentraciones de AR. A los 3 dpf (Fig. 46 d, e, f), la expresión de *ath5* está restringida a la ZPG, formando un anillo en los márgenes de la retina, similar en las retinas de los animales control y tratados con AR. Sin embargo, a los 5 dpf, mientras que el marcaje para *ath5* es intenso en la ZPG de la retina control (Fig 46 g), en los animales tratados con AR 0,1 μM el marcaje es bastante débil (Fig. 46 h) y en los tratados con AR 1 μM no detectamos la expresión del gen (Fig. 46 i).

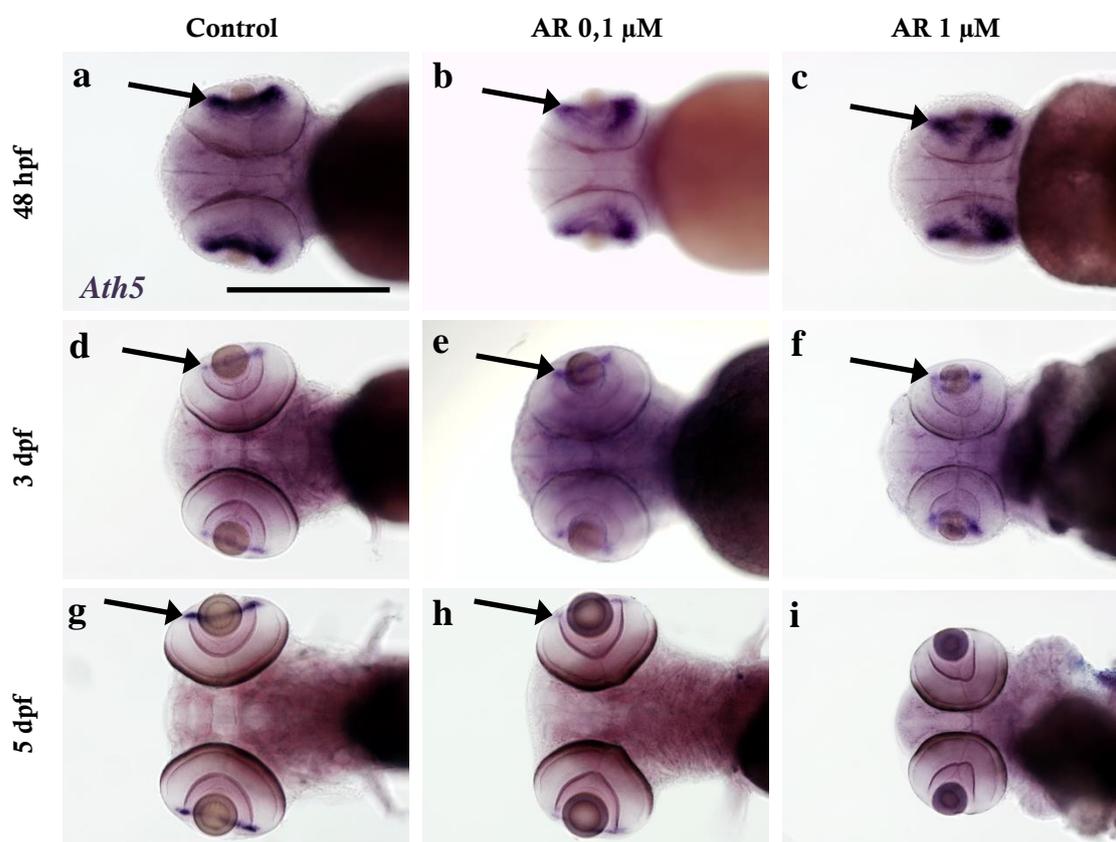


Figura 46: Expresión de *ath5* en animales control y tratados con AR. Vistas ventrales. **a-c)** A las 48 hpf, el marcaje se localiza en la región central y vitreal de la retina (flecha). **d-f)** A los 3 dpf, la expresión de *ath5* está restringida a la ZPG (flecha). **g-i)** A los 5 dpf, el marcaje para *ath5* se ve en la ZPG de los controles (flecha en **g**) y más débil en los tratados con AR 0,1 μM (flecha en **h**), mientras que en los tratados con AR 1 μM no hay marcaje en la retina. AR: ácido retinoico, dpf: días postfecundación, hpf: horas postfecundación, ZPG: zona periférica germinal. Barra de escala: 200 μm .

Diferenciación celular

Para estudiar el posible efecto de los tratamientos con AR en la diferenciación celular de la retina, analizamos mediante inmunohistoquímica el patrón de distribución de las proteínas CR, GS, Zpr1 y Zpr3 en animales de 3 y 5 dpf.

CR

A los 3 dpf (Fig. 47 a), tanto en los animales control como en los tratados con AR (Fig. 47 b, c), las células positivas para CR se localizan en la CCG y en la CNI. También hay marcaje para CR en la CPI y en el nervio óptico. No obstante, en los animales tratados con AR hay mayor número de células CR positivas que en los controles (Fig. 50 e). A los 5 dpf, en los animales control (Fig. 47 d) las células CR positivas se siguen localizando en la CCG y en la CNI, en la CPI y el nervio óptico. En los animales tratados con AR (Fig. 47 e, f) el patrón es similar, aunque la CPI no está tan organizada como en los controles y tiene menor grosor. Además, se produce una reducción de la densidad de células CR positivas (Fig. 50 e).

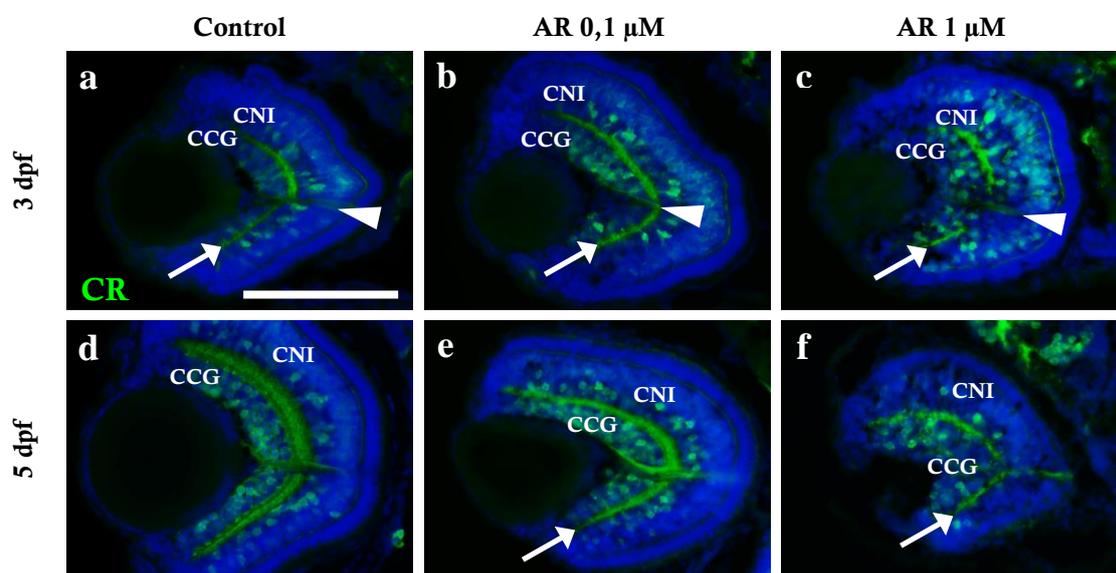


Figura 47: Distribución de CR en la retina de animales control y tratados con AR. **a-c)** A los 3 dpf, las células CR positivas se encuentran en la CCG y en la CNI, y también hay marcaje en la CPI (flecha) y en el nervio óptico (cabeza de flecha). **d-f)** A los 5 dpf el patrón es similar aunque la CPI de las retinas tratadas no está bien organizada y es más fina (flecha en **e, f**). AR: ácido retinoico, CCG: capa de las células ganglionares, CNI: capa nuclear interna, CPI: capa plexiforme interna, dpf: días postfecundación, hpf: horas postfecundación. Barra de escala: 100 μm.

GS

En los animales control de 3 dpf (Fig. 48 a), la inmunorreactividad para GS se localiza en la región central de la retina, en el cuerpo celular de las células de Müller. Los núcleos de estas células se disponen en el centro de la CNI y su cuerpo celular está orientado radialmente, de manera que cada célula presenta un proceso vitreal y otro escleral. En los animales tratados con AR 0,1 μM (Fig. 48 b) hay algunas células de Müller positivas, pero también vemos células positivas para GS con morfologías atípicas, distribuidas tanto en la CNI como en la CCG, e incluso en el nervio óptico. Estas células no emiten proyecciones radiales y tienen aspecto ameboide. Además, las células GS positivas son menos numerosas que en los controles (Fig. 50 f). En los animales tratados con AR 1 μM (Fig. 48 c) vemos el mismo patrón de distribución de células positivas para GS, pero su número es similar al de los controles de la misma edad (Fig. 50 f).

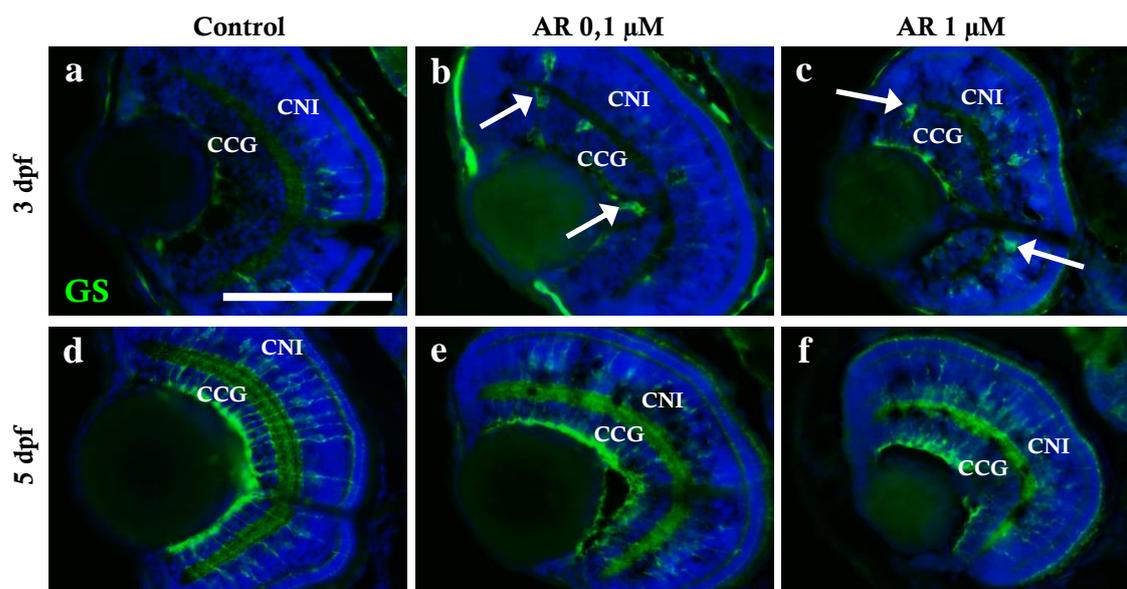


Figura 48: Distribución de GS en retinas de animales control y tratados con AR. **a)** En los animales control de 3 dpf las células de Müller se localizan en el centro de la CNI. **b, c)** En los tratados con AR hay elementos GS positivos con morfología y posición atípicas (flechas). **d, e)** En los controles y tratados con AR 0,1 μM de 5 dpf, las células de Müller se extienden por toda la CNI. **f)** En los tratados con AR 1 μM , las células de Müller tienen los núcleos muy próximos, en la región vitreal de la CNI, su cuerpo celular parece desorganizado, y presentan procesos radiales. AR: ácido retinoico, CCG: capa de las células ganglionares, CNI: capa nuclear interna, dpf: días postfecundación, hpf: horas postfecundación. Barra de escala: 100 μm .

En animales control de 5 dpf (Fig. 48 d), las células de Müller están totalmente diferenciadas, y se distribuyen a lo largo de toda la CNI emitiendo sus procesos radiales.

En los animales tratados con AR 0,1 μM (Fig. 48 e) las células de Müller tienen una distribución similar a la de los controles. En los animales tratados con AR 1 μM (Fig. 48 f) las células de Müller se disponen de forma radial a lo largo de la CNI, pero la mayoría de sus núcleos están situados en la región vitreal de la CNI y no en el centro como en los controles. Además, estas células no están tan ordenadas y separadas como en los animales control. El conteo de células positivas para GS muestra que no hay diferencias entre controles y tratados con AR 0,1 μM . Sin embargo, en los tratados con AR 1 μM el número relativo de células positivas es mayor que en los animales control (Fig. 50 f).

Zpr1 y Zpr3

Para analizar si la diferenciación de los fotorreceptores se veía afectada por el tratamiento con AR, estudiamos su distribución utilizando dos anticuerpos específicos de pez cebra denominados, respectivamente, Zpr-1, que marca los conos sensibles para los colores verde y rojo, y Zpr-3, que marca los bastones.

El marcaje con Zpr-1 muestra que los conos sensibles al verde-rojo se encuentran distribuidos en la región más escleral de la retina a los 3 dpf, tanto en los animales control como en los tratados con AR (Fig. 49 a, b, c). El marcaje es similar a los 5 dpf (Fig. 49 d, e, f). Sin embargo, aunque no hay diferencias en el patrón de marcaje entre los diferentes grupos, la densidad relativa de conos es mayor en los animales tratados con AR a los 3 y a los 5 dpf (Fig. 50 g).

El marcaje con Zpr-3 muestra la posición de los bastones en la región más escleral de la retina a los 3 dpf, tanto en los animales control como en los tratados con AR (Fig. 49 g, h, i). No observamos diferencias a los 5 dpf (Fig. 49 j, k, l). Sin embargo, aunque no hay diferencias en el patrón de marcaje entre los diferentes grupos, la densidad relativa de bastones es mayor en los animales tratados con AR, a los 3 y a los 5 dpf (Fig. 50 h).

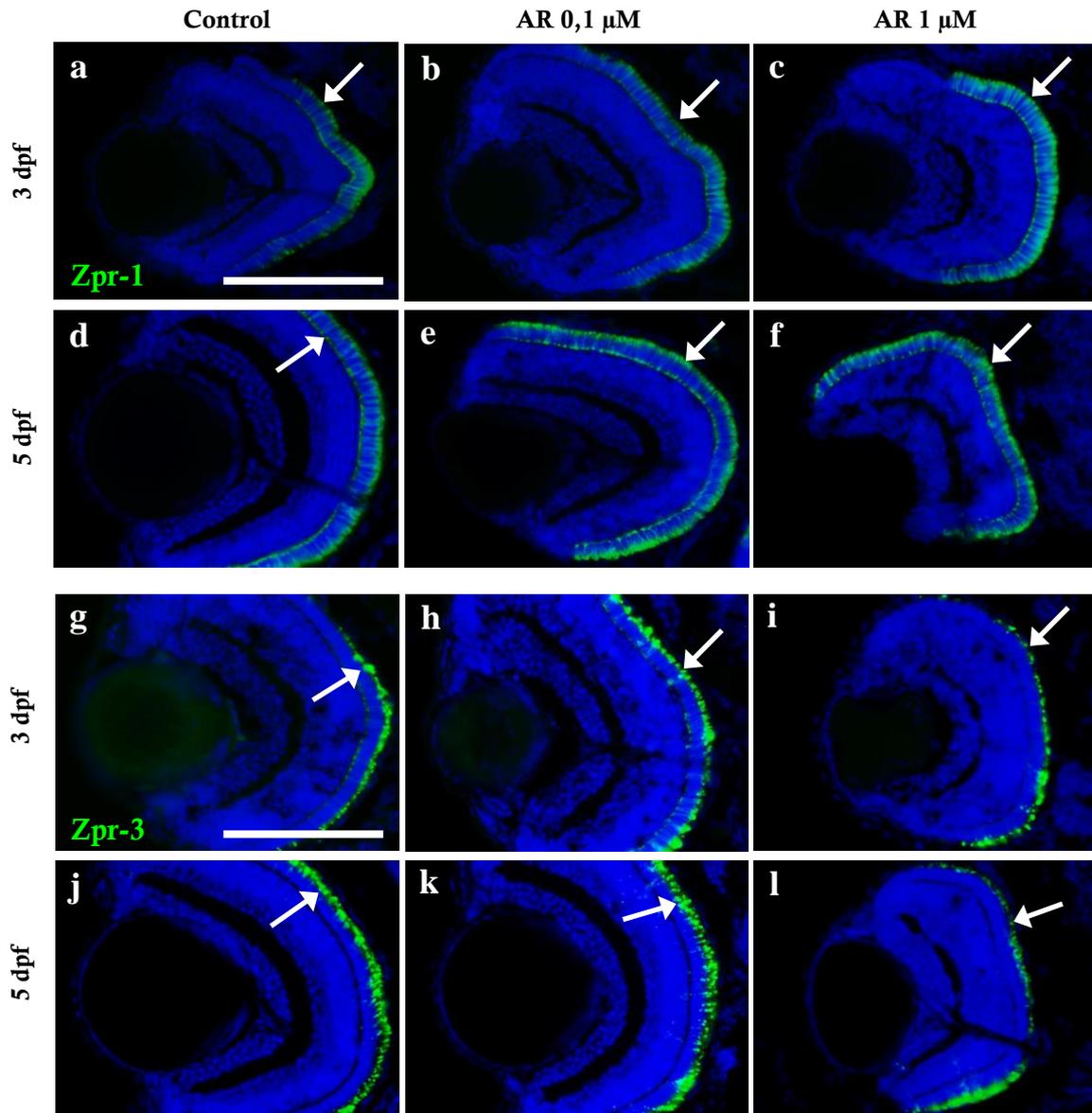
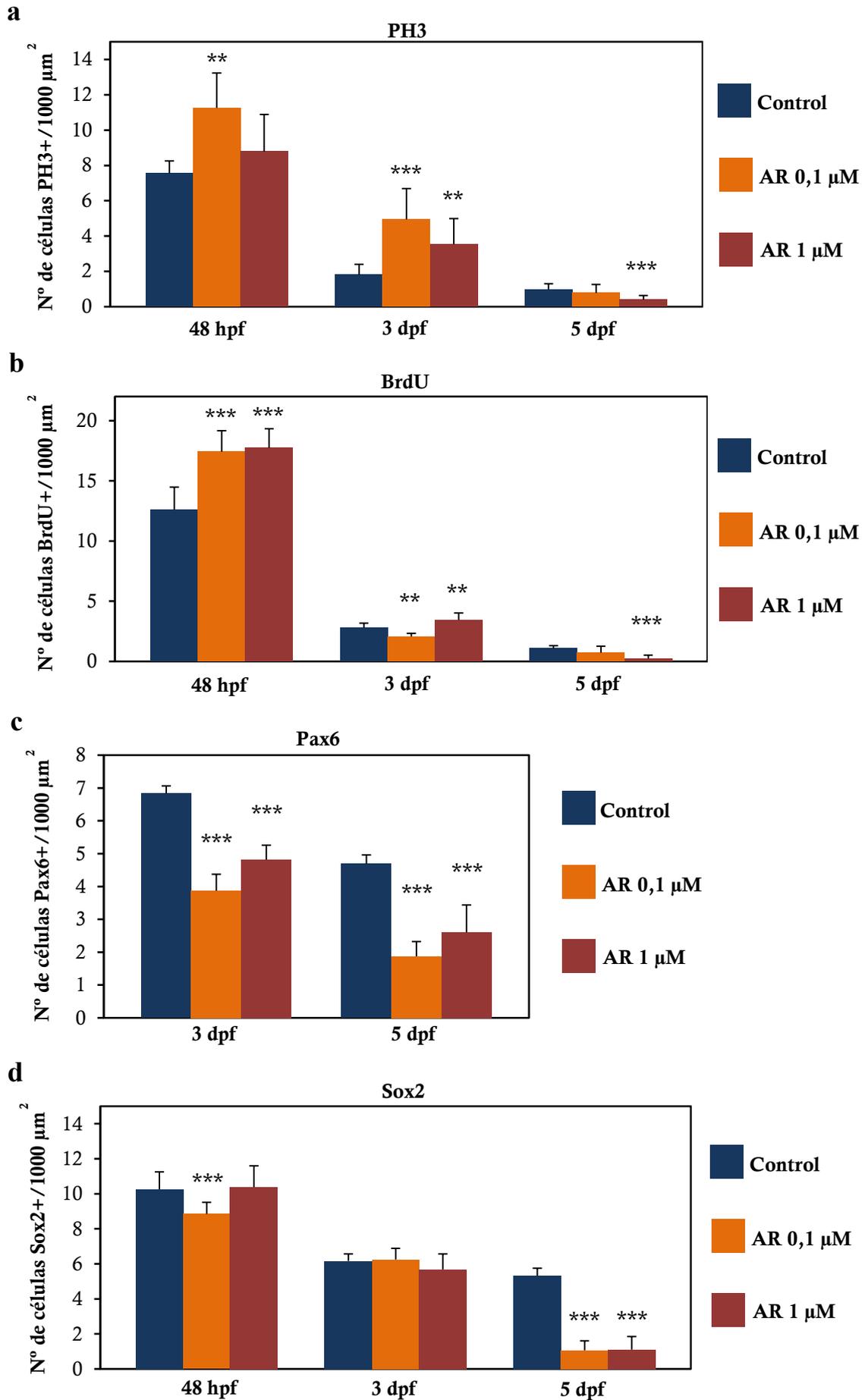


Figura 49: Patrón de distribución de células marcadas con Zpr-1 y Zpr-3 en retinas de animales control y tratados con AR. **a-f)** El marcaje para Zpr-1 se localiza en los conos, en la región más escleral de la retina sin diferencias entre los animales control y los tratados con AR (flecha). **g-l)** Zpr-3 marca los bastones, localizados en la región más escleral de la retina, sin diferencias entre controles y tratados con AR (flecha). AR: ácido retinoico, dpf: días postfecundación, hpf: horas postfecundación. Barra de escala: 100 μm.



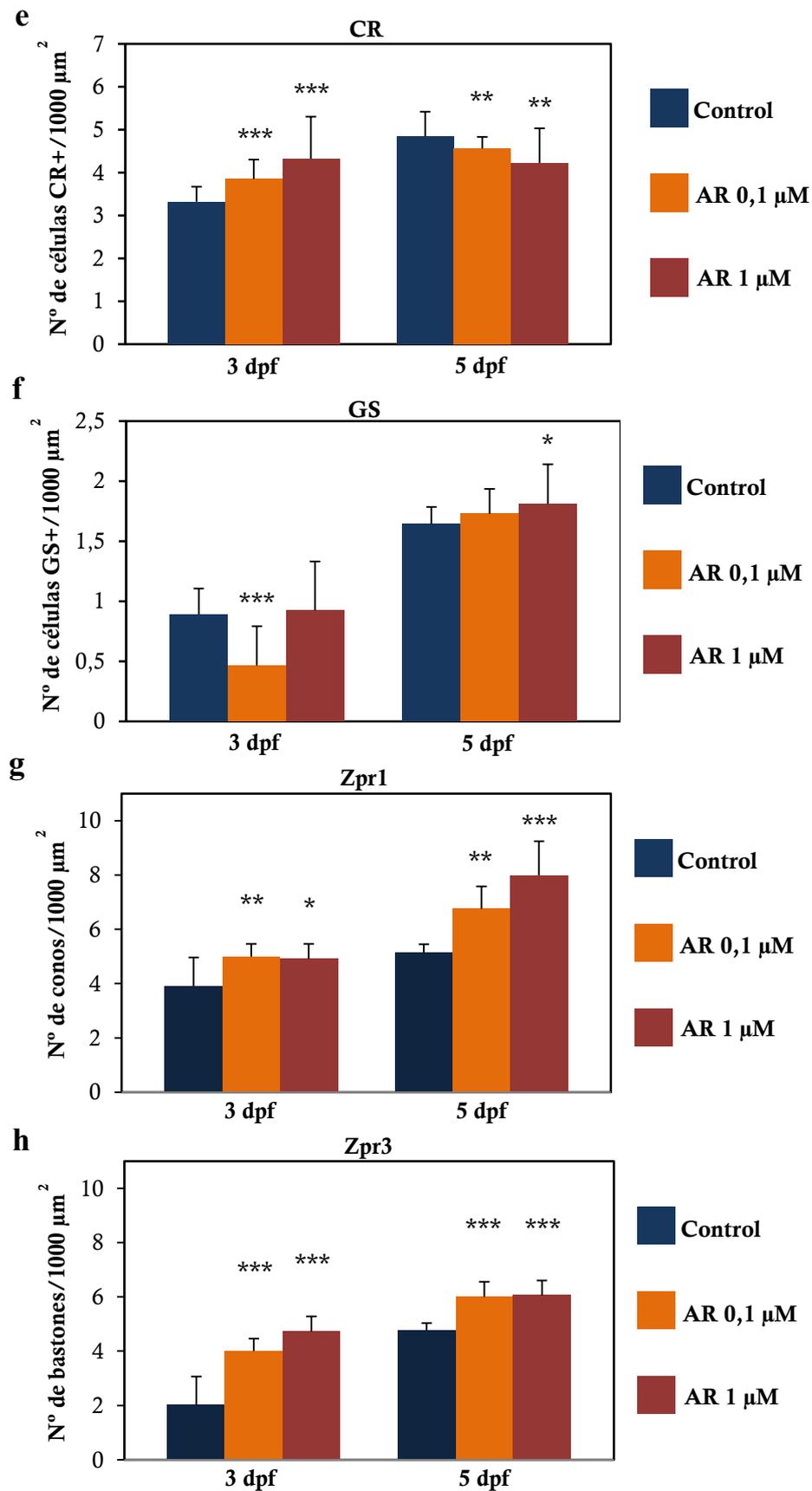


Figura 50: Representaciones gráficas que muestran los resultados de los conteos de las células positivas para PH3 (a), BrdU (b), Pax6 (c), Sox2 (d), CR (e), GS (f), Zpr-1 (g) y Zpr-3 (h) en las retinas de animales control y tratados con AR. AR: ácido retinoico, dpf: días postfecundación, hpf: horas postfecundación *: $P < 0.05$; **: $0.05 > P > 0.001$; ***: $P < 0.001$.

Nervio óptico

Para estudiar los posibles efectos del tratamiento con AR en la formación del nervio óptico hemos realizado la técnica inmunohistoquímica *in toto* con el anticuerpo Zn8, para marcar la Neurolina. Además, para obtener mejor información sobre las posibles alteraciones del nervio óptico, hemos realizado la inmunohistoquímica doble frente a Neurolina y Pax2 en secciones de tejido.

Neurolina

La técnica inmunohistoquímica *in toto* con el anticuerpo Zn-8 muestra que, a las 48 hpf, el patrón de marcaje para Neurolina es similar en animales control y tratados con AR (Fig. 51 a, b, c). Esta proteína se encuentra en la región central y vitreal de la retina, donde se está diferenciando la CCG, así como en los axones de las células ganglionares, que forman el nervio óptico y alcanzan la región anterior del techo óptico. El nervio óptico de cada retina cruza la línea media del embrión formando el quiasma óptico y alcanza la región contralateral del techo óptico.

A los 3 dpf, no hay diferencias entre los animales control (Fig. 51 d) y los tratados con AR 0,1 μ M (Fig. 51 e). El marcaje para Neurolina se encuentra en la CCG, completamente diferenciada, y en los axones jóvenes del nervio óptico que continúan creciendo en este estadio y alcanzan el techo óptico. En los animales tratados con AR 1 μ M (Fig. 51 f) el patrón de marcaje para Neurolina es similar al de los controles, pero se produce una reducción de la intensidad del marcaje en el nervio óptico, desde su salida de la retina hasta el techo óptico, de manera que casi no se observa el quiasma óptico.

A los 5 dpf, en los animales control (Fig. 51 g) el marcaje para Neurolina se encuentra de forma muy débil en la CCG, y de manera más clara en la CFNO y en axones del nervio óptico que inervan el techo óptico. En los animales tratados con AR 0,1 μ M (Fig. 51 h) también hay marcaje para Neurolina en la CCG y la CFNO, pero solamente se marca la porción del nervio óptico que se encuentra dentro de la retina y la que se encuentra justo tras la salida de la retina, sin que haya marcaje en el quiasma óptico o en los axones que ascienden al techo óptico. En los animales tratados con AR 1 μ M (Fig. 51 i) no detectamos inmunorreactividad para Neurolina con esta técnica.

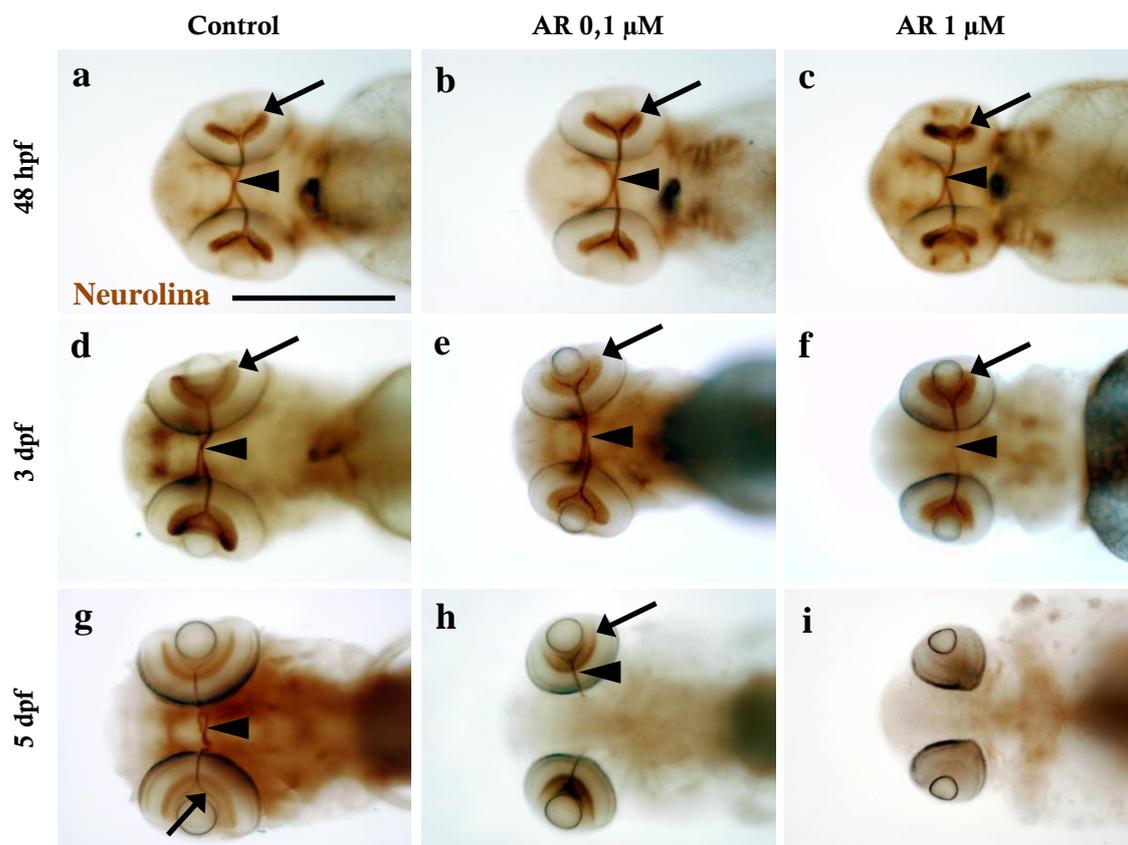


Figura 51: Marcaje para Neurolina en animales control y tratados con AR. **a-c)** A las 48 hpf, el patrón de marcaje para Neurolina en la CCG prospectiva (flecha en **a, b, c**) y el nervio óptico (cabeza de flecha) es similar en los animales control y tratados con AR. **d-f)** A los 3 dpf, el marcaje para Neurolina se encuentra en la CCG (flecha) y el nervio óptico (cabeza de flecha), aunque es débil en los tratados con AR 1 μM . **g-h)** A los 5 dpf, en los controles hay marcaje para Neurolina en la CFNO (flecha en **g**) y el nervio óptico (cabeza de flecha en **g**), en los tratados con AR 0,1 μM en la CCG (flecha en **h**) y la porción intrarretinal del nervio óptico (cabeza de flecha en **h**). En los tratados con AR 1 μM no hay marcaje. AR: ácido retinoico, CCG: capa de las células ganglionares, CFNO: capa de las fibras del nervio óptico, dpf: días postfecundación, hpf: horas postfecundación. Barra de escala: 200 μm .

Neurolina-Pax2

Al realizar la inmunohistoquímica doble para detectar las proteínas Neurolina y Pax2 en secciones de tejido, vemos con mayor claridad, que en los embriones control de 48 hpf (Fig. 52 a), la inmunorreactividad para Neurolina, se localiza en la membrana plasmática de las células ganglionares de la retina, que se están diferenciando para formar la CCG, y en sus axones, que discurren por la CFNO, salen de la retina empaquetados,

forman el quiasma óptico en la línea media del animal y ascienden hacia el hemisferio del techo óptico contralateral a cada ojo. Asociadas a estos axones hay células fusiformes positivas para Pax2. En los animales tratados con AR (Fig. 52 b, c) el patrón de marcaje para Neurolina y Pax2 es similar.

A los 3 dpf, en las retinas control (Fig. 52 d), el marcaje para Neurolina se localiza en la CCG y la CFNO, y en axones del nervio óptico, a los que están asociadas las células fusiformes Pax2 positivas. En los animales tratados con AR 0,1 μ M (Fig. 52 e) no encontramos diferencias en el marcaje para ambas proteínas. Sin embargo, en los animales tratados con AR 1 μ M (Fig. 52 f), además del marcaje para Neurolina en la CCG, detectamos algunas proyecciones celulares positivas dentro de la CNI. En cuanto al marcaje para Pax2, además de las células alargadas asociadas al nervio óptico, hay numerosas células Pax2 positivas, cuyos núcleos tienen morfología redondeada, localizadas en la CCG y en la CNI.

En los animales control de 5 dpf (Fig. 52 g) el marcaje para Neurolina se localiza en los márgenes de la CCG, dónde se encuentran las células ganglionares más jóvenes, que emergen de la ZPG. Estas células emiten sus axones hacia la CFNO, de manera que solamente estos axones jóvenes que se incorporan al nervio óptico son Neurolina positivos. Las células fusiformes positivas para Pax2 están asociadas al nervio óptico. En el grupo tratado con AR 0,1 μ M (Fig. 52 h) el patrón de distribución de Neurolina y Pax2 es similar. Sin embargo, en los animales tratados con AR 1 μ M (Fig. 52 i) el marcaje para Neurolina se encuentra en todas las células de la CCG, en lugar de estar restringido a los márgenes, como ocurre en los animales control. Además, hay elementos positivos para Neurolina dentro de la CNI, en la que hay algunos núcleos celulares redondeados positivos para Pax2, del mismo modo que a los 3 dpf.

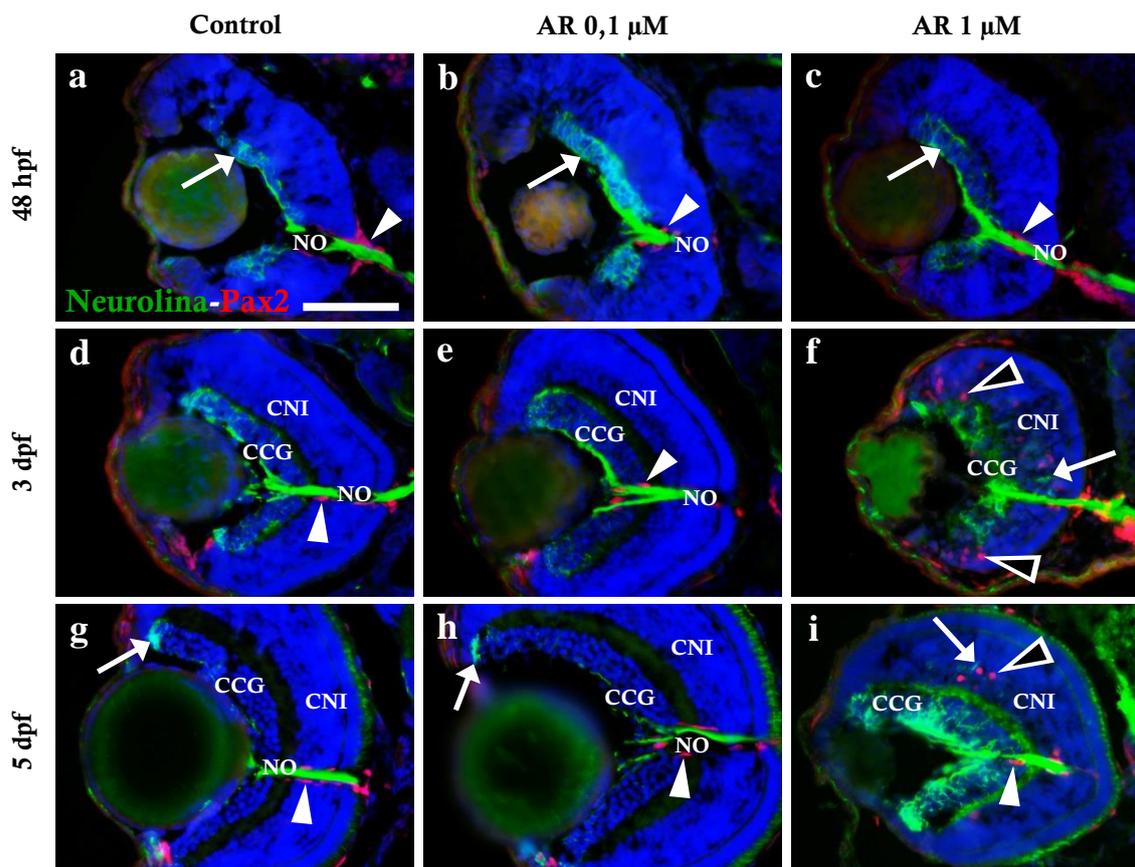


Figura 52: Distribución de Neurolinea y Pax2 en la retina de animales control y tratados con AR. **a-c)** A las 48 hpf, en los animales control y en los tratados con AR la Neurolinea se localiza en la CCG prospectiva (flecha) y el NO, donde hay células Pax2 positivas (cabeza de flecha). **d-f)** A los 3 dpf, en los controles y tratados con AR 0,1 μM el marcaje para Neurolinea se localiza en la CCG y el NO, donde hay células fusiformes Pax2 positivas (cabeza de flecha en **d, e**). En los tratados con AR 1 μM , además hay proyecciones Neurolinea positivas en la CNI (flecha en **f**) y células redondeadas Pax2 positivas por toda la extensión de la retina (cabezas de flecha huecas en **f**). **g-i)** A los 5 dpf, en los controles y tratados con AR 0,1 μM hay marcaje para Neurolinea en los márgenes de la CCG (flecha en **g, h**) y en el NO, donde también hay células Pax2 positivas fusiformes (cabeza de flecha en **g, h**). En los tratados con AR 1 μM , toda la CCG y algunas proyecciones en la CNI (flecha en **i**) son positivas para Neurolinea, además del NO, al que se asocian células Pax2 positivas fusiformes (cabeza de flecha en **i**). Además, en estos animales hay núcleos redondeados Pax2 positivos en la retina (cabeza de flecha hueca en **i**). AR: ácido retinoico, CCG: capa de las células ganglionares, CNI: capa nuclear interna, dpf: días postfecundación, hpf: horas postfecundación, NO: nervio óptico. Barra de escala: 50 μm .

En cuanto a la distribución de estas proteínas en el nervio óptico, a la altura del quiasma óptico también se producen algunas alteraciones tras el tratamiento con AR. En los embriones control de 48 hpf (Fig. 53 a), la Neurolinea marca los axones del nervio óptico, que cruzan la línea media del animal formando el quiasma. Estos axones están

asociados a células positivas para Pax2, que constituyen un remanente del tallo óptico. En los embriones tratados con AR (Fig. 53 b, c) no hay alteraciones de este patrón de marcaje.

A los 3 dpf (Fig. 53 d), el tallo óptico ya no se encuentra en los animales control, y en su lugar quedan unas pocas células fusiformes Pax2 positivas que se asocian a los axones del nervio óptico, que llegan hasta el techo óptico. Los animales tratados con AR 0,1 μ M (Fig. 53 e) muestran el mismo patrón de marcaje que los controles, pero en los tratados con AR 1 μ M (Fig. 53 f) los axones Neurolina positivos no crecen más allá del quiasma, donde están desorganizados. Además, persiste el tallo óptico, formado por células Pax2 positivas.

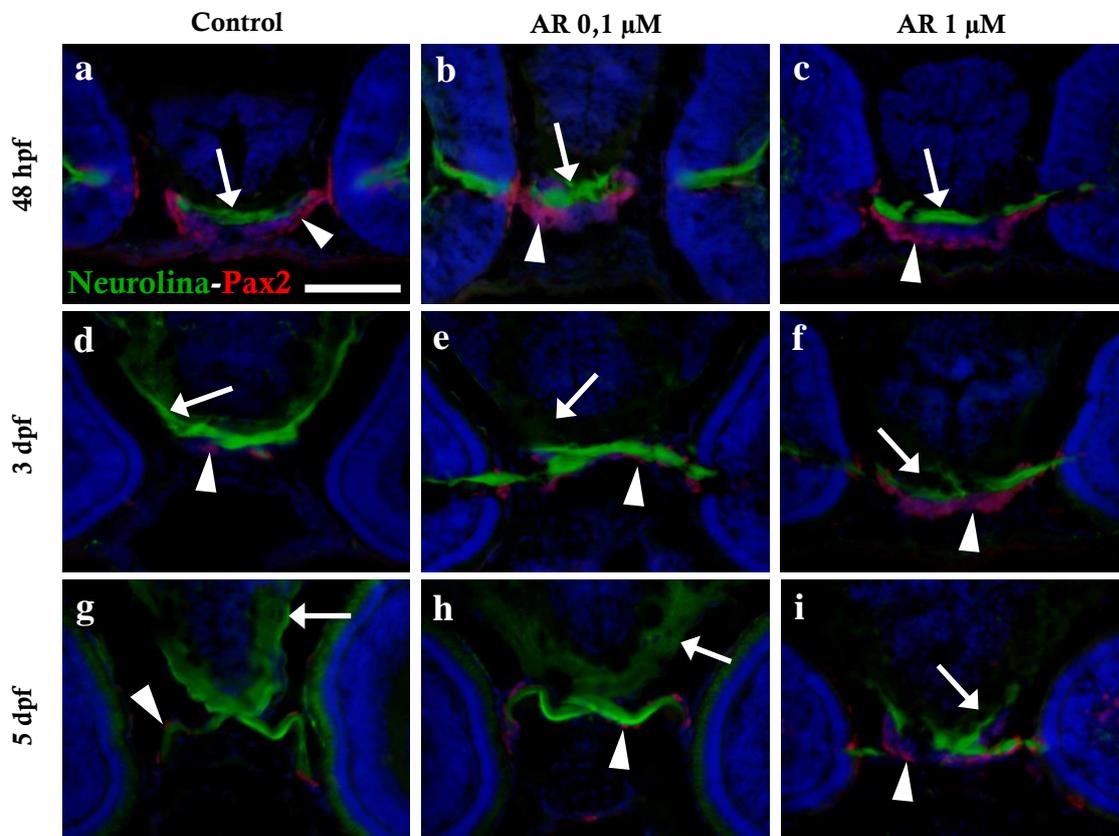


Figura 53: Patrón de distribución de Neurolina y Pax2 en el nervio óptico de animales control y tratados con AR. **a, b,c, d, e, g, h)** Los axones Neurolina positivos forman el quiasma (flecha en **a, d, g**) asociados a células Pax2 positivas del tallo óptico (cabeza de flecha en **a, d, g**). A los 3 y 5 dpf, en animales control y tratados con AR 0,1 μ M, los axones Neurolina positivos ascienden al techo óptico (flecha en **d, e, g, h**). El tallo óptico no está, y en su lugar quedan escasas células Pax2 positivas asociadas a los axones (cabeza de flecha en **d, e, g, h**). **f-i)** Los animales tratados con AR 1 μ M presentan nervios ópticos desorganizados, que no crecen más allá del quiasma (flecha en **f, i**), junto al que persiste el tallo óptico Pax2 positivo (cabeza de flecha en **f, i**). AR: ácido retinoico, dpf: días postfecundación, hpf: horas postfecundación. Barra de escala: 50 μ m.

En los animales control de 5 dpf (Fig. 53 g) las células Pax2 positivas están asociadas a los axones Neurolina positivos del nervio óptico, al igual que en los animales tratados con AR 0,1 μM (Fig. 53 h). En los tratados con AR 1 μM (Fig. 53 i), los axones están desorganizados y no crecen más allá del quiasma, donde hay células Pax2 positivas formando el tallo óptico.

Neurolina-a

Al haber detectado modificaciones en el marcaje para Neurolina tras el tratamiento con AR, analizamos la expresión de los genes *neurolina-a* y *neurolina-b* para intentar identificar si estaba alterada en alguno de ellos.

A las 48 hpf, la expresión de *neurolina-a* se localiza en las regiones central y vitreal de la retina, que corresponden con la CCG prospectiva, tanto en los embriones control como en los tratados con AR (Fig. 54 a, b, c). El patrón de expresión es el mismo, aunque en los embriones tratados con AR 0,1 μM la intensidad del marcaje parece mayor que en los otros dos grupos (Fig. 54 b).

En los animales de 3 dpf, la expresión de *neurolina-a* está restringida a la parte marginal de la CCG, formando un anillo con marcaje muy débil en los animales control (Fig. 54 d). Los animales tratados con AR 0,1 μM (Fig. 54 e) muestran un patrón de expresión de *neurolina-a* similar al de los controles, pero la anchura del anillo en la parte marginal de la CCG, así como la intensidad del marcaje, parecen mayores que en los animales control. En los animales tratados con AR 1 μM (Fig. 54 f), el patrón de expresión de *neurolina-a* tiene las mismas características que en los controles.

A los 5 dpf, en los animales control (Fig. 54 g), apenas se detecta marcaje para *neurolina-a* en los márgenes de la CCG. Sin embargo, en las retinas de los animales tratados con AR 0,1 μM (Fig. 54 h) persiste un marcaje en forma de anillo muy delgado en los márgenes de la CCG. En los animales tratados con AR 1 μM (Fig. 54 i) no detectamos expresión de *neurolina-a*.

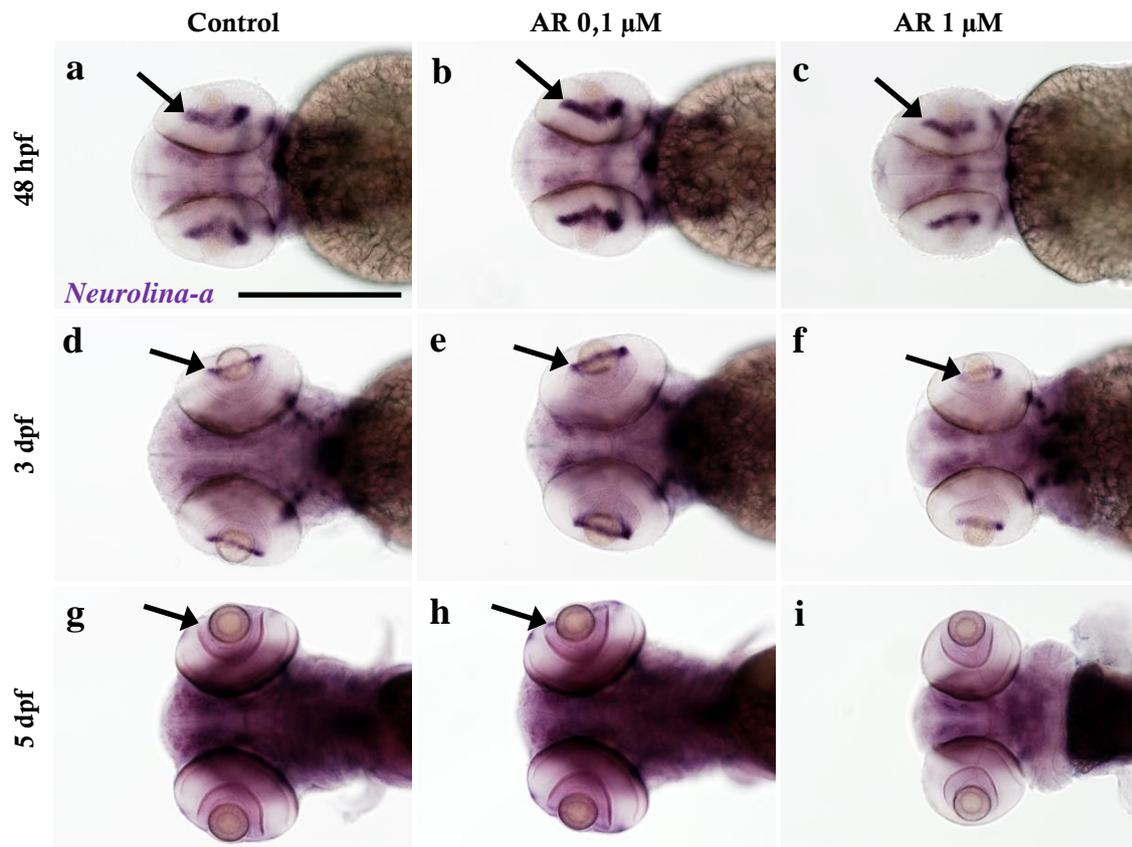


Figura 54: Patrón de expresión de *neurolina-a* en animales control y tratados con AR. Vistas ventrales. **a-c)** A las 48 hpf, tanto en los embriones control como en los tratados con AR, el marcaje para *neurolina-a* se localiza en la CCG prospectiva (flecha). **d-f)** A los 3 dpf, el marcaje se restringe a la región marginal de la CCG (flecha en **d, e, f**), y es más intenso en los animales tratados con AR 0,1 μM (**e**). **g-i)** A los 5 dpf, el marcaje en la región marginal de la CCG es muy débil en los controles (flecha en **g**), más intenso en los animales tratados con AR 0,1 μM (flecha en **h**), e inexistente en los tratados con AR 1 μM . AR: ácido retinoico, CCG: capa de las células ganglionares, dpf: días postfecundación, hpf: horas postfecundación. Barra de escala: 200 μm .

Neurolina-b

A las 48 hpf, la expresión de *neurolina-b* se localiza en la CCG prospectiva, tanto en los embriones control como en los tratados con AR (Fig. 55 a, b, c). En los embriones tratados con AR 1 μM la intensidad del marcaje parece mayor que en los otros dos grupos.

En los animales de 3 dpf, la expresión de *neurolina-b* está restringida a la región marginal de la CCG, formando un anillo con marcaje muy débil en los animales control (Fig. 55 d). Los animales tratados con AR 0,1 μM (Fig. 55 e), presentan también marcaje en la zona marginal de la CCG, pero más intenso en la región temporal que en la región

nasal. En los animales tratados con AR 1 μM (Fig. 55 f), la expresión de *neuroлина-b* se observa en toda la extensión de la CCG, y con mayor intensidad en la región temporal de la misma, si bien el marcaje es más débil que a las 48 hpf.

A los 5 dpf, el marcaje para *neuroлина-b* en los controles es muy débil (Fig. 55 g) y se localiza en los márgenes de la CCG. En los animales tratados con AR 0,1 μM (Fig. 55 h) es algo más intenso y en los tratados con AR 1 μM (Fig. 55 i) no detectamos expresión del gen.

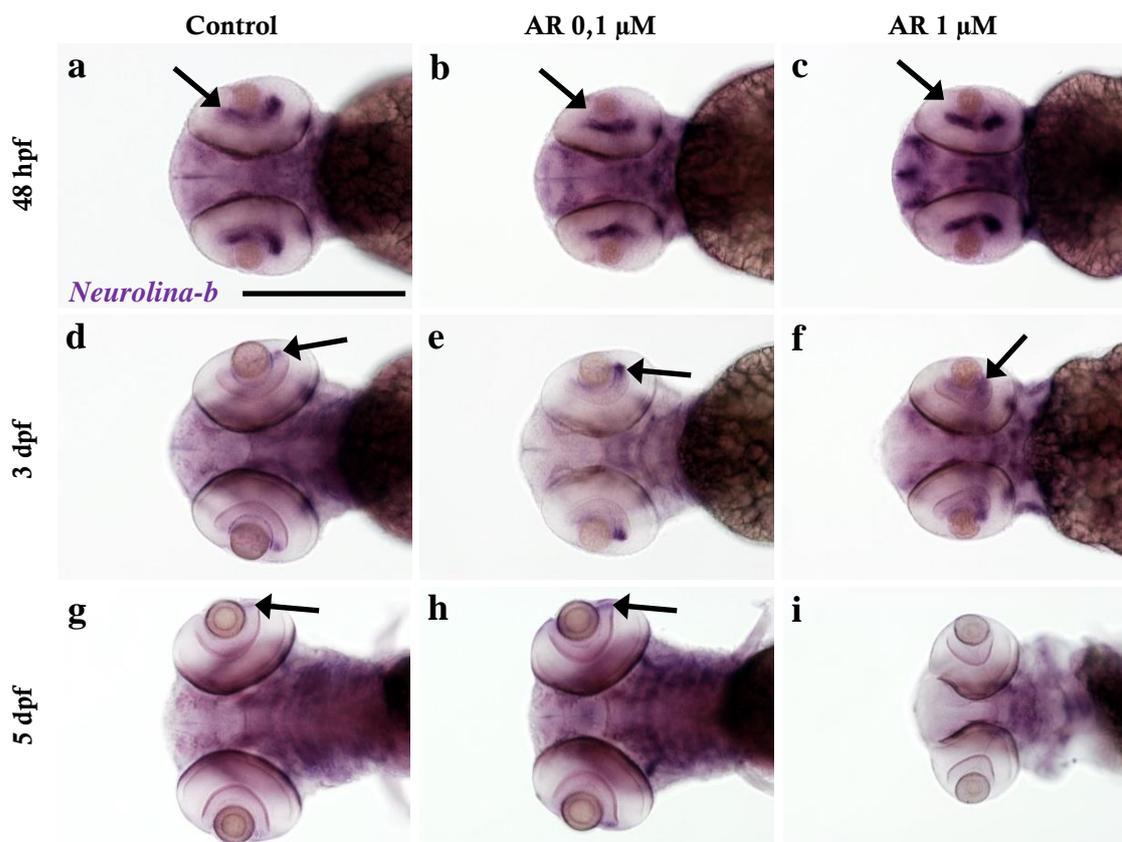


Figura 55: Patrón de expresión de *neuroлина-b* en animales control y tratados con AR. Vistas ventrales. **a-c)** A las 48 hpf, el marcaje para *neuroлина-b* se localiza en la CCG prospectiva (flecha). **d-f)** A los 3 dpf, el marcaje se restringe a la zona marginal de la CCG en los controles (flecha en **d**) y en los tratados con AR 0,1 μM , en los cuales es más intenso en la región temporal (flecha en **e**). En los tratados con AR 1 μM el marcaje se extiende por toda la CCG (flecha en **f**). **g-i)** A los 5 dpf, el marcaje en la región marginal de la CCG es muy débil en los controles (flecha en **g**), más intenso en los animales tratados con AR 0,1 μM (flecha en **h**), e inexistente en los tratados con AR 1 μM . AR: ácido retinoico, CCG: capa de las células ganglionares, dpf: días postfecundación, hpf: horas postfecundación. Barra de escala: 200 μm .

Pax2a

Tras observar que en los animales tratados con AR 1 μ M había numerosas células positivas para Pax2 dentro de la retina, así como en el tallo óptico persistente, realizamos la hibridación *in situ* para determinar si el tratamiento con AR estimulaba la expresión del gen *pax2a* o si la estimulación se producía en la síntesis de la proteína.

En los embriones control de 48 hpf (Fig. 56 a), la expresión de *pax2a* se localiza en el tallo óptico, así como en el límite entre el mesencéfalo y el rombencéfalo, *Midbrain-Hindbrain Boundary* (MHB), y a lo largo del rombencéfalo y la médula espinal. En los embriones tratados con AR (Fig. 56 b) encontramos un patrón de expresión de *pax2a* similar al de los controles, aunque en los tratados con AR 1 μ M (Fig. 56 c), el marcaje en las regiones encefálicas no está tan extendido como en los anteriores.

A los 3 dpf, tanto en los animales control (Fig. 56 d) como en los tratados con AR 0,1 μ M (Fig. 56 e) la expresión de *pax2-a* se localiza en el nervio óptico, en el MHB, en el rombencéfalo y en la médula espinal. En los animales tratados con AR 1 μ M (Fig. 56 f), el marcaje para *pax2-a* se localiza en la retina y en el tallo óptico, y también dentro del techo óptico. Además, en el MHB y el rombencéfalo, el marcaje es similar al de las 48 hpf.

A los 5 dpf, en los controles (Fig. 56 g) y en los animales tratados con AR 0,1 μ M (Fig. 56 h), el patrón de expresión de *pax2a* es similar al de 3 dpf. En los embriones tratados con AR 1 μ M (Fig. 56 i), hay expresión de *pax2-a* en la retina y el tallo óptico, así como en el techo óptico.

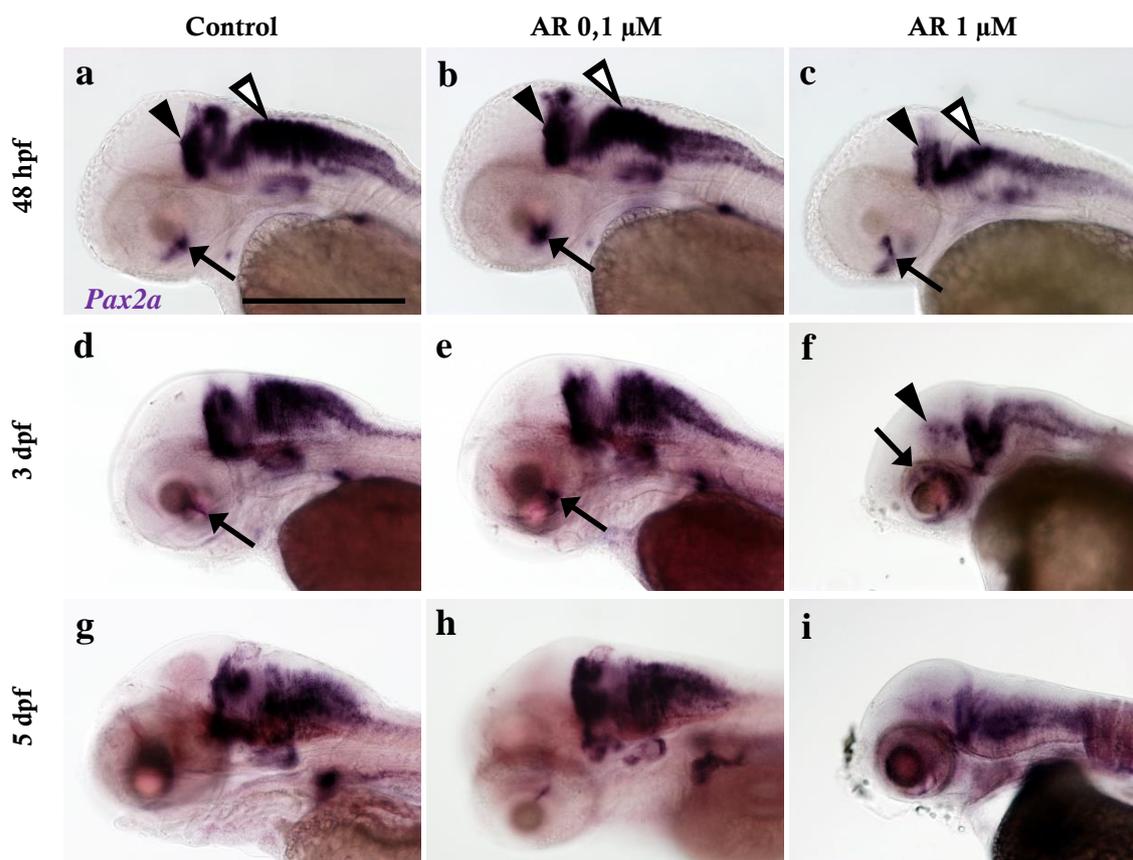


Figura 56: Patrón de expresión de *pax2a* en animales control y tratados con AR. Vistas laterales. **a-c)** A las 48 hpf, *pax2a* se expresa en el tallo óptico (flecha), el MHB (cabeza de flecha) y el rombencéfalo (cabeza de flecha hueca). **d-f)** A los 3 dpf, el marcaje para *pax2a* se localiza en el nervio óptico (flecha en **d, e**), y en las mismas regiones encefálicas que a las 48 hpf. En los animales tratados con AR 1 μM , además hay marcaje en la retina (flecha en **f**) y el techo óptico (cabeza de flecha en **f**). **g-i)** A los 5 dpf, el patrón de expresión de *pax2a* es similar al de 3 dpf. AR: ácido retinoico, dpf: días postfecundación, hpf: horas postfecundación, MHB: *Midbrain-Hindbrain Boundary*. Barra de escala: 200 μm .

Identidad de las células Pax2 positivas

Ya que tras el tratamiento con AR 1 μM entre las 24 y las 48 hpf, detectamos la presencia de células positivas para Pax2 dentro de la retina a los 3 y 5 dpf, y no en las retinas de animales que han seguido un desarrollo normal, quisimos saber la identidad de las mismas. Para ello realizamos inmunohistoquímicas dobles: frente a Pax2-GS, para saber si los núcleos Pax2 positivos corresponden a células de Müller; Pax2-GFAP, para saber si se trata de astrocitos que estén produciendo una reacción glial frente al daño en la retina, y Pax2-CR, para determinar si se trata de neuronas en lugar de células gliales. Como el animal se encuentra muy dañado por el tratamiento a los 5 dpf, elegimos estudiar

la identidad de dichas células en el estadio de 3 dpf, tanto en la retina como en el techo óptico.

Tras el análisis de las imágenes de la retina y del encéfalo de los animales de 3 dpf tratados con AR 1 μ M, no hemos encontrado núcleos Pax2 positivos cuyo cuerpo celular sea también positivo para GS, GFAP o CR.

La inmunohistoquímica frente a Pax2-GS muestra que los núcleos Pax2 positivos se distribuyen en la retina entre las células GS positivas sin que en ningún caso encontremos aparente colocalización (Fig. 58 a). En el techo óptico encontramos que los núcleos Pax2 positivos están agrupados en dos regiones situadas ventralmente respecto a los ventrículos laterales, que se adentran en ambos hemisferios tectales. Además, hay algunos núcleos Pax2 positivos en la región dorsal del techo óptico. Alrededor de estos núcleos se disponen procesos celulares GS positivos, correspondientes a la glía radial, distribuida de manera que sus núcleos se sitúan junto a la región ventral de los ventrículos laterales y a ambos lados del ventrículo que se sitúa en la línea media del diencéfalo (Fig. 58 b).

La inmunohistoquímica frente a Pax2-GFAP no revela que las células positivas para Pax2 lo sean también para GFAP. En la retina (Fig. 58 c), el marcaje para GFAP se localiza exclusivamente en los procesos vitreales de las células de Müller. Sin embargo, en el encéfalo (Fig. 58 d), el marcaje para GFAP se encuentra en numerosos procesos celulares de la región ventral del techo óptico y del diencéfalo, y no se encuentra durante el desarrollo normal de los embriones. Las células positivas para Pax2 se disponen entre estos procesos GFAP positivos, que corresponden a la glía radial.

El marcaje para Pax2-CR nos muestra que los núcleos positivos para Pax2 se encuentran dispersos entre las células CR positivas dentro de la retina (Fig. 58 e). En el techo óptico (Fig. 58 f) hay algunas células CR positivas en los hemisferios tectales, así como algunas fibras que ascienden hacia el techo pero, al igual que en la retina, tampoco detectamos solapamiento del marcaje para ambos marcadores.

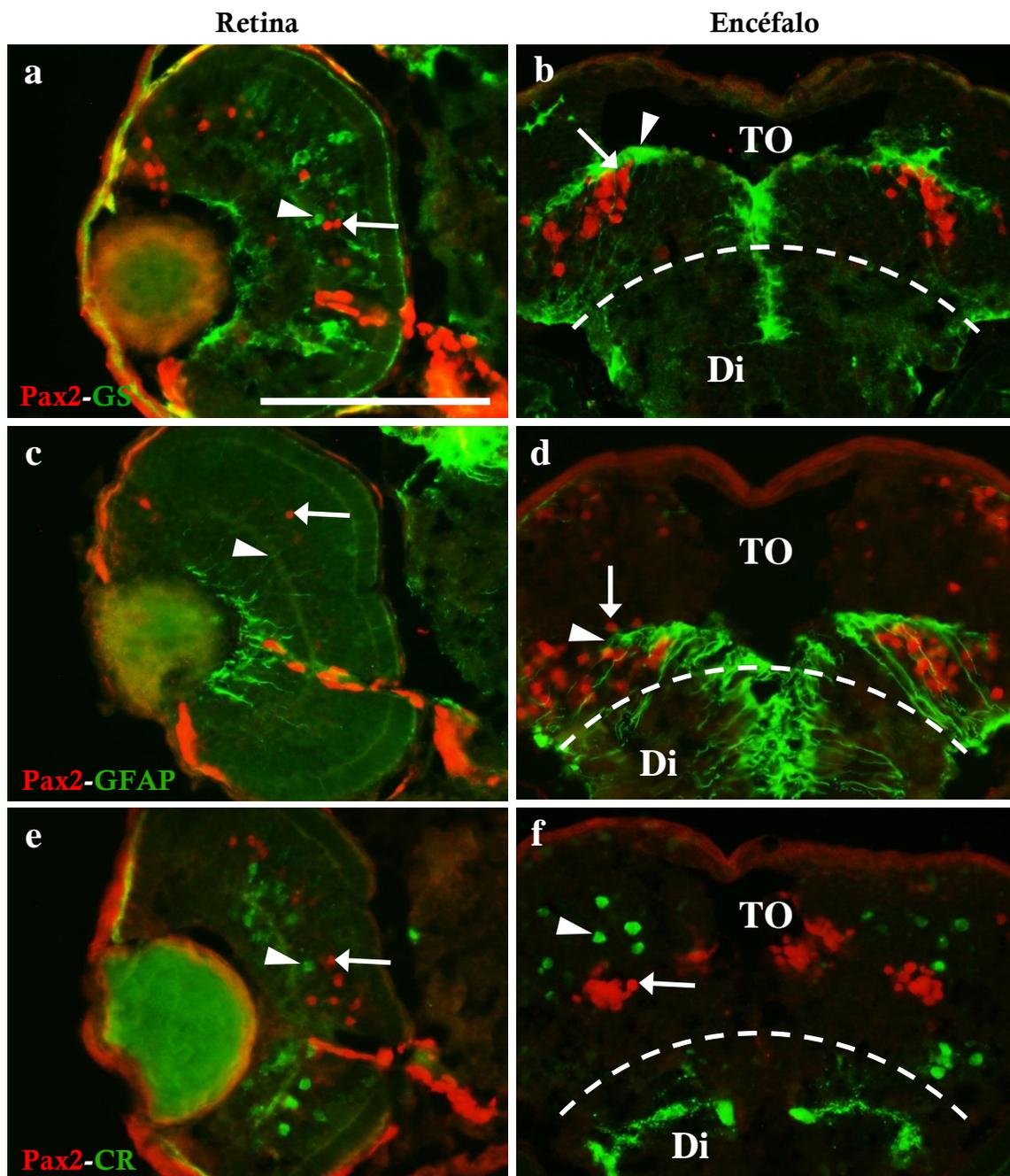


Figura 58: Patrón de distribución de Pax2, GS, GFAP y CR en retina (**a, c, e**) y techo óptico (**b, d, f**) de animales tratados con AR. **a, b**) Los núcleos Pax2 positivos (flecha en **a, b**) se sitúan entre los procesos de las células de Müller (cabeza de flecha en **a**) y la glía radial del TO (cabeza de flecha en **b**). **c, d**) Las células Pax2 positivas de la retina y el TO (flecha en **c, d**) no corresponden a los procesos GFAP positivos de las células de Müller (cabeza de flecha en **c**) ni de la glía radial del TO (cabeza de flecha en **d**). **e, f**) Las células Pax2 positivas de la retina y el TO (flecha en **e, f**) no son CR positivas (cabeza de flecha en **e, f**). AR: ácido retinoico, DI: diencéfalo, dpf: días postfecundación, hpf: horas postfecundación TO: techo óptico. Barra de escala: 100 μ m.

Slit2

La presencia de proyecciones inmunorreactivas para Neurolina dentro de la CNI, así como la aparente falta de marcaje para esta proteína en los axones más allá del quiasma en los animales tratados con AR 1 μ M, podrían deberse a algún defecto en la guía axonal. Además, la presencia de marcaje para Pax2 dentro de la retina, una proteína que típicamente se encuentra en células gliales que se asocian a los axones del nervio óptico, también sugiere algún fallo en la asociación axón-glía, necesaria para el crecimiento y guía axonal. Para intentar demostrarlo, analizamos mediante hibridación *in situ* la expresión de *slit2*, una molécula que está implicada en la guía axonal.

La expresión de *slit2* en embriones control de 48 hpf (Fig. 57 a) se localiza en los márgenes de la retina, en una banda de la región central de la misma, a ambos lados de la CPI que está empezando a formarse, y también en algunas células del nervio óptico. Además, hay expresión de *slit2* en diferentes regiones del encéfalo situadas en posición medial. Los embriones tratados con AR (Fig. 57 b, c) muestran el mismo patrón de expresión del gen.

A los 3 dpf, los embriones control (Fig. 57 d) expresan *slit2* en la ZPG, así como en la CPI, en la CCG y en la parte vitreal de la CNI. No hay marcaje para este gen en las células del nervio óptico. En los animales tratados con AR (Fig. 57 e, f) el marcaje en la ZPG es muy débil, pero se mantiene sin cambios en el resto de la retina. Tampoco detectamos marcaje en el nervio óptico.

A los 5 dpf, en los animales control (Fig. 57 g) el patrón de expresión es similar al de los animales de 3 dpf. En los tratados con AR (Fig. 57 h, i) hay una gran reducción de la intensidad del marcaje para *slit2* en todo el encéfalo, y apenas detectamos la expresión del gen en la retina.

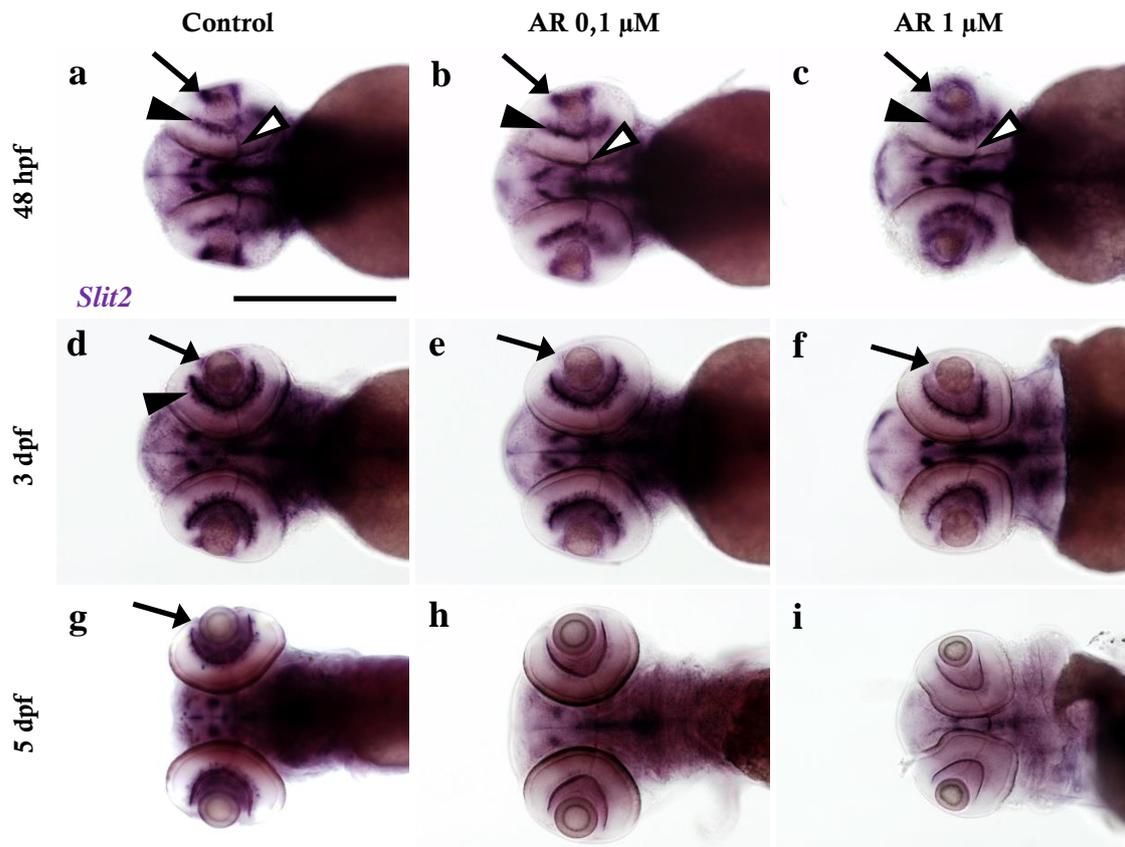


Figura 57: Expresión de *slit2* en animales control y tratados con AR. Vistas ventrales. **a-c)** A las 48 hpf, *slit2* se expresa en los márgenes (flecha) y la región central de la retina (cabeza de flecha), y en células del nervio óptico (cabeza de flecha hueca). **d-f)** A los 3 dpf, la expresión de *slit2* en los controles se localiza en la ZPG (flecha en **d**), en la CPI, en la CCG y en la zona vitreal de la CNI (cabeza de flecha en **d**). En los tratados con AR el marcaje para *slit2* en la ZPG es muy débil (flecha en **e, f**). **g-i)** A los 5 dpf, el marcaje en la ZPG es reducido (flecha en **g**). En los tratados con AR el marcaje es muy débil en toda la retina (**h, i**). AR: ácido retinoico, CCG: capa de las células ganglionares, CNI: capa nuclear interna, CPI: capa plexiforme interna, dpf: días postfecundación, hpf: horas postfecundación, ZPG: zona periférica germinal. Barra de escala: 200 μm .

Efectos del tratamiento con DEAB entre las 24 y 48 hpf

Para conocer los efectos de la deficiencia de AR en la retinogénesis embrionaria expusimos a los embriones, entre las 24 y las 48 hpf, a tres concentraciones diferentes de DEAB: 5, 10 y 20 μM . El DEAB es un inhibidor de las enzimas raldhs, que sintetizan el AR. Decidimos estudiar el efecto de esta exposición a los 3 dpf, que es cuando se observan las principales alteraciones producidas por el tratamiento con AR 1 μM , para comparar los resultados del tratamiento con AR y el tratamiento con DEAB. No incluimos la edad de 5 dpf para los estudios neuroquímicos, ya que los animales tratados presentan graves alteraciones a esa edad. La concentración de DEAB empleada para los estudios de neurogénesis y diferenciación fue de 20 μM , ya que era la que producía un fenotipo similar al tratamiento con AR 1 μM , con edemas pericárdicos y microftalmia.

Tamaño de la retina

La exposición de los embriones a DEAB 20 μM , entre las 24 y las 48 hpf, produce una reducción del tamaño de la retina a los 3 dpf respecto a los animales control expuestos a la misma concentración de DMSO, que es donde se solubiliza el DEAB (Fig. 59).

El resultado del número de células positivas para cada marcador se expresará en relación al área de la sección de retina donde fueron contadas, al igual que en los conteos realizados en los animales tratados con AR.

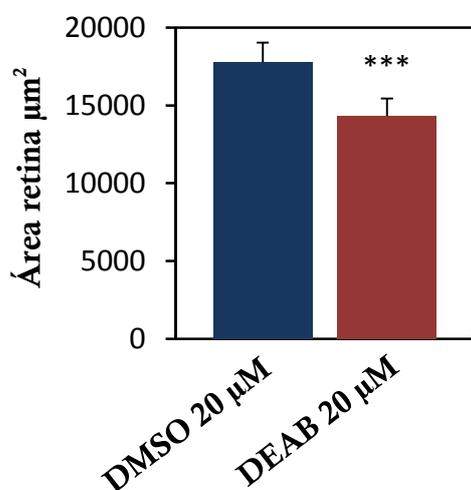


Figura 59: Representación gráfica que muestra la reducción del tamaño de la retina a los 3 dpf de los animales tratados con DEAB respecto a los controles tratados con la misma cantidad de DMSO.

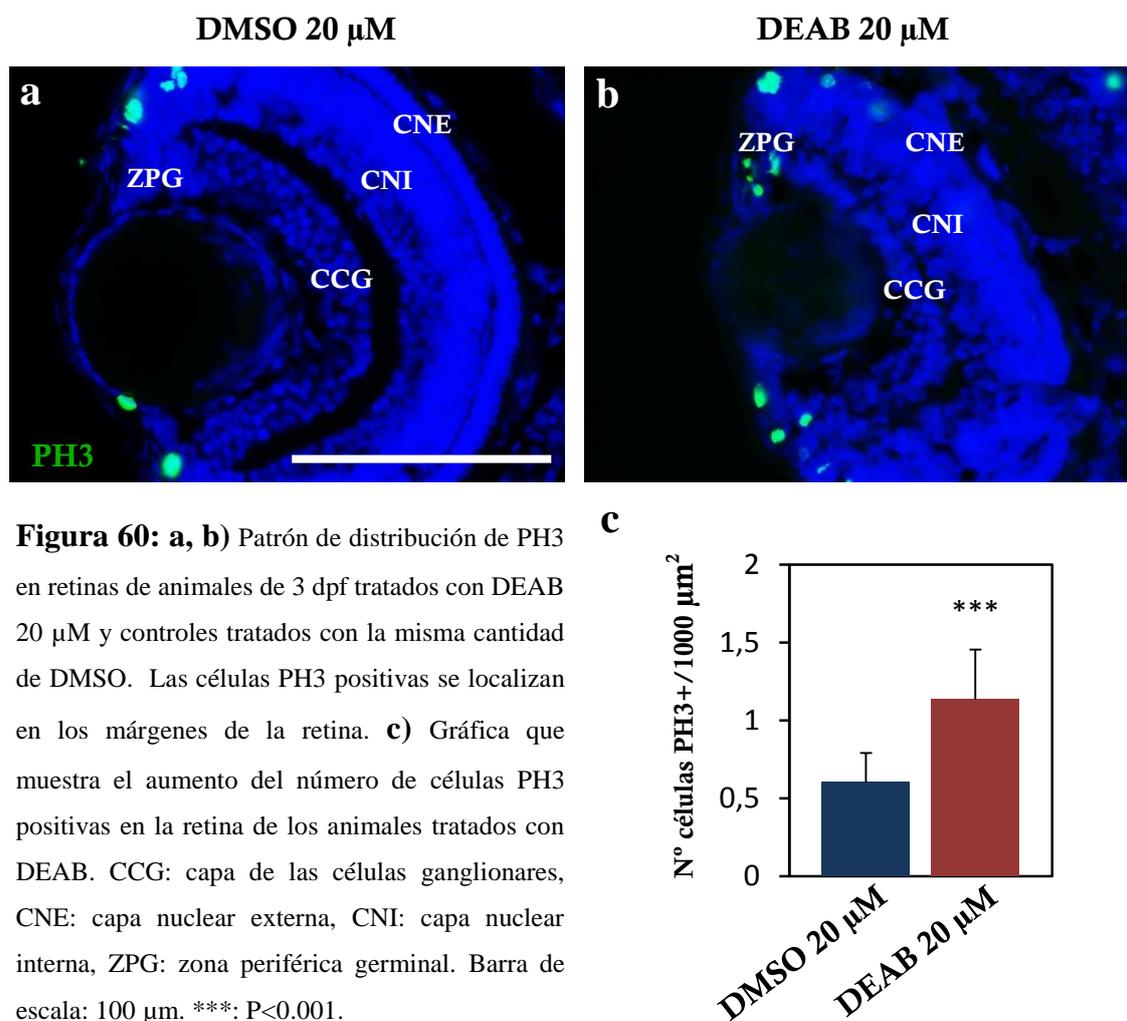
***: $P < 0.001$.

Neurogénesis

Para estudiar el efecto del tratamiento con DEAB en la neurogénesis retiniana analizamos la proliferación celular mediante la técnica inmunohistoquímica para PH3, así como la distribución de células inmunorreactivas para Pax6 y Sox2.

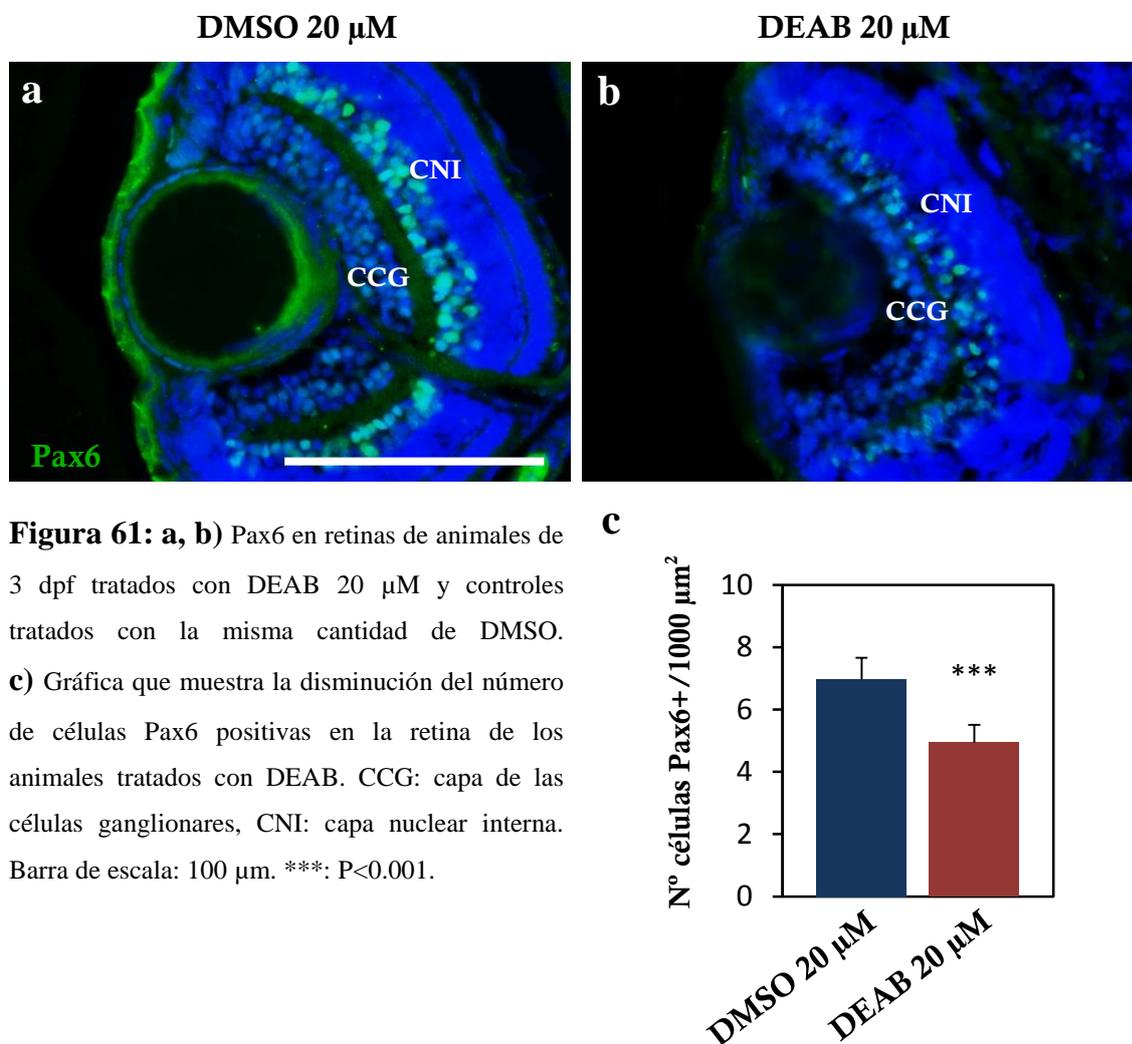
PH3

La exposición a DEAB 20 μM entre las 24 y las 48 hpf no afecta al patrón de distribución de las células positivas para PH3, que se localizan en los márgenes de la retina, tanto en la ZPG como en la CNI y la CNE (Fig. 60 a, b). Sin embargo, el número de células PH3 positivas es mayor en los animales tratados con DEAB (Fig. 60 c).



Pax6

La distribución de las células positivas para Pax6 no se ve afectada por el tratamiento con DEAB, y estas células se encuentran en la CCG y en la parte vitreal de la CNI (Fig. 61 a, b). No obstante, tras realizar el conteo de las células Pax6 positivas, apreciamos que hay una disminución de las mismas en los animales tratados con DEAB respecto a los controles (Fig. 61 c). Además, aunque no lo hemos cuantificado, observamos una aparente reducción en la intensidad del marcaje para esta proteína en toda la retina de los animales tratados con DEAB.



Sox2

En los animales control expuestos a DMSO 20 μM (Fig. 62 a), las células positivas para Sox2 se localizan en la ZPG, en la región escleral de la CCG dispuestas en una hilera junto a la CPI, en la región vitreal de la CNI formando una hilera junto a la CPI, en la región central de la CNI y también en el nervio óptico. Sin embargo, en los animales tratados con DEAB 20 μM (Fig. 62 b) se produce una drástica reducción de la inmunorreactividad para esta proteína, de manera que sólo algunas secciones de retina de algunos individuos mostraban alguna célula positiva para Sox2, dispuesta junto a la CPI (Fig. 62 c).

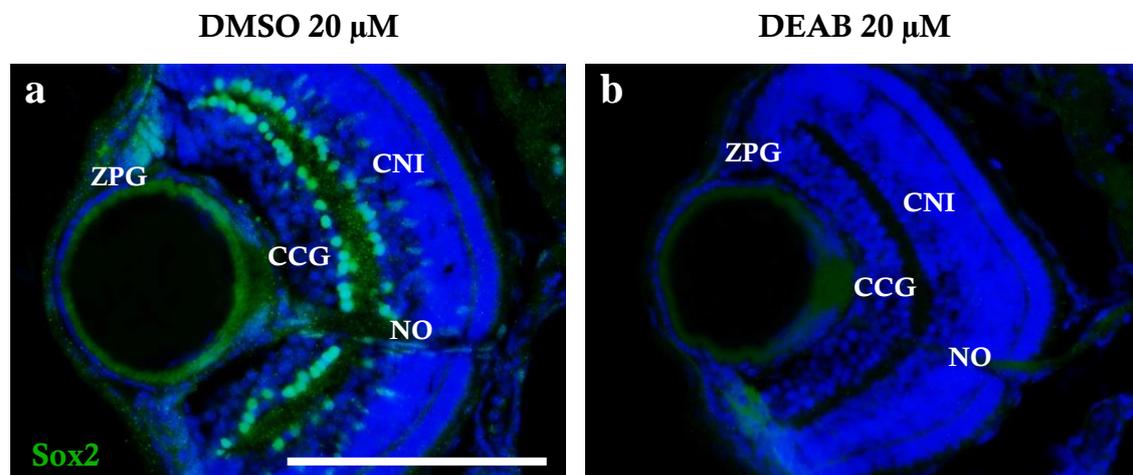
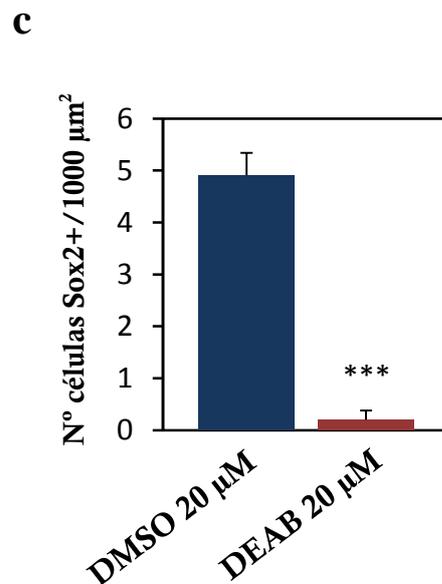


Figura 62: a, b) Distribución de Sox2 en retinas de animales de 3 dpf tratados con DEAB 20 μM y controles tratados con la misma cantidad de DMSO. c) Gráfica que muestra la reducción de células Sox2 positivas en la retina de los animales tratados con DEAB. CCG: capa de las células ganglionares, CNI: capa nuclear interna, NO: nervio óptico, ZPG: zona periférica germinal. Barra de escala: 100 μm . ***: $P < 0.001$.



Diferenciación celular

CR

El patrón de distribución de CR en la retina no difiere entre los animales tratados con DEAB y los controles (Fig. 63 a, b). En ambos grupos, las células positivas para CR se encuentran distribuidas por toda la CCG. También observamos células positivas para CR distribuidas en la parte vitreal de la CNI. Los axones de las células de la CCG, también son inmunorreactivos para CR, pero en los tratados con DEAB el marcaje es tan débil que casi no se aprecia el nervio óptico. El conteo nos muestra que hay una reducción del número de células positivas para CR en los animales tratados con DEAB (Fig. 63 c).

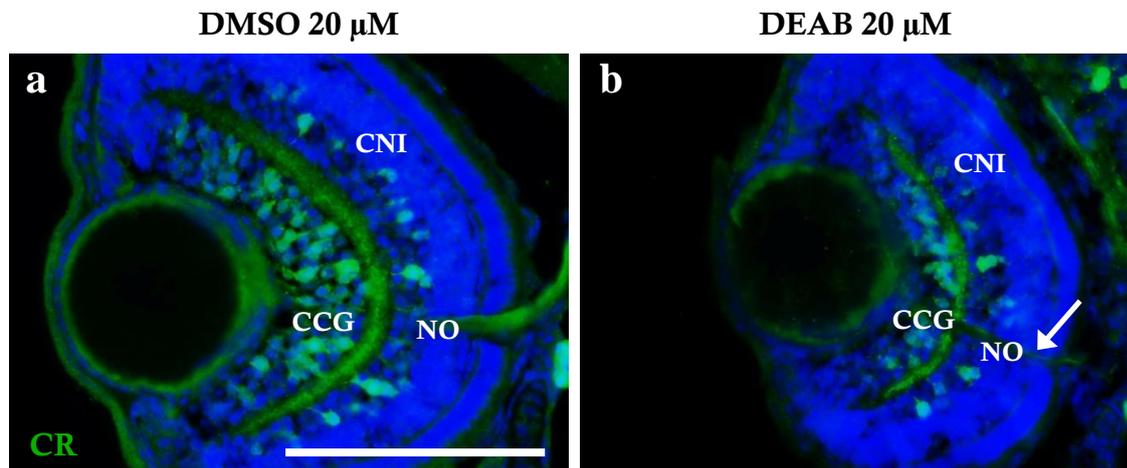
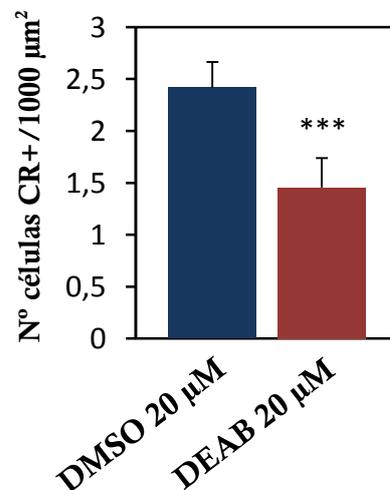


Figura 63: a, b) Distribución de CR en retinas de animales de 3 dpf tratados con DEAB 20 μM y controles tratados con la misma cantidad de DMSO. En los animales tratados con DEAB el marcaje es más escaso (flecha en **b**). **c)** Gráfica que muestra la reducción del número de células CR positivas en la retina de los animales tratados con DEAB. CCG: capa de las células ganglionares, CNI: capa nuclear interna, NO: nervio óptico. Barra de escala: 100 μm .

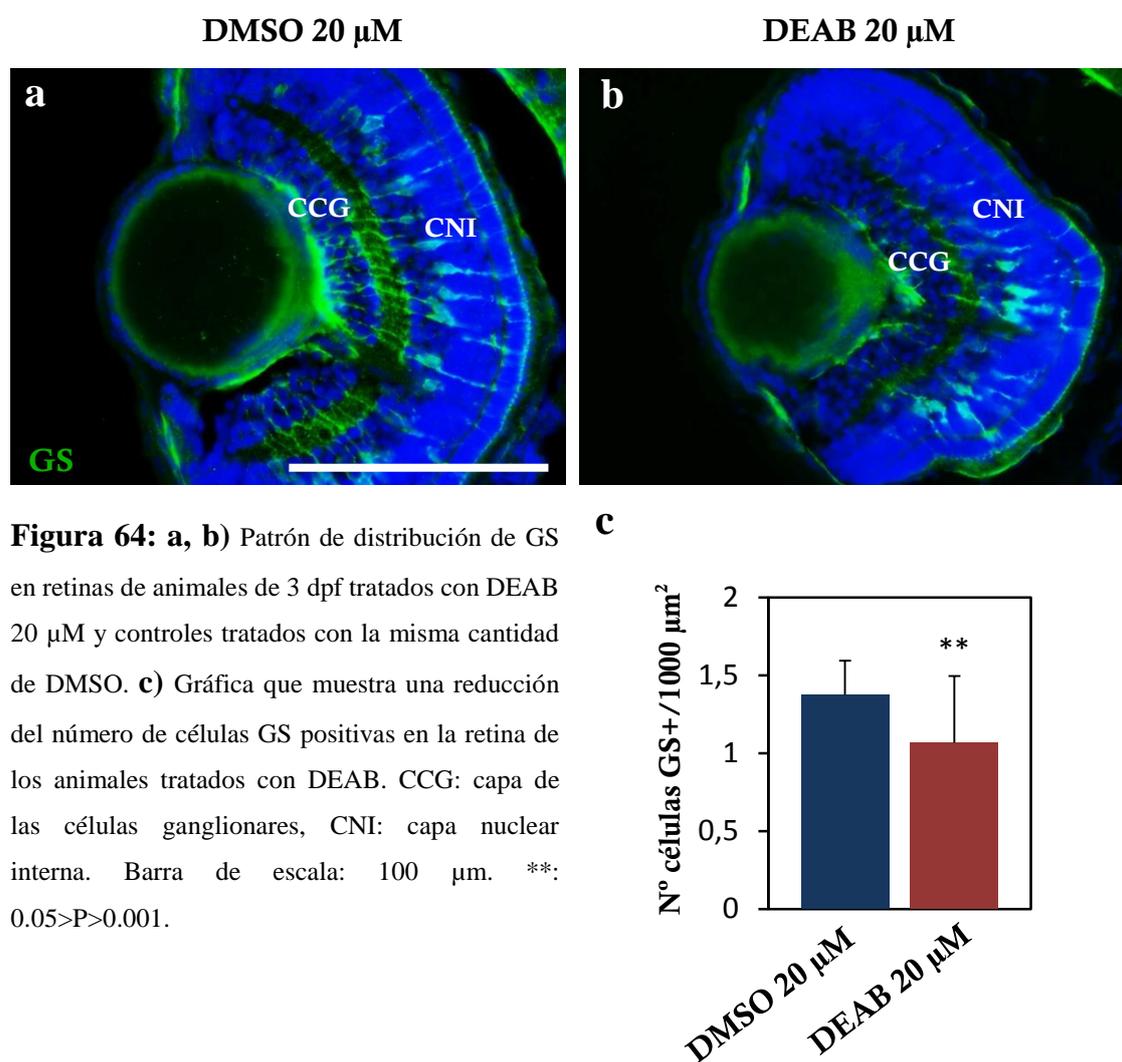
***: $P < 0.001$.

c)



GS

La inmunorreactividad para GS se localiza en los cuerpos celulares de las células de Müller, situados en una hilera en el centro de la CNI, así como en sus procesos tanto esclerales como vitreales, en ambos grupos experimentales (Fig. 64 a, b). No obstante, en los animales tratados con DEAB, la extensión que ocupan las células de Müller a lo largo de la CNI es menor, debido a que estas células son menos numerosas (Fig. 64 c).



GFAP

En los animales control (Fig. 65 a), la inmunorreactividad para GFAP se localiza en los procesos vitreales de las células de Müller. Estos procesos nacen del cuerpo celular, situado en la región central de la CNI, y atraviesan de forma radial la CCG para unirse y formar la membrana limitante interna en la región más vitreal de la retina. En los animales tratados con DEAB (Fig 65 b), la membrana limitante interna sí es inmunorreactiva para GFAP, aunque no en toda su extensión, y el marcaje en los procesos de las células de Müller es muy reducido o inexistente, de forma que sólo se identifica la parte más vitreal de algunos procesos positivos para GFAP.

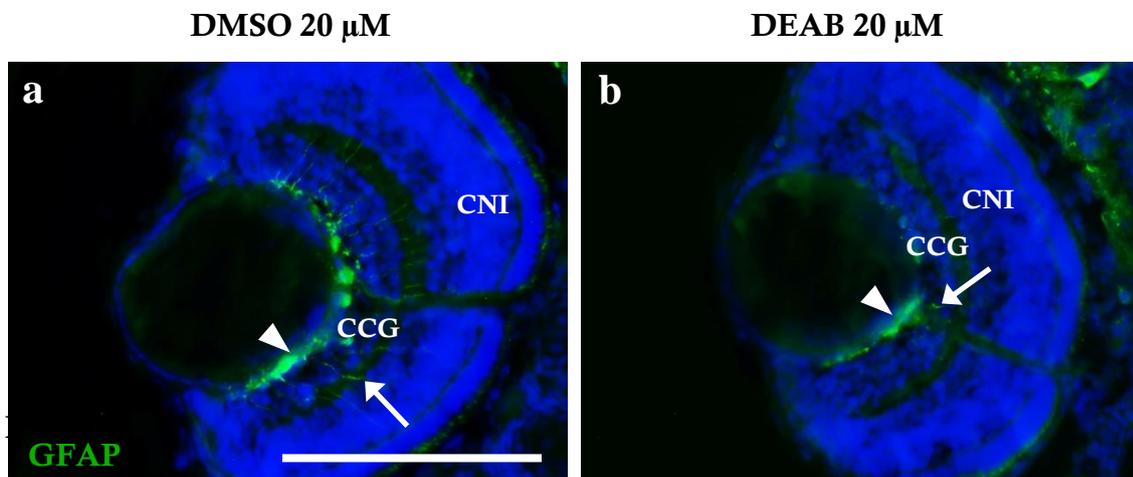


Figura 65: GFAP en retinas de animales de 3 dpf tratados con DEAB 20 µM y controles tratados con la misma cantidad de DMSO. Procesos vitreales de las células de Müller (flecha), que forman la membrana limitante interna (cabeza de flecha). CCG: capa de las células ganglionares, CNI: capa nuclear interna. Barra de escala: 100 µm.

Nervio óptico

Neurolina-Pax2

En la retinas de ambos grupos de animales, la Neurolina se encuentra en la membrana de las células ganglionares, así como en los axones de dichas células. En los animales control (Fig. 66 a), el marcaje para Neurolina se encuentra predominantemente en los márgenes de la CCG, mientras que en los tratados con DEAB (Fig. 66 b) está distribuido por toda la CCG. Los axones del nervio óptico positivos para Neurolina están asociados a células positivas para Pax2 desde que nacen en la CCG hasta que forman el quiasma óptico, sin que haya diferencias en el marcaje para Neurolina o Pax2 entre ambos grupos (Fig. 66 c, d).

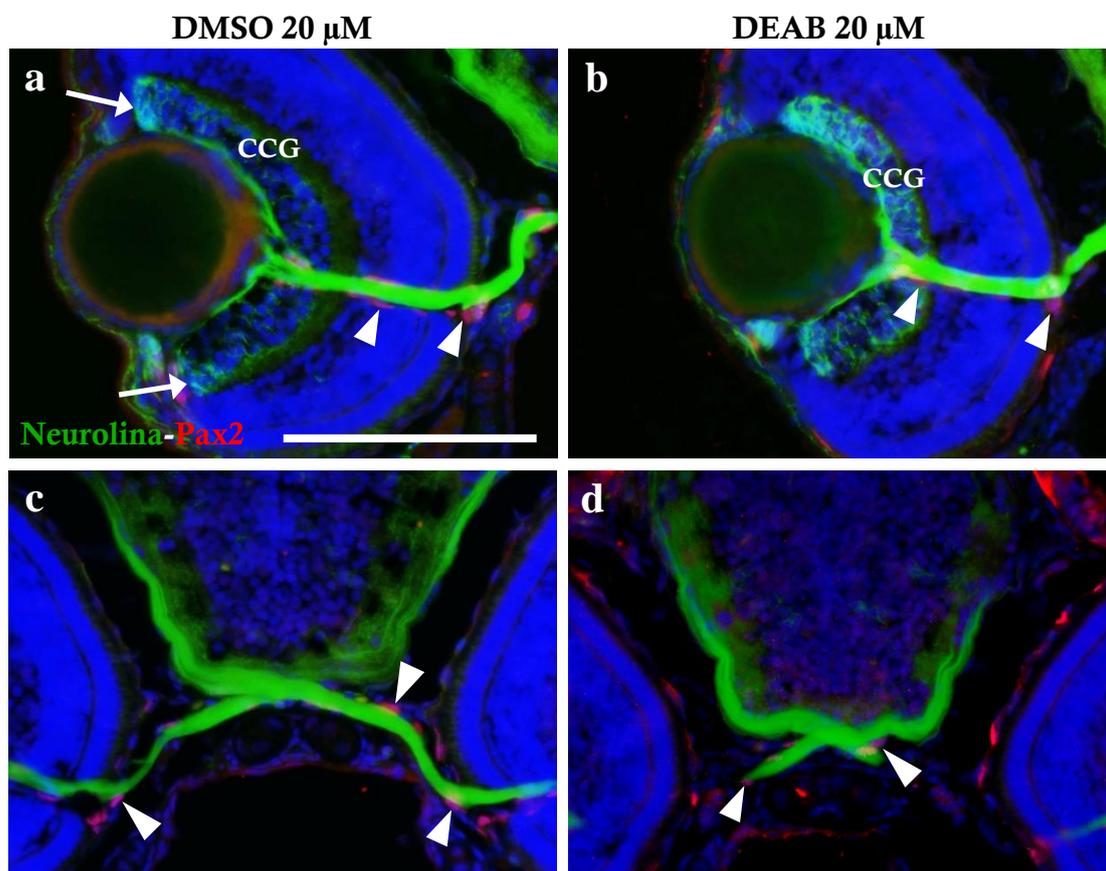


Figura 66: Distribución de Neurolina y Pax2 en animales de 3 dpf tratados con DEAB 20 μ M y controles tratados con la misma cantidad de DMSO. **a, b)** En las retinas de ambos grupos, la Neurolina se encuentra en la CCG, más restringida a los márgenes en las retinas control (flechas en **a**), así como en los axones del nervio óptico, a los que están asociados las células Pax2 positivas (cabezas de flecha en **a, b**). **c, d)** Axones positivos para Neurolina formando el quiasma óptico, asociados a células Pax2 positivas (cabezas de flecha en **c, d**). CCG: capa de las células ganglionares. Barra de escala: 100 μ m.

Efectos del tratamiento con AGN entre las 24 y 48 hpf

Una alternativa para estudiar los efectos de la deficiencia de AR en la retinogénesis embrionaria fue exponer a los embriones, entre las 24 y las 48 hpf, a tres concentraciones diferentes de AGN: 5, 10 y 20 μM . El AGN es un potente inhibidor de los receptores nucleares del AR. Del mismo modo que en el caso de los experimentos con DEAB, limitamos el estudio al efecto de la exposición a los 3 dpf. La concentración de AGN que decidimos emplear para los estudios de neurogénesis y diferenciación fue de 10 μM , ya que era la que producía un fenotipo similar al tratamiento con AR 1 μM . Los animales tratados con menor concentración de AGN eran aparentemente normales y los tratados con 20 μM presentaban demasiadas alteraciones corporales.

Tamaño de la retina

La exposición de los embriones a AGN 10 μM , entre las 24 y las 48 hpf, produce una reducción del tamaño de la retina a los 3 dpf respecto a los animales control expuestos a la misma concentración de DMSO (Fig. 67).

El resultado del número de células positivas para cada marcador se expresará en relación al área de la sección de retina donde fueron contadas dichas células, al igual que en los conteos realizados en los animales tratados con AR y DEAB.

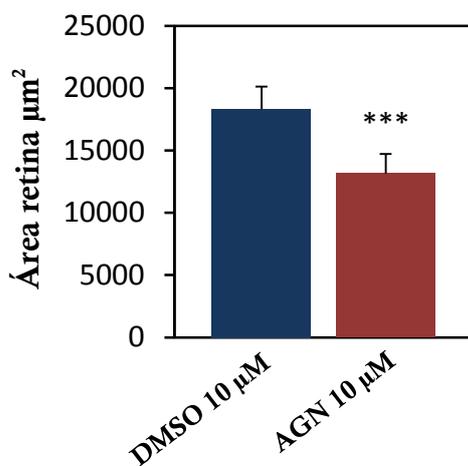


Figura 67: Gráfica que muestra la reducción del tamaño de la retina a los 3 dpf de los animales tratados con AGN respecto a los controles tratados con la misma cantidad de DMSO. ***: $P < 0.001$.

Neurogénesis

Para estudiar el efecto del tratamiento con AGN sobre la neurogénesis de la retina, analizamos la proliferación celular mediante la inmunohistoquímica para PH3, así como la distribución de células inmunorreactivas para Pax6 y Sox2.

PH3

En los animales control expuestos a DMSO 10 μ M, las células PH3 positivas se localizan predominantemente en la ZPG (Fig. 68 a). En los animales expuestos a AGN 10 μ M también hay células positivas para PH3, distribuidas a lo largo de la región dorsal de la CNE (Fig. 68 b). El número de células PH3 positivas es mayor en la retina de los animales tratados con AGN (Fig. 68 c).

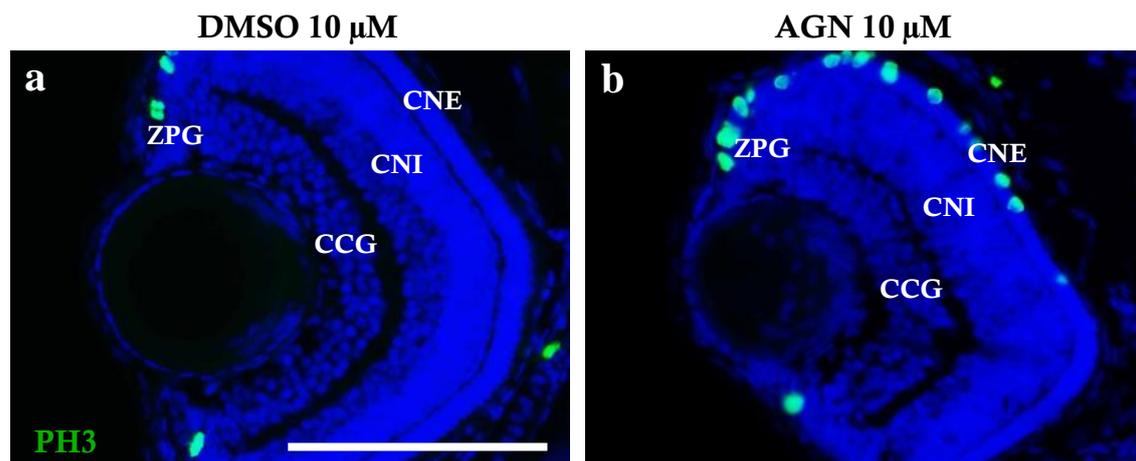


Figura 68: a, b) Distribución de PH3 en retinas de animales de 3 dpf tratados con AGN 10 μ M y controles tratados con la misma cantidad de DMSO. **a)** En los animales control, las células PH3 positivas se localizan en la ZPG. **b)** En los tratados con AGN, también hay células PH3 positivas en la región dorsal de la CNE. **c)** Gráfica que muestra el aumento del número de células PH3 positivas en la retina de los animales tratados con AGN. CCG: capa de las células ganglionares, CNE: capa nuclear externa, CNI: capa nuclear interna, ZPG: zona periférica germinal. Barra de escala: 100 μ m. **: 0.05 > P > 0.001.

Pax6

La distribución de las células positivas para Pax6 no se ve afectada por el tratamiento con AGN, y estas células se distribuyen por la CCG y en la parte vitreal de la CNI (Fig. 69 a, b). Al realizar el conteo de las células Pax6 positivas, apreciamos una disminución de las mismas en los animales tratados con AGN respecto a los controles (Fig. 69 c). Además, aunque no lo hemos cuantificado, observamos una reducción en la intensidad del marcaje para esta proteína en toda la retina de los animales tratados con AGN.

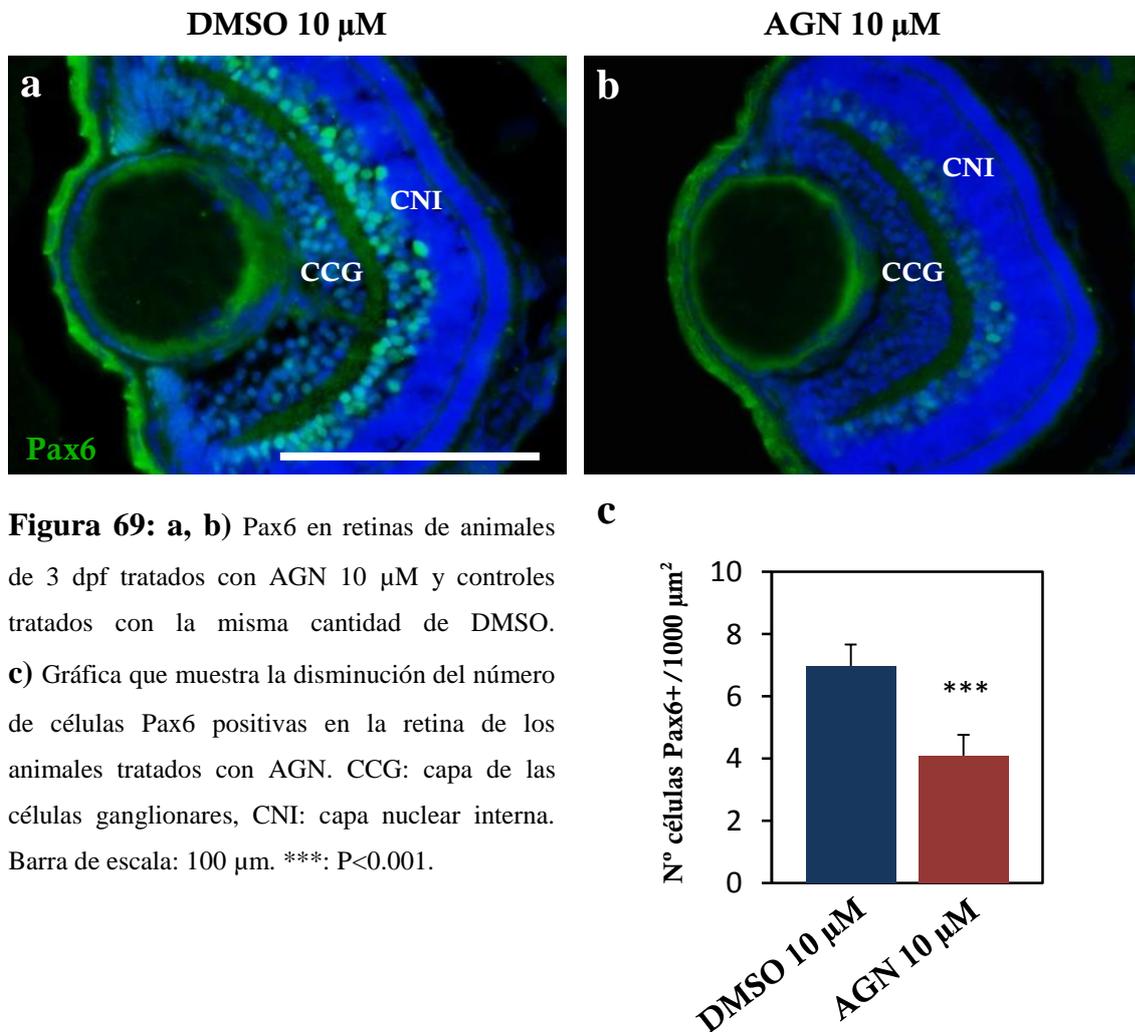


Figura 69: a, b) Pax6 en retinas de animales de 3 dpf tratados con AGN 10 μ M y controles tratados con la misma cantidad de DMSO. c) Gráfica que muestra la disminución del número de células Pax6 positivas en la retina de los animales tratados con AGN. CCG: capa de las células ganglionares, CNI: capa nuclear interna. Barra de escala: 100 μ m. ***: P<0.001.

Sox2

En los animales control expuestos a DMSO (Fig. 70 a), las células positivas para Sox2 se localizan en la ZPG, dispuestas en una hilera junto a la CPI en la región escleral de la CCG, formando una hilera junto a la CPI en la parte vitreal de la CNI, en la región central de la CNI y también en el nervio óptico. En los animales tratados con AGN (Fig. 70 b) se observa la misma distribución de células, pero no hemos visto células Sox2 positivas en el nervio óptico. Además, se observan algunas células positivas en diferentes posiciones dentro de la región escleral de la CNI. Tras el conteo de las células inmunorreactivas para Sox2, comprobamos que aumenta la densidad de éstas en los animales tratados con AGN (Fig. 70 c).

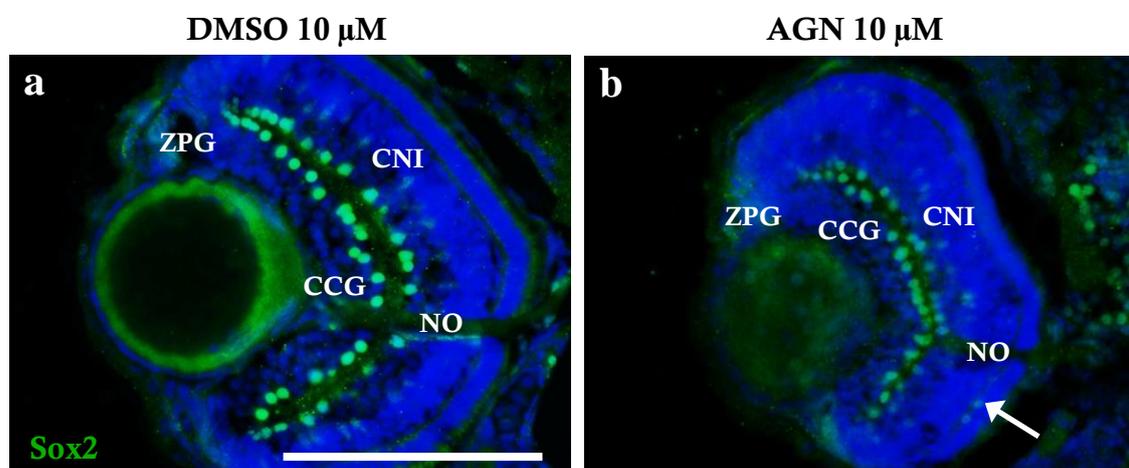
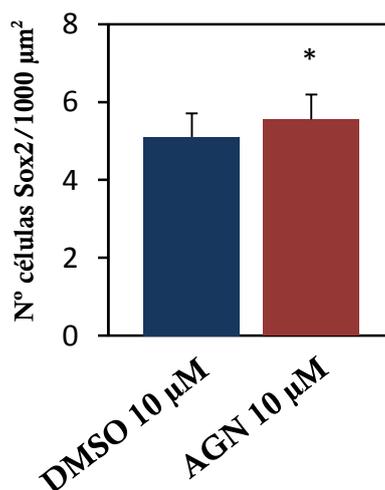


Figura 70: a, b) Sox2 en retinas de animales de 3 dpf tratados con AGN 10 μM y controles tratados con la misma cantidad de DMSO. En los tratados con AGN no hay marcaje en el nervio óptico, pero hay células Sox2 positivas en la región escleral de la CNI (flecha en b). **c)** Gráfica que muestra el aumento de células Sox2 positivas en la retina de los animales tratados con AGN. CCG: capa de las células ganglionares, CNI: capa nuclear interna, NO: nervio óptico, ZPG: zona periférica germinal. Barra de escala: 100 μm . *: $P < 0.05$.



Diferenciación celular

CR

El patrón de distribución de CR no difiere entre los animales tratados con AGN y los controles (Fig. 71 a, b). En ambos grupos, las células positivas para CR se encuentran en toda la extensión de la CCG. También hay células positivas para CR en la región vitreal de la CNI. Los axones de las células de la CCG, también son inmunorreactivos para CR, pero en los tratados con AGN el marcaje es muy débil y casi no se aprecia el nervio óptico. El conteo muestra que hay una reducción del número de células positivas para CR en los animales tratados con AGN (Fig. 71 c).

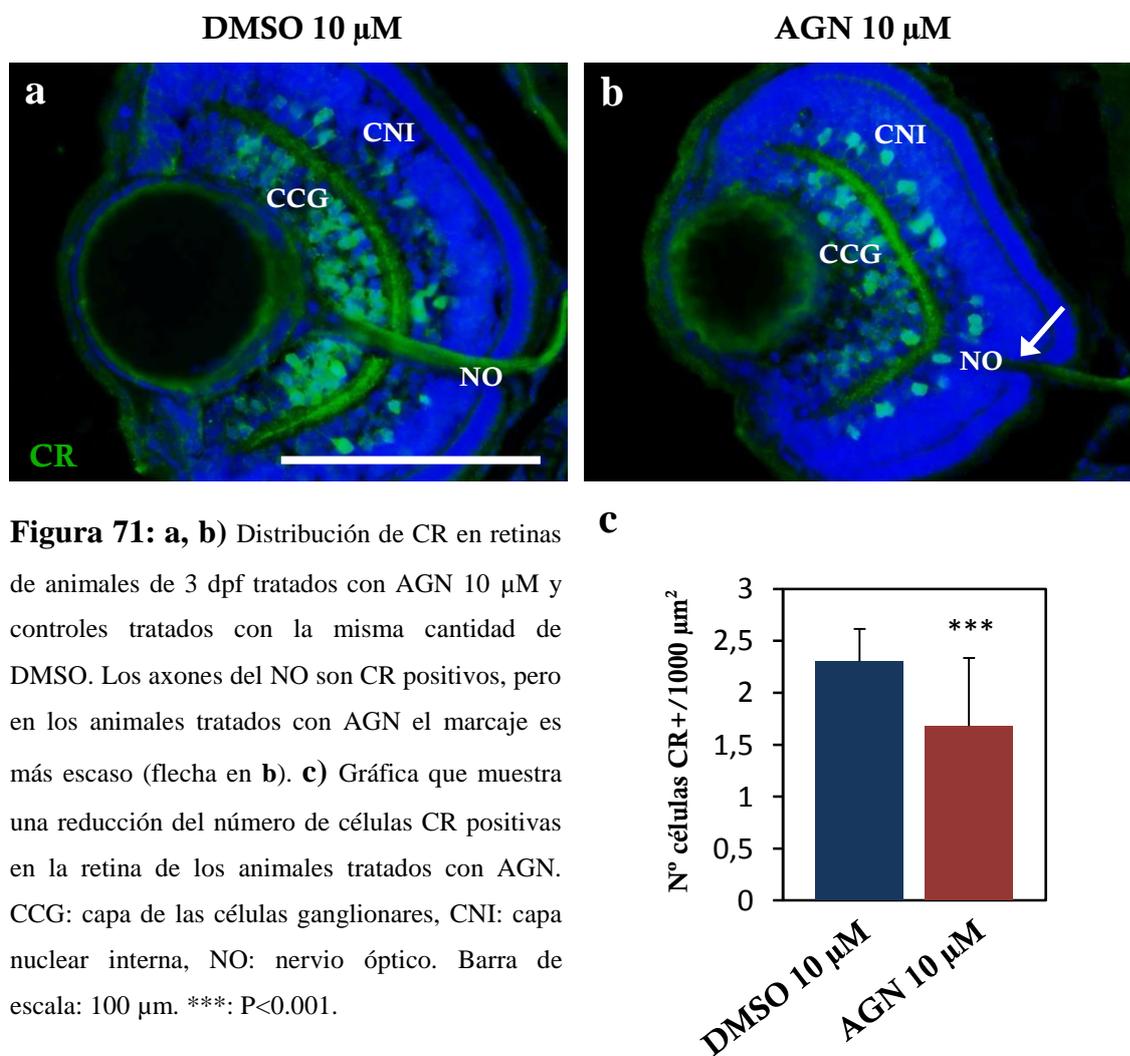
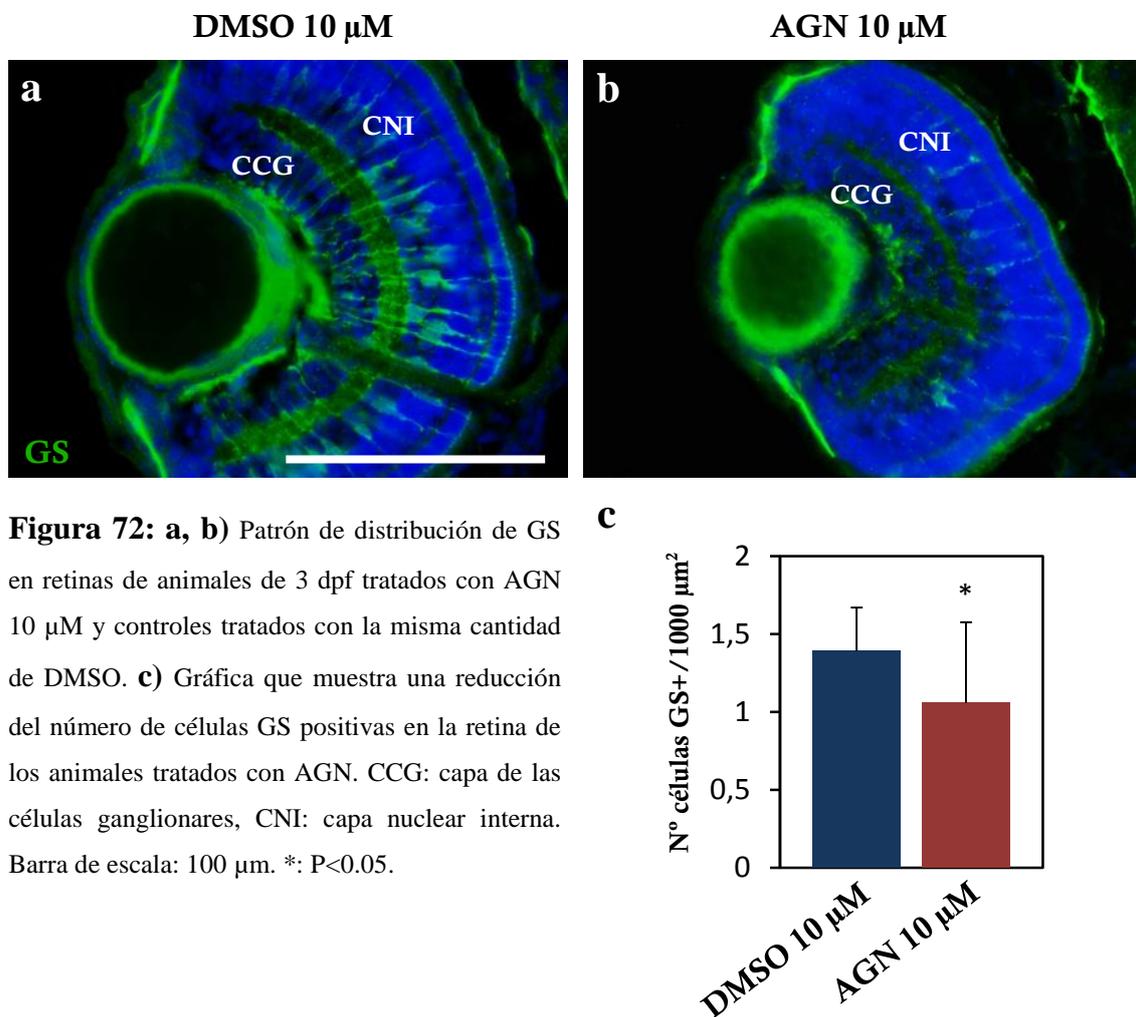


Figura 71: a, b) Distribución de CR en retinas de animales de 3 dpf tratados con AGN 10 μ M y controles tratados con la misma cantidad de DMSO. Los axones del NO son CR positivos, pero en los animales tratados con AGN el marcaje es más escaso (flecha en b). c) Gráfica que muestra una reducción del número de células CR positivas en la retina de los animales tratados con AGN. CCG: capa de las células ganglionares, CNI: capa nuclear interna, NO: nervio óptico. Barra de escala: 100 μ m. ***: P<0.001.

GS

La inmunorreactividad para GS se localiza en los cuerpos celulares de las células de Müller, situados en una hilera en el centro de la CNI, así como en sus procesos tanto esclerales como vitreales en ambos grupos (Fig. 72 a, b). No obstante, en los animales tratados con AGN, la extensión que ocupan las células de Müller a lo largo de la CNI es menor, debido a que estas células son menos numerosas (Fig. 72 c). El marcaje en el cuerpo celular parece más débil que en los controles.



GFAP

En ambos grupos experimentales (Fig. 73 a, b), la inmunorreactividad para GFAP se localiza en los procesos vitreales de las células de Müller, que forman la membrana limitante interna en la región más vitreal de la retina.

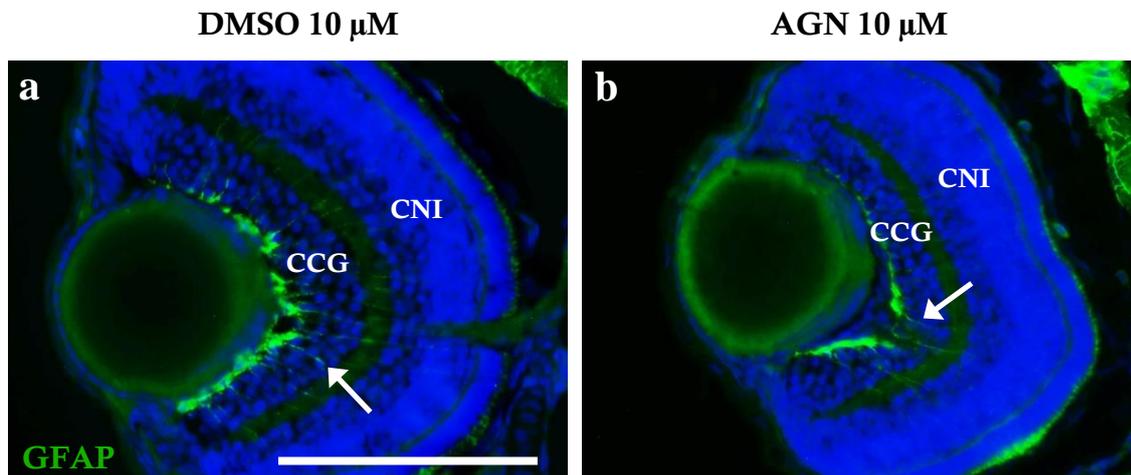


Figura 73: Distribución de GFAP en retinas de animales de 3 dpf tratados con AGN 10 μM y controles tratados con la misma cantidad de DMSO. Procesos vitreales de las células de Müller (flecha), que forman la membrana limitante interna. CCG: capa de las células ganglionares, CNI: capa nuclear interna. Barra de escala: 100 μm .

Nervio óptico

Neurolina-Pax2

En la retina control (Fig. 74 a), el marcaje para Neurolina se encuentra predominantemente en los márgenes de la CCG, mientras que en los tratados con AGN (Fig. 74 b) está distribuido intensamente por toda la extensión de la CCG y también en algunos procesos celulares en la CNI. Los axones del nervio óptico positivos para Neurolina están asociados a células positivas para Pax2, desde que salen de la CCG hasta que forman el quiasma óptico. No hay diferencias en el marcaje para Pax2 entre ambos grupos (Fig. 74 c, d).

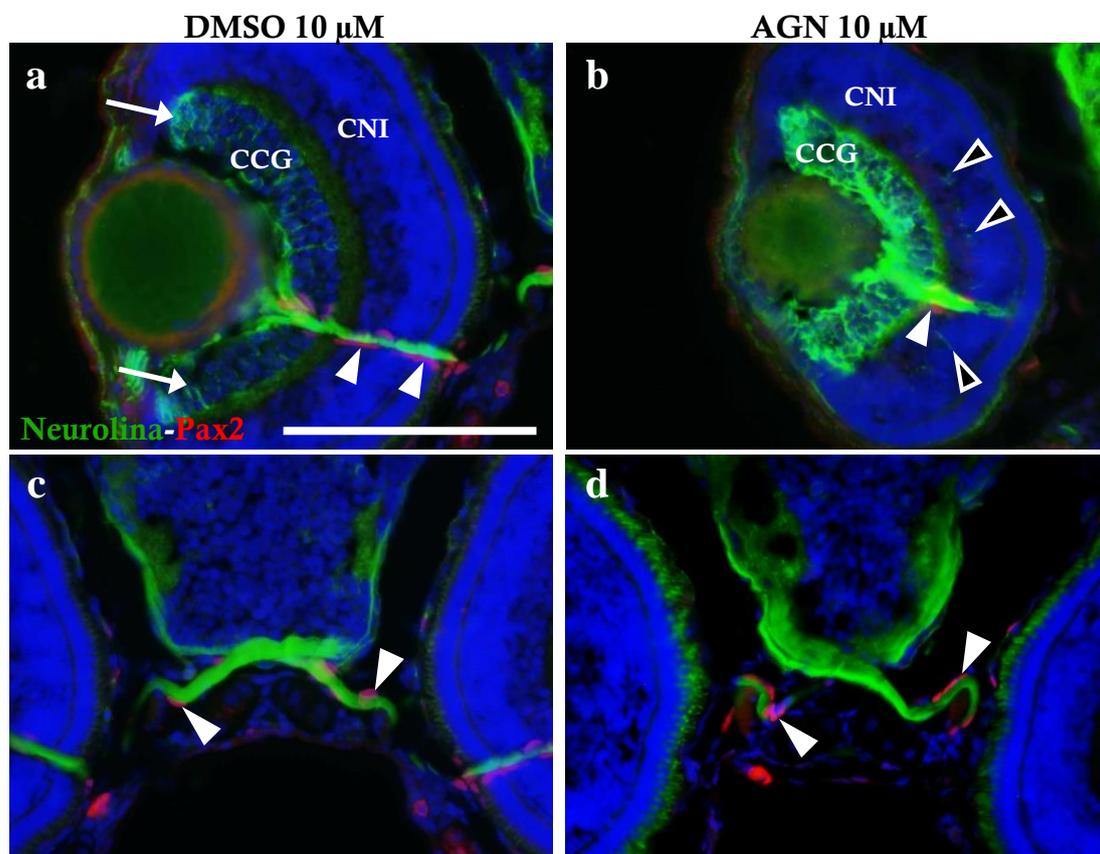


Figura 74: Neurolina y Pax2 en animales de 3 dpf tratados con AGN 10 μM y controles tratados con la misma cantidad de DMSO. **a, b)** La Neurolina se encuentra en la CCG, más restringida a los márgenes en los controles (flechas en **a**), así como en los axones del nervio óptico, asociados a las células Pax2 positivas (cabezas de flecha). Los animales tratados con AGN presentan procesos Neurolina positivos en la CNI (cabeza de flecha hueca en **b**). **c, d)** Los axones positivos para Neurolina forman el quiasma óptico asociados a células Pax2 positivas (cabezas de flecha en **c, d**), sin que haya diferencias entre ambos grupos. CCG: capa de las células ganglionares, CNI: capa nuclear interna. Barra de escala: 100 μm .

Caracterización de los embriones mutantes para *raldh3*

Para conocer si la ausencia de la función de la enzima Raldh3 producía alteraciones en la retinogénesis embrionaria y en la formación del nervio óptico analizamos el tamaño de la retina de animales de 3 dpf silvestres y mutantes para dicha enzima. Los mutantes proceden de cruces entre adultos reproductores heterocigotos para el alelo mutado *sal118*. Estudiamos también la expresión de *raldh2* y la distribución de diversos marcadores implicados en proliferación y diferenciación celular.

Tamaño de la retina

Al observar los animales bajo la lupa no encontramos diferencias fenotípicas entre los mutantes para la *raldh3* y los silvestres. Tras realizar las mediciones en secciones de retina, comprobamos que no hay diferencias en el tamaño de la misma entre los animales mutantes y los silvestres (Fig. 75). Los conteos de células se expresarán en células/sección.

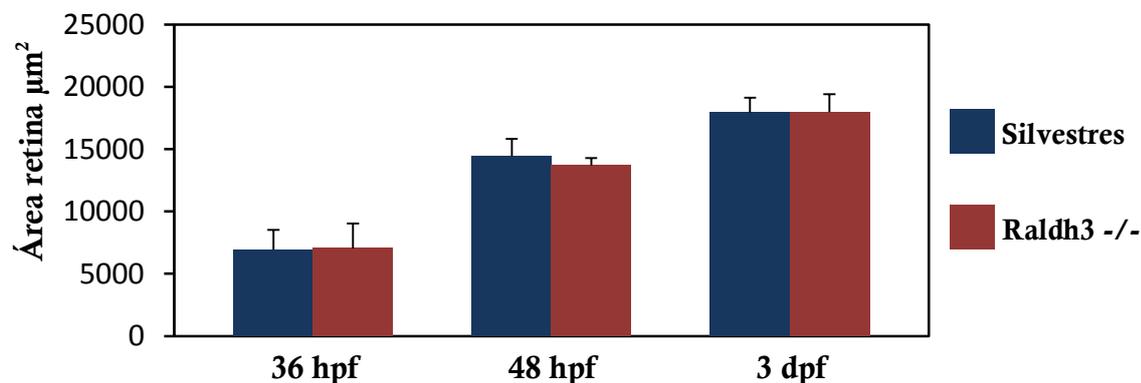


Figura 75: Gráfica que muestra que no hay diferencias en el tamaño de la retina entre los animales mutantes para *raldh3* y silvestres.

Raldh2

Los animales homocigotos para la mutación del gen que codifica para la *raldh3* carecen de la principal fuente de síntesis de AR en la región ventral de la retina, ya que la proteína Raldh3 no es funcional. Sin embargo, la morfogénesis del ojo parece intacta, por lo que debe de haber algún mecanismo que compense la falta de síntesis de AR en la retina ventral. En esta región también hay expresión de *raldh2* en los animales silvestres, aunque muy débil. Tal vez sea un aumento en la expresión de *raldh2* en la región ventral

de la retina lo que compense la ausencia de la Raldh3 funcional. Para contrastar esta hipótesis analizamos el patrón de expresión de *raldh2* mediante hibridación *in situ*, tanto en los animales mutantes homocigotos como en los silvestres, durante la formación de la retina, a las 36 y 48 hpf, y a los 3 dpf.

En los animales de genotipo silvestre el gen *raldh2* se expresa principalmente en un dominio situado en la región dorsal de la retina, y débilmente en la región ventral adyacente a la fisura coroidea, a las 36 hpf (Fig. 76 a). A las 48 hpf (Fig. 76 c) sólo hay marcaje para *raldh2* en el dominio dorsal, y se reduce a los 3 dpf (Fig. 76 e). No hay diferencias en el patrón de expresión de *raldh2* entre animales silvestres y los mutantes *raldh3*^{-/-} en ninguno de los estadios analizados (Fig. 76 b, d, f).

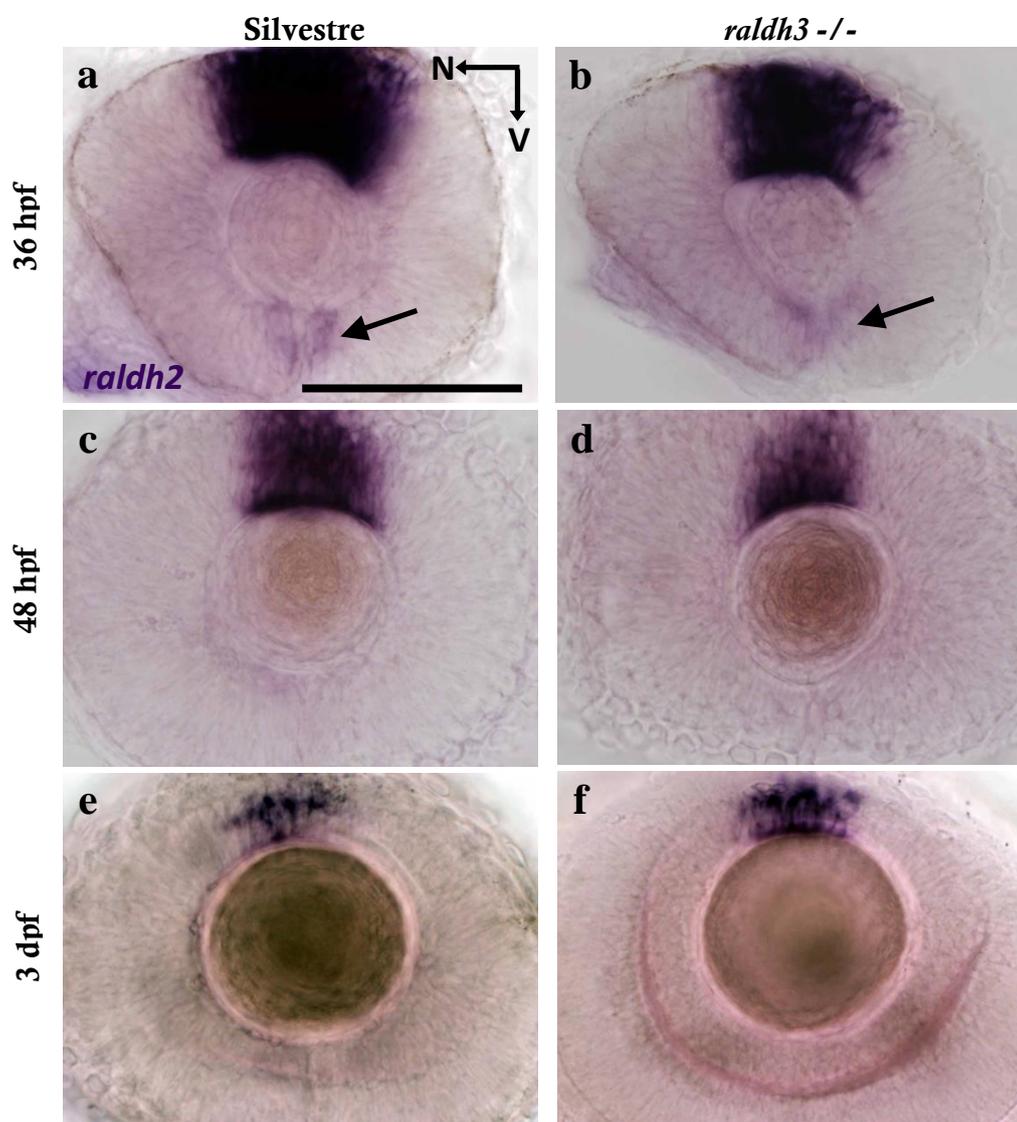


Figura 76: Patrón de expresión de *raldh2* en la retina de animales silvestres y mutantes *raldh3*^{-/-} de 36, 48 hpf, y 3 dpf. A las 36 hpf también hay expresión de *raldh2* en células junto a la fisura coroidea (flecha en **a**, **b**). N: nasal, V: ventral. Barra de escala: 100 μ m.

PH3

A las 48 hpf, las células positivas para PH3 se encuentran en los márgenes de la retina, así como en la región escleral, tanto en animales silvestres (Fig. 77 a) como en los mutantes (Fig. 77 b). A los 3 dpf, las células se localizan en la ZPG (Fig. 77 c, d). El número de células PH3 positivas es similar en ambos grupos (Fig. 77 e).

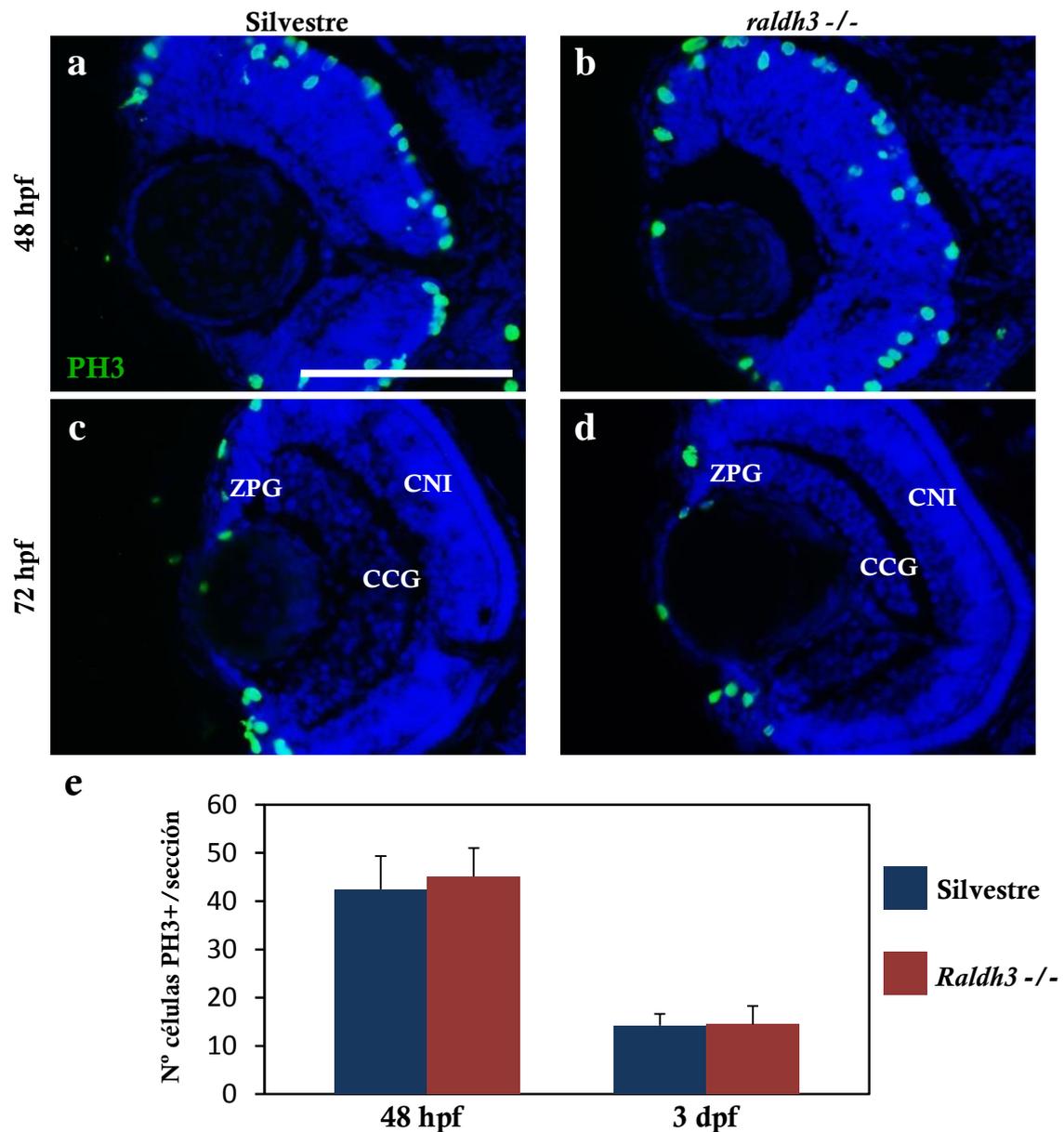


Figura 77: a-d) Distribución de PH3 en retinas de animales de 48 hpf y 3 dpf, silvestres y *raldh3*^{-/-}. **e)** Gráfica que muestra que no hay diferencias en el número de células PH3 entre animales silvestres y mutantes. CCG: capa de las células ganglionares, CNI: capa nuclear interna, ZPG: zona periférica germinal. Barra de escala: 100 µm.

Pax6

A las 48 hpf, las células positivas para Pax6 se distribuyen por la CCG y la región vitreal de la CNI, tanto en los animales silvestres (Fig. 78 a) como en los mutantes (Fig. 78 b). A los 3 dpf, la distribución es similar (Fig. 78 c, d). Al realizar los conteos comprobamos que las células son menos numerosas en los mutantes a las 48 hpf, mientras que a los 3 dpf el número es similar en silvestres y mutantes (Fig. 78 e).

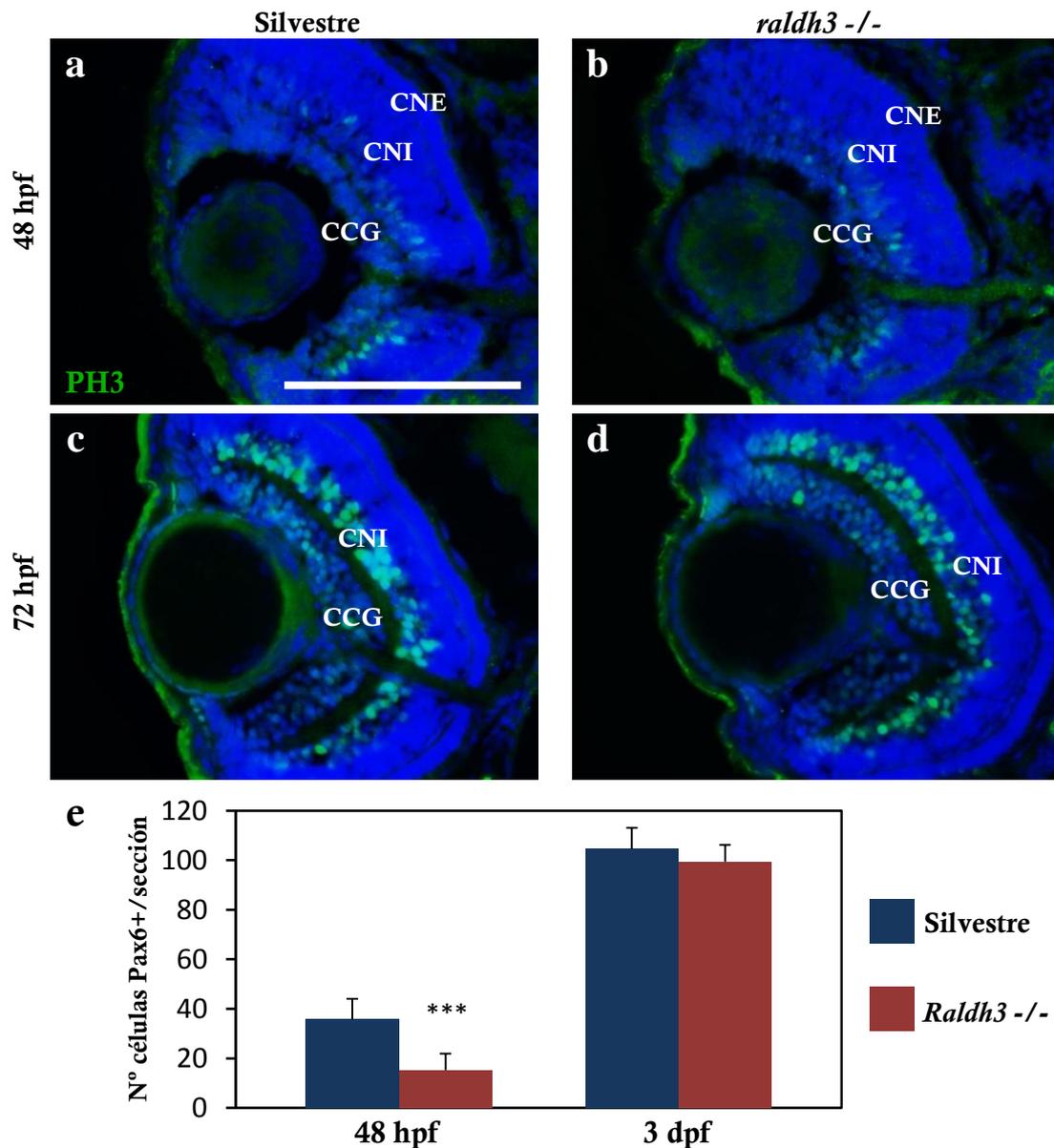


Figura 78: a-d) Pax6 en retinas de animales de 48 hpf y 3 dpf, silvestres y *raldh3*^{-/-}. **e)** Gráfica que muestra menor número de células Pax6 positivas en los mutantes a las 48 hpf. CCG: capa de las células ganglionares, CNE: capa nuclear externa, CNI: capa nuclear interna. Barra de escala: 100 μ m.

***: $P < 0.001$.

Neurolina-Pax2

A las 48 hpf, tanto en los embriones silvestres (Fig. 79 a) como en los mutantes (Fig. 79 b), el marcaje para Neurolina se encuentra en la CCG y en los axones que forman el nervio óptico. A ellos se asocian células fusiformes Pax2 positivas. A los 3 dpf, la CCG ya diferenciada y los axones del nervio óptico, asociados a células Pax2 positivas, presentan marcaje para Neurolina, tanto en los animales silvestres (Fig. 79 c) como en los mutantes (Fig. 79 d).

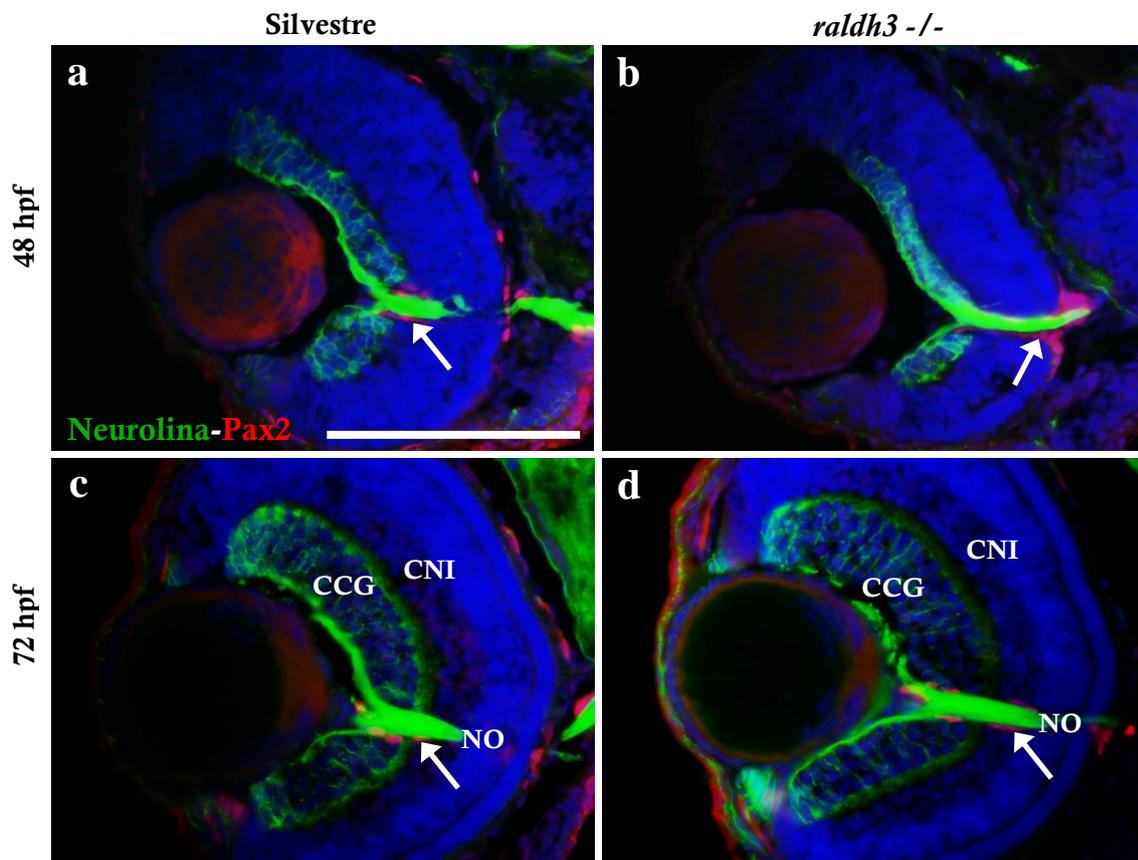


Figura 79: a-d) Distribución de Neurolina y Pax2 en retinas de animales de 48 hpf y 3 dpf, silvestres y *raldh3*^{-/-}. Las células Pax2 positivas se indican con una flecha. CCG: capa de las células ganglionares, CNI: capa nuclear interna, hpf: horas postfecundación, NO: nervio óptico. Barra de escala: 100 μ m.

DISCUSIÓN

En el presente Trabajo hemos tratado a los embriones y larvas de pez cebra con AR para analizar, en un modelo *in vivo*, cómo afecta el exceso de esta sustancia clave en el desarrollo de los vertebrados a la retinogénesis, intentando abarcar la neurogénesis y diferenciación que ocurren en la retina durante el periodo embrionario y también cuando la ZPG se establece y comienza a generar nuevos tipos celulares. Por otro lado, para intentar comprender mejor la teratogenia del AR, hemos bloqueado su señalización endógena, inhibiendo su síntesis y bloqueando sus receptores. En nuestro Trabajo, además, se estudia por primera vez el efecto de la mutación de la enzima Raldh3 sobre la organización de la retina del pez cebra.

Influencia del AR sobre la retinogénesis larvaria

Hemos realizado tratamientos con AR 0,1 o 1 μ M desde los 3 a los 4 dpf para estudiar las posibles alteraciones en la formación de la retina que se produce a partir de la ZPG, y se establece en torno al estadio de 3 dpf. Al observar el desarrollo de los animales tratados encontramos que no se producen alteraciones corporales evidentes al observarlos bajo la lupa binocular. Sin embargo, los animales presentan cierto grado de microftalmia, que comprobamos al realizar la medición del área de la retina de numerosas secciones histológicas. Encontramos este fenotipo tanto a los 4 dpf, justo al finalizar los tratamientos con AR, como a los 5 y 6 dpf, cuando los animales se están desarrollando en condiciones normales.

Se ha descrito que la microftalmia producida por un agente teratógeno puede deberse a un retraso general del desarrollo, a una elevada muerte celular, a una reducida proliferación o diferenciación celular, o a una reducción de las conexiones sinápticas en la retina (Stenkamp *et al.*, 2002). En el presente Trabajo hemos intentado desentrañar si se producen estos mecanismos y en qué medida ocurren con las dos concentraciones de AR que hemos utilizado y en las tres edades o estadios embrionarios que hemos seleccionado como más adecuados, teniendo en cuenta nuestra experiencia en el laboratorio y la información disponible de estudios previos.

Los animales que hemos analizado no parecen sufrir un retraso generalizado del desarrollo ya que, de hecho, son apenas distinguibles de los animales control no tratados, cuando los observamos bajo la lupa. Por otro lado, las secciones que hemos utilizado para realizar las técnicas inmunohistoquímicas no presentan signos de elevada muerte celular,

como puede ser la presencia de núcleos picnóticos (Cole y Ross, 2001; Neumann y Nüsslein-Volhardt, 2000), que son fácilmente identificables con una tinción nuclear de contraste como la que realizamos con DAPI en cada inmunofluorescencia. Así pues, decidimos estudiar la proliferación y la diferenciación celular, para intentar comprobar si el AR afecta a dichos procesos a los 4 dpf, y el posible efecto a más largo plazo, a los 5 y 6 dpf.

Estudiamos la inmunorreactividad para PH3, para marcar las células en fase G₂ y fase M del ciclo celular y analizar la proliferación celular en la retina. Por otro lado, estudiamos la incorporación de BrdU por las células que han pasado por la fase S del ciclo celular durante los 30 minutos de exposición de los animales a esta molécula, que llevamos a cabo a los 4, 5 y 6 dpf.

Ambos marcadores permiten estudiar diferentes momentos del ciclo celular, pero sirven igualmente para detectar las células proliferativas que, en ambos casos y en todos los grupos, encontramos en la ZPG. La ZPG es un nicho neurogénico situado en la parte marginal de la retina que originará durante toda la vida del animal todos los tipos celulares a excepción de los fotorreceptores de tipo bastón (Raymond, 1991). Aunque no hay diferencias en el patrón de distribución de ambos marcadores entre los animales control y los tratados con AR, a ninguna de las edades analizadas, sí se producen cambios en la densidad de las células inmunorreactivas.

Como indicamos en el apartado de “Material y Métodos” del presente Trabajo, cuando expresamos los resultados de los conteos de células en retinas de animales que presentan microftalmia, lo hacemos como “nº de células/1000 μm^2 ”, o sea, como densidad de células positivas, como se ha descrito en otros trabajos previos (Kashyap *et al.*, 2007; Santos-Ledo *et al.*, 2011).

Así pues, en el caso del marcaje para PH3, a los 5 dpf se produce una disminución de la densidad de células positivas para este marcador en los animales tratados con AR 0,1 o 1 μM , que se mantiene a los 6 dpf en los tratados con AR 1 μM . La disminución del número de células en división puede estar directamente relacionada con la reducción del tamaño de la retina. Sin embargo, en el caso del marcaje para BrdU, en los animales tratados con AR 0,1 μM hay un aumento en la densidad de células positivas, que se mantiene a los 5 dpf, cuando también hay mayor densidad de células BrdU positivas en los animales tratados con AR 1 μM .

Estos datos parecen contradecir los resultados obtenidos para PH3, pero debemos tener en cuenta que, aunque en el momento de la fijación del tejido encontremos más

células que hayan captado BrdU, durante los 30 minutos de exposición a la misma en los animales tratados con AR, algunas de estas células pueden progresar de forma anormal por el ciclo celular y no llegar a dividirse correctamente, como ha sido propuesto por Cerveny *et al.* (2010). Esta explicación relacionaría los resultados de PH3 y BrdU y explicaría la reducción del tamaño de la retina de los animales tratados con AR.

Hemos analizados mediante inmunohistoquímica la distribución de Pax6 y Sox2, dos factores de transcripción implicados en el control de la retinogénesis y que están relacionados entre sí. Además, hemos analizado el marcaje para CR, una proteína que se encuentra en neuronas diferenciadas, y para GS, que es un marcador de células de Müller diferenciadas.

No encontramos diferencias en el patrón de marcaje para Pax6 y Sox2 entre los animales control y los tratados con AR. Sin embargo, la densidad de células Pax6 positivas es menor en los animales tratados que en los controles a los 5 y 6 dpf, y en el caso de los tratados con AR 1 μ M también es menor a los 4 dpf. En el caso de Sox2, también se produce una reducción de la densidad de células positivas para este marcador en los animales tratados con AR a los 4 y 5 dpf. En estos estadios de desarrollo, Pax6 se encuentra en células ganglionares y amacrinas ya diferenciadas (Hitchcock *et al.*, 1996; Hirsch y Harris, 1997; Fischer *et al.*, 2006; Jusuf y Harris, 2009; Ferreiro-Galve *et al.*, 2012). Sox2 se encuentra en células amacrinas y células de Müller (Taranova *et al.*, 2006; Lawrence *et al.*, 2007). El que encontremos una disminución del número de células positivas para Sox2 y Pax6 puede estar reflejando un fallo en la neurogénesis o en la diferenciación de la retina.

El patrón de distribución de CR y GS tampoco presenta diferencias evidentes entre los diferentes grupos, pero hay algunas diferencias en la densidad de células inmunorreactivas. Así, según avanza el desarrollo, se produce una disminución de la densidad de células positivas para CR a los 5 y 6 dpf en los animales tratados con AR. Esto puede indicar un fallo en la diferenciación celular, que podría ser responsable de la microftalmia, ya que la CR se encuentran en neuronas diferenciadas (Brandt *et al.*, 2003; Kempermann *et al.*, 2004; Arenzana *et al.*, 2011). En cuanto a las células de Müller marcadas para GS, hay diferencias en la densidad de células a los 5 y 6 dpf, pero no se trata de una tendencia ni parece explicar la reducción del tamaño de la retina.

La Neurolina, reconocida por el anticuerpo Zn8 se encuentra en la membrana plasmática de los axones jóvenes en crecimiento. Tanto durante la formación del sistema visual como en la regeneración del nervio óptico, el marcaje para Neurolina se encuentra

en las células ganglionares de la retina y sus axones. Una vez que el axón termina su crecimiento, alcanza su diana y madura, deja de ser inmunorreactivo para Neurolina (Paschke *et al.*, 1992, Laessing y Stuermer, 1996).

A los 4 dpf no hay diferencias en el patrón de distribución de Neurolina entre los animales control y los tratados con AR, pero a los 5 dpf no hay marcaje para esta proteína ni en la retina ni en el nervio óptico de los ejemplares tratados con AR 0,1 y 1 μ M, y a los 6 dpf se recupera la inmunorreactividad para Neurolina en los animales tratados con AR.

Nuestros resultados parecen indicar una parada en la generación y crecimiento de nuevos axones a partir de las células ganglionares. Durante el desarrollo normal, a partir de los 3 dpf son las células ganglionares situadas en los márgenes de la CCG las que expresan *neurolina* y forman nuevos axones que se incorporarán al nervio óptico (Diekmann y Stuermer, 2009). Estas células se originan en la ZPG, por lo que la pérdida de marcaje para Neurolina podría indicar una pérdida de actividad o de función transitoria de este nicho neurogénico. El hecho de que encontremos alteraciones en la proliferación celular en la ZPG en los animales tratados con AR, así como una reducción de la densidad de células CR positivas en la retina, podría también indicar un fallo en la formación de nuevas células ganglionares.

La pérdida del marcaje para Neurolina podría deberse a un fallo en la expresión de *neurolina-a* o *neurolina-b*, los genes que codifican sendas isoformas de Neurolina, ambas reconocidas por el anticuerpo Zn8. Para comprobarlo, diseñamos y sintetizamos ribosondas para detectar la expresión de cada uno de dichos genes. El patrón de expresión para ambos genes en los animales control coincide con el que se ha descrito anteriormente en pez cebra (Diekmann y Stuermer, 2009).

Al analizar los patrones de expresión de ambos genes, no hemos encontrado diferencias en el marcaje entre los animales control y los tratados con AR, lo que nos indica que la expresión de *neurolina-a* y *-b* no parece estar afectada en ninguna de las edades analizadas. A la luz de estos resultados, pensamos que el fallo podría producirse en la síntesis de la proteína. Lo más probable es que los tratamientos con AR impidan de alguna manera que se forme la Neurolina-a, la isoforma que se ha descrito que es necesaria para la diferenciación de las células ganglionares (Diekmann y Stuermer, 2009).

El fallo en el crecimiento de nuevos axones Neurolina positivos desde la retina hacia sus dianas encefálicas, puede deberse a alteraciones en los mecanismos de atracción y repulsión de los axones mediante proteínas de superficie o moléculas secretadas. Una de estas moléculas secretadas, que interviene en la guía axonal intrarretinal es Slit2. Se ha

descrito que esta molécula actúa como una señal repulsiva en el crecimiento de axones (Wong *et al.*, 2002). Su expresión apenas se ha estudiado en la retina del pez cebra (Miyasaka *et al.*, 2005), y se supone que tiene la función de frenar la arborización de los axones hasta que llegan a su diana en el techo óptico (Campbell *et al.*, 2007). En roedores se ha propuesto que la unión de Slit2 con su receptor robo2 interviene en la guía de los axones de las células ganglionares dentro de la retina, para que se incorporen al nervio óptico correctamente (Thompson *et al.*, 2009).

Nuestros resultados muestran que *slit2* se localiza en la ZPG, en la CCG y en la región vitreal de la CNI en los animales control a partir de los 4 dpf. Sin embargo, en los animales tratados con AR, ni a los 4 ni a los 5 dpf hay marcaje en la ZPG, aunque se recupera a los 6 dpf. No se ha descrito esta molécula de guía axonal en la ZPG, pero tal vez, al tratarse de una molécula difusible, actúe sobre las células ganglionares próximas, que son las más nuevas y las que forman los axones que serán Neurolina positivos y se integrarán en el nervio óptico. En los animales tratados, al no haber fuente de *slit2* en la ZPG, las células ganglionares podrían ser incapaces de formar los axones. Nosotros no hemos detectado axones Neurolina positivos creciendo de manera aberrante, lo que sería esperable si fallasen los mecanismos de guía axonal. Sería necesario analizar otras moléculas de guía axonal para dilucidar si es un fallo en este mecanismo el que puede ser responsable de la ausencia de crecimiento axonal.

La alteración de la formación de los axones nuevos en torno a los 5 dpf, producida por el AR, podría también ser debida a una alteración de los mecanismos de guía axonal. Se ha descrito que un tipo celular necesario para la correcta formación del nervio óptico es la glía Pax2 positiva (Torres *et al.*, 1996, Macdonald *et al.*, 1997). Hemos visto que el patrón de expresión del gen *pax2a* mediante hibridación *in situ* no muestra diferencias entre los diferentes grupos experimentales. Sin embargo, el análisis mediante inmunohistoquímica de la proteína muestra que a los 4 dpf, en los animales tratados con AR, además de las células fusiformes Pax2 positivas localizadas en el nervio óptico asociadas a los axones positivos para Neurolina, hay células que presentan una inmunorreactividad débil para Pax2 dentro de la retina. Estas células presentan el marcaje en el núcleo, son de morfología alargada y se encuentran en la parte central de la CNI ventral, cerca del nervio óptico.

A los 5 dpf, la inmunorreactividad para Pax2 se encuentra solamente en el nervio óptico, que no presenta marcaje para Neurolina, y a los 6 dpf, las células positivas para Pax2 del nervio óptico vuelven a estar asociadas a axones jóvenes Neurolina positivos.

Así pues, la ausencia de crecimiento de axones jóvenes en el nervio óptico no parece estar relacionada con una alteración de la distribución de Pax2.

Las células Pax2 positivas que observamos a los 4 dpf en la CNI en los animales tratados con AR presentan un marcaje muy débil, lo que puede indicar una baja expresión del gen *pax2a*. Ello podría explicar por qué no las detectamos mediante la técnica de hibridación *in situ in toto*. En cuanto a la identidad de dichas células, podría tratarse de células de Müller, que son las únicas que tienen núcleos pequeños y alargados en el centro de la CNI y además son también GS positivas tras el tratamiento con AR. En la retina del pez cebra adulto se ha descrito una débil inmunorreactividad para Pax2 en las células de Müller de la retina central (Boije *et al.*, 2010). El AR podría activar la expresión de Pax2 durante la retinogénesis, cuando la retina aún no ha madurado.

Influencia del AR sobre la retinogénesis embrionaria

La mayor parte de la neurogénesis del embrión y el inicio de la diferenciación en la retina se producen entre las 24 y las 48 hpf. En ese periodo, el tratamiento con AR 0,1 o 1 μM produce alteraciones del desarrollo que se manifiestan justo después del tratamiento, y que persisten, e incluso se agravan, una vez que los embriones continúan su desarrollo en condiciones normales. Entre estas alteraciones hemos detectado la formación de edemas y la microftalmia. Tanto los edemas como la microftalmia se producen antes, y en mayor medida en los embriones tratados con AR 1 μM , ya que los efectos dependen de la dosis utilizada. Hemos comprobado que estos tratamientos producen mayores alteraciones morfológicas que al tratar a los animales entre los 3 y 4 dpf. Por tanto, el AR parece afectar más al desarrollo cuanto antes se administra.

Los edemas, que afectan especialmente a la región pericárdica, se han descrito también en experimentos en los que se ha administrado AR a embriones de pez cebra en otros momentos del desarrollo (Holder y Hill, 1991; Stainier y Fishman, 1992; Hill *et al.*, 1995), y se ha descrito que pueden deberse a que el AR provoca alteraciones en el sistema cardiovascular y en la permeabilidad de los vasos sanguíneos del animal (Waxman y Yelon, 2009).

Como ya hemos comentado anteriormente, la microftalmia, cuando es producida por algún agente teratógeno, puede deberse a un retraso general del desarrollo, una

muerte celular elevada, una reducida proliferación o diferenciación celular, o una reducción de las conexiones sinápticas en la retina (Stenkamp *et al.*, 2002).

El análisis de la organización histológica de las retinas de los animales tratados con AR entre la 24 y las 48 hpf en secciones semifinas teñidas con azul de toluidina, pone de manifiesto algunas alteraciones. A las 48 hpf, en los animales tratados con AR 1 μM el tallo óptico persiste unido a la retina en la región ventral de la misma. El tallo óptico es una estructura que se reduce durante el desarrollo normal, de manera que en el estadio de 48 hpf prácticamente ha desaparecido para dejar en su lugar unas pocas células gliales que formarán parte del nervio óptico (Schmitt y Dowling, 1994; Macdonald *et al.*, 1995). La persistencia del tallo óptico, por tanto, podría indicar un retraso general en el desarrollo. Ahora bien, el tallo óptico está presente en estadios anteriores a las 48 hpf durante el desarrollo normal y su posición es anterior o nasal, pero según se produce la rotación de las copas ópticas, cambia su posición y pasa a colocarse en la parte ventral (Schmitt y Dowling, 1994). En los embriones tratados con AR 1 μM encontramos que el tallo óptico persiste en posición ventral desde las 48 hpf, lo que parece indicar que la rotación de las copas ópticas ocurre correctamente y no está retrasada, de modo que la persistencia del tallo óptico no parece ser consecuencia de un retraso general del desarrollo. Por otro lado, no hemos encontrado diferencias en la organización histológica de la retina entre los animales tratados con AR y los controles y el nervio óptico está presente en ambos grupos a las 48 hpf, lo que indica que no parece haber diferencias en el grado de desarrollo entre los diferentes grupos experimentales, si bien los embriones tratados con AR 1 μM ya presentan microftalmia a las 48 hpf.

A los 3 dpf, el tamaño de las retinas de los animales tratados con AR 1 μM también es menor que en los animales control, pero la laminación de la retina está bien establecida. Ello indicaría que la microftalmia no se debe a un retraso general del desarrollo.

A los 5 dpf, las retinas de los animales tratados con AR 1 μM siguen siendo menores que las de los controles. Esto indica que el efecto del AR persiste a lo largo del tiempo y que no hay recuperación de la microftalmia, a pesar de que los animales crezcan en condiciones normales tras haber sido tratados. Además, en este estadio, también los animales tratados con AR 0,1 μM presentan microftalmia, aunque la reducción del tamaño de la retina en estos animales no es tan grande como en los tratados con AR 1 μM . Ello nos indica que la menor concentración de AR conduce al mismo fenotipo aunque su efecto parece más débil.

Tanto a las 48 hpf, como a los 3 y 5 dpf, hemos encontrado numerosos núcleos picnóticos en las retinas de los animales tratados con AR 1 μ M. Esto es indicativo de que se está produciendo muerte celular por apoptosis (Cole y Ross, 2001; Neumann y Nüsslein-Volhardt, 2000), lo que viene apoyado por la presencia de fagosomas y espacios acelulares en la retina.

El tratamiento con AR 1 μ M produce un incremento de la apoptosis, detectada mediante la técnica de TUNEL, respecto a los animales control. Este incremento lo apreciamos a las 36 hpf, cuando los embriones están expuestos al AR, y lo mismo ocurre a los 3 y 5 dpf, cuando los animales ya se encuentran en condiciones normales. En los animales control el marcaje mediante TUNEL es más reducido, tal y como se ha descrito en estudios anteriores (Biehlmaier *et al.*, 2001).

El aumento significativo de la apoptosis en las retinas de los animales tratados con AR es consistente con la presencia de núcleos picnóticos que encontramos en las secciones semifinas. Además, la elevada apoptosis también ha sido demostrada en estudios previos de exposición de embriones a AR (Stevens *et al.*, 2011).

Las células apoptóticas se distribuyen por la ZPG, la CCG y la CNI, mientras que en la CNE, que corresponde a los núcleos de los fotorreceptores, no hemos encontrado ninguna. Esto puede deberse a que la CNE es la última capa en establecerse, de manera que cuando el AR está presente en el medio, entre las 24 y las 48 hpf, apenas se han diferenciado algunas células fotorreceptoras en la región ventro-nasal de la retina, y las células de la CNE prospectiva están proliferando. De esta manera, las células de la CNE, que está formada a los 3 y 5 dpf, se han diferenciado sin la influencia directa del AR, que no está presente en el medio en esos estadios. Por otra parte, la presencia de células apoptóticas en la ZPG, la CCG y la CNI, a los 3 y 5 dpf, sugiere que el tratamiento con AR 1 μ M produce algún daño en las células que emergen de la ZPG, ya que en estos estadios, y sobre todo a los 5 dpf, muchas de las células de estas capas proceden de la ZPG. En la ZPG, el AR estaría afectando a la viabilidad de las células progenitoras, del mismo modo que ocurriría a las 36 hpf, cuando la mayoría las células de la retina se encuentran proliferando.

La apoptosis parece ser una causa importante de la microftalmia, aunque no descartamos que la muerte celular por necrosis pueda contribuir. No obstante, podría ser que el AR produjera microftalmia de manera independiente a la muerte celular. Para comprobarlo, decidimos intentar inhibir la apoptosis mediante la inyección del morfolino p53MO para estudiar si el fenotipo se mantenía a pesar de no haber muerte celular por

apoptosis. El p53MO actúa bloqueando la expresión del gen *tumour suppressor p53*, que es activado por una variedad de situaciones de estrés celular, como los fallos en la replicación del ADN o en la progresión del ciclo celular, y que conduce a la muerte celular por apoptosis (Bill *et al.*, 2009). En trabajos previos se ha descrito que la inyección de p53MO consigue bloquear totalmente la apoptosis (Davuluri *et al.*, 2008; Cervený *et al.*, 2010).

Elegimos hacer el estudio en el estadio de 3 dpf, cuando la muerte celular y la microftalmia son significativamente mayores en los animales tratados que en los grupos control y la retina ya está casi formada. A los 5 dpf, los animales tratados también presentan dichas alteraciones, pero ha transcurrido mucho tiempo desde la inyección del morfolino y probablemente ya no funcione debido a que se haya diluido mucho o se haya degradado.

Los animales tratados con AR tienen retinas de menor tamaño que los no tratados, a pesar de que hayan sido inyectados con p53MO. Es más, en los tratados con AR que fueron inyectados con 4 y 8 nl de p53MO, la retina es menor que en los tratados con AR y no inyectados.

En el caso de los no tratados, el grupo inyectado con 4 nl de p53MO presenta retinas de menor tamaño que el resto de grupos no tratados. No hemos visto diferencias entre los grupos no tratados con AR en cuanto al número de células apoptóticas, por lo que la inyección del morfolino, aunque daña ligeramente los embriones al realizarse, no produce un aumento de la muerte celular a los 3 dpf. Sin embargo, cuando los embriones inyectados son expuestos a AR, el número de células apoptóticas es mayor que en los grupos no tratados, de manera que la inyección de p53MO no consigue evitar la apoptosis.

Estos resultados apoyan que la microftalmia se debe, en gran parte, a la muerte celular, ya que las retinas son de menor tamaño en los grupos tratados con AR. Además, analizando los datos de los conteos de células TUNEL positivas, vemos que en el grupo tratado con AR que había sido previamente inyectado con p53MO la muerte celular por apoptosis es incluso mayor que en el grupo tratado que no fue inyectado.

Las inyecciones del morfolino podrían sensibilizar al embrión al tratamiento posterior con AR, de manera que la muerte celular tendería a aumentar más que si se realizan los tratamientos en animales no inyectados, ya que en los animales tratados con AR, la apoptosis es más alta en los inyectados con 2 nl de p53MO que en los no inyectados. Sin embargo, cuando la cantidad de morfolino inyectada es mayor -4 u 8 nl-,

la elevada concentración de p53 contrarrestaría la sensibilización, y el número de células apoptóticas sería similar en los animales inyectados o no.

La muerte celular por apoptosis debida a la exposición a AR parece, por tanto, estar mediada por una vía distinta a la de *tumour suppressor p53*.

Como comentamos anteriormente, la reducción en la proliferación celular durante la retinogénesis podría conducir a la microftalmia. En el caso de los animales tratados con AR 0,1 μM se produce un aumento en el número de células marcadas para PH3 a las 48 hpf y 3 dpf, y no a los 5 dpf. Esto indica un aumento transitorio del número de células en división tras el tratamiento con AR. En el caso de los animales tratados con AR 1 μM hay mayor densidad de células PH3 positivas a los 3 dpf, pero a los 5 dpf hay menos que en los controles. Se produce también un aumento transitorio de la división celular, pero a los 5 dpf se reduce.

Mediante el marcaje con BrdU, observamos células que han pasado por la fase S del ciclo celular durante el tiempo en que esta molécula está presente en el medio, en nuestro caso 30 minutos. De este modo inmunodetectamos no sólo las células que se encontraban en esa fase en el momento de la fijación, sino también las células hijas de otras que duplicaron su ADN durante el tiempo de la exposición a BrdU.

En los animales tratados con AR 0,1 μM , a las 48 hpf hay mayor densidad de células BrdU positivas que en los controles; a los 3 dpf la densidad es menor y a los 5 dpf no hay diferencias. En los animales tratados con AR 1 μM el número de células BrdU positivas también es más alto a las 48 hpf y a los 3 dpf, pero a los 5 dpf hay menos que en los controles.

A pesar de las diferencias que hay entre los grupos, y de que los marcajes para PH3 y BrdU reflejan diferentes aspectos de la proliferación celular, la tendencia en los animales tratados con AR es a un aumento de la proliferación tras el tratamiento, que según avanza el desarrollo se frena o se invierte. En el caso de los animales tratados con AR 1 μM , en los que la microftalmia es más acusada, apenas hay marcaje para PH3 o BrdU a los 5 dpf, lo que estaría directamente relacionado con un menor tamaño de la retina.

Hay que tener en cuenta que, el hecho de que en un momento determinado encontremos muchas células PH3 o BrdU positivas, no indica necesariamente que su ciclo celular sea normal y que esas células terminen su división correctamente para dar células hijas que se diferencien a distintos tipos celulares. Así pues, podría ser que, al menos algunas células progenitoras avancen por el ciclo celular muy lentamente y

finalmente no consigan diferenciarse en el momento apropiado y mueran. La misma hipótesis se ha propuesto en un estudio realizado en un mutante de pez cebra denominado *flotte lotte (flo)* (Cervený *et al.*, 2010). Esto explicaría que en los animales tratados con AR veamos mayor densidad de células positivas para PH3 y BrdU durante un tiempo, y que luego alcancen niveles normales o incluso inferiores a los controles.

Por otra parte, el que haya más células proliferativas a las 48 hpf y los 3 dpf en los animales tratados, puede indicar que en estos animales la retinogénesis esté ocurriendo más despacio que en los controles, ya que según avanza la retinogénesis la proliferación se reduce a medida que se diferencian las distintas capas de la retina (Hu y Easter, 1999).

En cualquier caso, las alteraciones en la proliferación celular que hemos observado en los animales tratados con AR, deben de tener algún reflejo en la neurogénesis y la diferenciación celular de la retina y el nervio óptico, que discutiremos a continuación.

Hemos analizado mediante hibridación *in situ* el patrón de expresión de *pax6a*, *sox2* y *ath5*, genes estrechamente relacionados entre sí y que codifican factores de transcripción implicados en la retinogénesis. También hemos analizado el marcaje para Pax6 y Sox2 mediante inmunohistoquímica y hemos encontrado algunas alteraciones que podrían explicar la microftalmia.

La hibridación *in situ* para *pax6a* no muestra diferencias entre los animales tratados con AR y los controles. Sin embargo, mediante la técnica inmunohistoquímica, vemos que a los 3 y 5 dpf hay una reducción de la intensidad del marcaje en la retina acompañada de una disminución de la densidad de células Pax6 positivas. Esto podría deberse a que las células Pax6 positivas mueran. El hecho de que la expresión del gen *pax6a* no se modifique podría indicar que se está produciendo un fallo en la síntesis del factor de transcripción Pax6 a partir del ARNm. Por otra parte, se ha descrito que en roedores la mutación de Pax6 produce microftalmia (Matsuo *et al.*, 1993; Curto *et al.*, 2007), lo cual es consistente con la aparente falta de Pax6 en los animales tratados con AR que describimos en este Trabajo.

En cuanto a *sox2*, la hibridación *in situ* muestra que, a los 3 y 5 dpf, se produce una reducción del marcaje en la ZPG en los animales tratados con AR. En cuanto a la proteína, en los animales tratados con AR 1 μ M, a los 3 dpf hay células Sox2 positivas en el estrato escleral de la CNI, junto a la CPE. Ello podría ser reflejo de un retraso en la diferenciación de la retina, ya que la posición de esas células Sox2 positivas es la que corresponde a las 48 hpf, tanto en los controles como en los tratados. Se ha descrito que

Sox2 está implicado en la autorrenovación de las células madre y el mantenimiento del estado indiferenciado de dichas células (Bylund *et al.*, 2003). Sox2 está regulado positivamente por Pax6 (Lengler *et al.*, 2005) y, además, Sox2 activa la transcripción de Pax6 (Lin *et al.*, 2009). Así pues, la activación recíproca de estos marcadores es coherente con la pérdida del marcaje para ambos que hemos descrito.

Además, hay que tener en cuenta que la pérdida de la autorrenovación de las células de la ZPG, por la ausencia de Sox2 en esa zona, debe de tener una repercusión directa en el crecimiento de la retina. Si las células de la ZPG no mantienen su estado natural de células madre para generar nuevas neuronas, no se aportarán nuevas células a la retina en crecimiento y este proceso se parará. Ello podría ser otra causa de la microftalmia.

El estudio de la expresión de *ath5* en la retina muestra que, a las 48 hpf y a los 3 dpf, no hay diferencias entre los animales tratados con AR y los controles. Esto indica que la neurogénesis comienza correctamente en la retina a pesar de los tratamientos. Sin embargo, a los 5 dpf, en los animales tratados con AR 0,1 μ M, la intensidad del marcaje en la ZPG disminuye respecto a los controles, y en los tratados con 1 μ M desaparece. La reducción o pérdida de la expresión de este gen impedirá la generación de nuevas células ganglionares que se incorporarían a la CCG desde la ZPG, ya que es un gen indispensable para la generación de las células ganglionares (Kay *et al.*, 2001). Esto podría contribuir a la disminución del tamaño de la retina. Además, la pérdida de marcaje para Pax6 que hemos descrito anteriormente, debe de estar relacionada con la pérdida de la expresión de *ath5*. Pax6 es responsable de activar los genes bHLH, entre los que se encuentra *ath5*, que son los encargados de la determinación de distintos tipos celulares retinianos como, en este caso, las células ganglionares de la retina (Hirsch y Harris, 1997, Riesenber *et al.*; 2009).

Para saber si los tratamientos con AR estaban produciendo algún fallo en la diferenciación celular de la retina que pudiera conducir a la microftalmia, analizamos la distribución de la proteína CR, que marca las neuronas diferenciadas de la CCG, entre ellas las células ganglionares. Las células ganglionares son las que primero se diferencian en la retinogénesis, de manera que comienzan su diferenciación en torno a las 48 hpf (Hu y Easter., 1999) y a partir de este estadio son identificables como CR positivas (Arenzana, 2006; Arenzana *et al.*, 2011).

Al comparar el patrón de marcaje para CR en la retina entre los animales tratados con AR y los animales control a los 3 dpf, la densidad de células es mayor en los

animales tratados con AR que en los controles. Sin embargo, a los 5 dpf esta relación se invierte, de forma que hay más células CR positivas en las retinas control que en las de los animales tratados. Ello puede indicar que la diferenciación de las neuronas de la CCG y la CNI se produce, en un principio, más rápido en los animales tratados con AR que en los controles, para después frenarse. Igualmente, también podría indicar que la diferenciación no se extiende por la retina en la misma medida que en los controles, sino más rápido en un principio y después más lentamente. En cualquier caso, la diferenciación de las células ganglionares es completa ya que los axones del nervio óptico están marcados a los 3 dpf en los controles y en los tratados con AR, y se mantiene a los 5 dpf.

Los resultados para CR a 5 dpf concuerdan con los que hemos obtenido en la hibridación *in situ* para *ath5* a la misma edad, ya que si no se expresa este gen, las células de la ZPG no se diferenciarán como nuevas células ganglionares que se incorporarán a la CCG. En cuanto al aumento de células CR positivas a los 3 dpf, podría deberse a que el AR esté estimulando la diferenciación de estas neuronas, del mismo modo que activa la diferenciación de los fotorreceptores (Kashyap *et al.*, 2011). La presencia de un menor número de células positivas a los 5 dpf puede deberse a la apoptosis, a que la diferenciación no avanza tan rápido como en los controles, o a la pérdida de la actividad de la ZPG que hemos mencionado anteriormente.

Las células de Müller, junto con los fotorreceptores, son las células que más tardíamente se diferencian, en torno a los 3 dpf (Raymond *et al.*, 1995; Schmitt y Dowling, 1996; Peterson *et al.*, 2001). Por ello, nos planteamos analizarlas para saber si los tratamientos con AR provocaban efectos a largo plazo sobre la diferenciación celular, cuando dicho agente ya no está presente en el medio en el que se desarrollan los animales. Para ello marcamos las células de Müller con GS y los fotorreceptores con Zpr-1 Zpr-3.

A los 3 dpf, las células de Müller GS positivas comienzan a diferenciarse en la retina central de los animales control, con sus núcleos situados en la CNI y sus cuerpos celulares alargados, que emiten procesos radiales hacia las zonas escleral y vitreal de la retina. En los animales tratados con AR, las células GS positivas presentan alteraciones en su morfología y su posición dentro de la retina. Algunas de estas células tienen formas ameboides y carecen de los característicos delgados procesos radiales. Además, la posición de estas células es aberrante, ya que las encontramos tanto en la CCG como en el nervio óptico, además de en diferentes posiciones dentro de la CNI.

A los 5 dpf, en los animales control el número de células GS positivas prácticamente se duplica con respecto a los 3 dpf. También aumenta el número de células en los animales tratados con AR. Incluso la densidad de las células GS positivas a los 5 dpf es mayor en los tratados con AR 1 μ M. Lo más llamativo es la persistencia de alteraciones en la organización de dichas células. Las células GS positivas de los animales tratados con AR 1 μ M muestran una morfología similar a la de las células de Müller de los animales control y ya no encontramos las formas ameboides y sin procesos radiales en las retinas de estos animales. Sin embargo, la posición de los núcleos es muy diferente en estos animales. Así, en los animales tratados con AR 1 μ M los núcleos de las células GS positivas se encuentran dentro de la CNI, pero no en el centro como en los animales control, sino en la región vitreal y muy próximos a la CPI. Las células parecen estar desordenadas dentro de esta capa.

Consideramos que las células GS positivas de los animales tratados con AR son células de Müller, aunque a los 3 dpf presentan morfologías atípicas. Se ha descrito que las células de Müller son capaces de responder al daño en la retina, desdiferenciándose y actuando como progenitores para reparar el daño, ya que son células madre potencialmente activas (Bernardos *et al.*, 2007). La glía radial de la retina, especialmente en el caso del tratamiento con AR 1 μ M, podría reaccionar al exceso de AR y la muerte celular, y responder intentando compensar la situación del daño teratogénico generando nuevas células. Esta respuesta se traduciría en cambios en la morfología de las células de Müller así como la reentrada en el ciclo celular, lo que provocaría que los núcleos de las células se encuentren en distintos estratos de la retina. Esto podría estar sustentado por el hecho de que en zonas de la retina de los animales tratados con AR, en las que no hay división celular en los controles, encontremos algunas células PH3 o BrdU positivas. También puede explicarlo la mayor densidad de células GS positivas a los 5 dpf en los tratados con AR.

Al estudiar la diferenciación de los fotorreceptores, tras el tratamiento con AR, tanto los conos sensibles al rojo-verde como los bastones se forman correctamente en la parte más escleral de la retina y su densidad es mucho mayor a 3 y 5 dpf que en los animales control. Esto podría ser consecuencia de tres factores independientes. Por un lado, en el caso de los animales tratados con AR 1 μ M, la elevada muerte celular que ocurre en la retina se produce en la ZPG, la CCG y la CNI, pero no en la CNE, donde se encuentran los núcleos de los fotorreceptores. La muerte celular produce una disminución del tamaño total de la retina, y por tanto del área de las secciones en las que hemos

realizado las técnicas inmunohistoquímicas y los posteriores conteos. Así pues, al realizar los conteos de los conos y bastones y expresarlos como nº de células/1000 μm^2 , la densidad de dichas células aumenta respecto a los controles, aunque el número absoluto de conos o bastones no sea mayor.

Por otro lado, en el caso de los animales tratados con AR 0,1 μM , no hay elevada muerte celular y, sin embargo, la densidad de conos y bastones es también mayor que en los controles. Esto podría deberse a otros procesos que estén ocurriendo en las retinas de los animales tratados con AR. Uno de esos procesos podría ser el conocido efecto que el AR tiene sobre la diferenciación de los fotorreceptores. Hay diversos estudios, tanto en cultivos celulares (Stenkamp *et al.*, 1993; Kelley *et al.*, 1994, 1999; Wallace y Jensen, 1999; Osakada *et al.*, 2008) como *in vivo* (Hyatt *et al.*, 1996b; Prabhudesai *et al.*, 2005; Kashyap *et al.*, 2011), que demuestran que el AR estimula la formación de células fotorreceptoras, aumentando su supervivencia y diferenciación. El aumento de la densidad de células fotorreceptoras que encontramos en el presente Trabajo coincide con los resultados de estos experimentos, y puede contribuir a que la densidad de estas células sea mayor.

El otro proceso que puede estar afectando al aumento de fotorreceptores tiene que ver con la pérdida de expresión de *ath5*. Se ha descrito en pez cebra que la mutación de este gen (*lak*) tiene como consecuencia que los progenitores de las células ganglionares no se diferencien a este tipo celular y, en cambio, respondan a estímulos de diferenciación a otros tipos celulares más tardíos de la CNI, como las células de Müller o las células bipolares (Kay *et al.*, 2001). En ese trabajo no se describen cambios en el número de conos marcados con Zpr-1, pero no se menciona nada sobre los bastones, que tal vez sí podrían ver incrementado su número.

El marcaje para Neurolina detectado por inmunohistoquímica *in toto* en la CCG y el nervio óptico es similar en los animales control y tratados con AR a las 48 hpf. Esto indica que la CCG se diferencia correctamente a pesar del tratamiento con AR, y que el nervio óptico no presenta alteraciones, como hemos descrito para el marcaje con CR. Sin embargo, según avanza el desarrollo, el tratamiento con AR 0,1 μM produce una progresiva atenuación del marcaje, ya que a los 5 dpf sólo detectamos inmunorreactividad para Neurolina en la parte intrarretinal del nervio óptico. Tras el tratamiento con AR 1 μM , desaparece la inmunorreactividad para esta proteína, primero a los 3 dpf, desde el quiasma hasta el techo óptico, y después, a los 5 dpf, en toda la cabeza del animal. No obstante, en estos animales los axones sí son positivos para CR, lo que indica que hay

axones diferenciados conectando la retina con sus dianas encefálicas, pero no axones jóvenes, que son los que marca el anticuerpo Zn-8.

Estos resultados sugieren que la formación y diferenciación del nervio óptico ocurre de forma aparentemente normal en los animales tratados con AR hasta las 48 hpf. A partir de ese momento se produce una reducción -en el caso del tratamiento con AR 0,1 μ M- o incluso un bloqueo -en el caso del tratamiento con AR 1 μ M- de la formación de nuevos axones en la CCG.

En secciones de retinas de los animales tratados con AR 1 μ M, y también en el nervio óptico de los animales tratados con AR 0,1 μ M o 1 μ M detectamos inmunorreactividad para Neurolina que no veíamos *in toto*. Esto puede deberse a que la técnica inmunohistoquímica *in toto* no ofrece una resolución adecuada del marcaje, o a que el procesamiento de los animales para realizar la técnica *in toto* afecte a la antigenicidad de la proteína. Consideramos más fiables los resultados obtenidos en la inmunofluorescencia en secciones.

Cuando analizamos en detalle las imágenes sobre secciones de la inmunofluorescencia para Neurolina, encontramos diversas alteraciones. En primer lugar, en los animales tratados con AR 1 μ M toda la CCG es positiva para Neurolina a los 5 dpf, mientras que en los animales control y en los tratados con AR 0,1 μ M el marcaje sólo se localiza en la ZPG, donde se generan las nuevas células ganglionares que proyectarán sus axones por el nervio óptico. En segundo lugar, el nervio óptico en todos los grupos es positivo para Neurolina, incluso a los 5 dpf. Sin embargo, en los animales tratados con AR 1 μ M los axones no están bien empaquetados o fasciculados en el quiasma óptico ya a los 3 dpf, y a los 5 dpf el marcaje para Neurolina no se detecta más allá de dicha estructura. En tercer lugar, los animales tratados con AR presentan, tanto a los 3 como a los 5 dpf, procesos o proyecciones celulares dentro de la CNI que son Neurolina positivas.

La ausencia de axones jóvenes Neurolina positivos más allá del quiasma óptico estaría relacionada con la ausencia de expresión de *ath5* y la reducción en la proliferación celular en la ZPG que hemos descrito en los animales de 5 dpf tratados con AR 1 μ M, ya que al no generarse nuevas células ganglionares no habrá inmunorreactividad para Neurolina.

Además, los resultados en estos animales sugieren que el AR estimula la expresión ectópica de Neurolina dentro de la retina. Esto es consistente con estudios previos en diferentes modelos que demuestran que el AR estimula el crecimiento de

neuritas (Hunter *et al.*, 1991; Plum y Clagett-Dame, 1996) y la expresión de algunas moléculas de guía axonal como las efrinas (Sen *et al.*, 2005) o las netrinas (Lupo *et al.*, 2011). Los axones Neurolina positivos de las células ganglionares salen de la retina aunque no alcanzan el techo óptico, lo que puede indicar un fallo en los mecanismos de guía axonal.

Se han descrito dos isoformas de Neurolina, la Neurolina-a y la Neurolina-b, que son reconocidas por el anticuerpo Zn-8 (Diekmann y Stuermer, 2009). Estas isoformas tienen diferentes funciones en la retinogénesis. Mientras que la Neurolina-a es necesaria para la diferenciación de las células ganglionares de la retina, la Neurolina-b está implicada en la guía axonal en el nervio óptico (Diekmann y Stuermer, 2009). Nuestros resultados podrían reflejar un efecto diferencial sobre ambas isoformas. El AR activaría la expresión de Neurolina-a y el crecimiento de los axones dentro de la retina, y como no alcanzan su diana en el techo óptico, mantendrían la expresión de Neurolina-a. Por otro lado, el AR podría tener el efecto opuesto sobre la Neurolina-b y actuar bloqueando su expresión.

Se ha descrito que la señal del AR se incrementa en las células ganglionares de la retina durante la regeneración del nervio óptico (Nagashima *et al.*, 2009), y que la expresión de Neurolina se activa durante la regeneración de la retina (Sherpa *et al.*, 2008). Esto sugiere que el exceso de AR y el consecuente incremento de la muerte celular podría ser interpretado por las células ganglionares como un daño en la retina y conducir a la activación de la Neurolina-a.

Por otra parte, las células de Müller intervienen durante el desarrollo en la correcta guía de los axones de las células ganglionares por la CFNO para que se dirijan correctamente hacia el nervio óptico (Stuermer y Bastmeyer, 2000). Las alteraciones en la morfología y organización de las células de Müller que hemos descrito, podrían tener un efecto en la guía axonal y ser una causa de la formación de procesos Neurolina positivos ectópicos dentro de la retina.

Hemos analizado la expresión de *neurolina-a* y *-b* mediante hibridación *in situ*. A los 5 dpf, la expresión de *neurolina-a* se localiza en la región marginal de la CCG en los controles y tratados con AR 0,1 μ M, pero desaparece en los tratados con AR 1 μ M. Esto nos indica que el AR no estimula la expresión del gen, aunque podría estar activando la síntesis de la proteína Neurolina-a por otra vía que no sea la activación transcripcional.

Los resultados de la hibridación *in situ* y de la inmunohistoquímica no son contradictorios, pues debemos tener en cuenta que en el momento de la fijación del

animal puede no haber expresión del gen, mientras que sí puede existir la correspondiente proteína en las células y por tanto ser detectada. También debemos considerar que se ha descrito que la proteína Neurolina se encuentra en los axones del nervio óptico del pez cebra sólo mientras crecen hacia el techo óptico, que en el desarrollo embrionario dura menos de un día, y una vez que establecen contacto con su diana, dichos axones pierden el marcaje (Laessing y Stuermer, 1996).

Respecto al gen *neurolina-a* y la proteína que codifica, la Neurolina-a, el hecho de que a los 5 dpf, en los animales tratados con AR 1 μM , la expresión de *neurolina-a* desaparezca y no esté extendida por toda la CCG, como sucede con la proteína Neurolina, puede ser debido a que las células ganglionares retienen el marcaje para Neurolina porque sus axones no alcanzan su diana. Además, el que no haya expresión del gen en la CCG indica que no se están diferenciando nuevas células ganglionares, lo cual es consistente con la falta de aporte de nuevos axones Neurolina positivos al nervio óptico.

En relación con la expresión de *neurolina-b*, a los 3 dpf, en los animales control, la *neurolina-b* se expresa en un delgado anillo en el margen de la CCG, mientras que en los tratados con AR 0,1 μM la extensión del marcaje es algo mayor, hacia la parte central de la CCG, y en los tratados con AR 1 μM el marcaje se extiende de forma tenue por toda la CCG. A los 5 dpf, en los controles se mantiene el marcaje en un anillo marginal, que es algo más nítido en los tratados con AR 0,1 μM y, sin embargo, desaparece en los animales tratados con AR 1 μM .

A la luz de estos resultados, no podemos afirmar que el AR esté estimulando la expresión de *neurolina-b*, ya que las diferencias que observamos tanto en la intensidad como en el patrón del marcaje, a los 3 dpf, pueden ser simplemente consecuencia de un ligero retraso en la diferenciación de la CCG, que produciría que la expresión de *neurolina-b* tardase más tiempo en restringirse a los márgenes de esta capa que durante el desarrollo normal.

A los 5 dpf, al no haber expresión de este gen en los animales tratados con AR 1 μM , no se sintetizaría nueva Neurolina-b, y se producirían defectos en el crecimiento de los axones jóvenes, que por otra parte no se estarían generando al no haber tampoco expresión de *neurolina-a*. La inmunorreactividad que vemos en toda la CCG en este grupo puede deberse a que entre los 3 y los 5 dpf se pare la expresión de *neurolina-b* y por tanto la síntesis de Neurolina-b -igual que ocurriría con la otra isoforma- en la CCG. Esto provocaría el fallo en la generación y extensión de nuevos axones, pero el inmunomarcaje para Neurolina-b permanecería por no alcanzar dichos axones su diana.

Así pues, el análisis detallado de la expresión de las dos isoformas de *neurolina* en relación con el marcaje encontrado por inmunohistoquímica, apoya nuestra hipótesis de que el AR activa la síntesis de la Neurolina-a mientras que inhibe la expresión de la isoforma -b. Esto conlleva a que la inmunorreactividad de la isoforma -a se mantenga a los 5 dpf, aunque no haya expresión del gen en esta edad, por no establecerse la conexión de los axones con su diana. Son necesarios más estudios con anticuerpos específicos frente a las dos isoformas de Neurolina, para comprobar esta hipótesis.

Las células gliales positivas para Pax2 forman parte del nervio óptico y contribuyen a su correcta formación, participando en el cierre de la fisura coroidea y en el empaquetamiento y guía de los axones de las células ganglionares de la retina, tanto durante el desarrollo embrionario como durante la regeneración (Sanyanusin *et al.*, 1995, Torres *et al.*, 1996, Macdonald *et al.*, 1997, Chu *et al.*, 2001, Parrilla *et al.*, 2009). En los animales tratados con AR 1 μ M hemos visto alteraciones en el patrón de distribución de Pax2.

En dichos animales, tanto a los 3 como a los 5 dpf hay numerosas células redondeadas positivas para Pax2 dentro de la retina, distribuidas por la ZPG, la CCG y la CNI. La extensión de la inmunorreactividad de Pax2 más allá de su localización normal en el nervio óptico del pez cebra, coincide con la descrita por Hyatt *et al.*, (1996a) en estadios de desarrollo previos. Estos autores realizan el tratamiento con AR durante la formación de las vesículas ópticas y relacionan la activación de Pax2 con una alteración de la regionalización y polaridad dorso-ventral de la retina. Nosotros hemos realizado el tratamiento con AR a partir de las 24 hpf, cuando la retina ya se encuentra polarizada y regionalizada. Por tanto, en nuestro Trabajo, se están modificando procesos más relacionados con la diferenciación de células o cambios de fenotipo. Además, estudios recientes realizados en roedores parecen indicar que el AR de la retina no afecta realmente a la polarización dorso-ventral, sino a la morfogénesis de la copa óptica a través de su acción dentro del mesénquima periocular (Mic *et al.*, 2004; Matt *et al.*, 2005; Molotkov *et al.*, 2006).

Las células positivas para Pax2 que vemos en los animales tratados con AR 1 μ M se encuentran muy próximas a los procesos ectópicos inmunorreactivos para Neurolina, aunque nunca hemos observado colocalización de Neurolina y Pax2. Las células positivas para Pax2 podrían atraer a los axones Neurolina, bien porque modifiquen el microambiente de la retina a su alrededor, o bien porque posean algún tipo de proteína de superficie que funcione como quimioatrayente.

Por otro lado, la presencia de células Pax2 positivas en la retina podría ser debida a una gliosis reactiva como consecuencia de la toxicidad del estímulo teratógeno, como se ha descrito con el etanol en modelos de mamíferos (Baydas y Tuzcu, 2005, Taléns-Visconti *et al.*, 2011). Otra posibilidad es que haya una alteración de las células de Müller. Se ha descrito que, en la retina central del pez cebra adulto y del pollo, las células de Müller tienen Pax2, que jugaría algún papel en el mantenimiento de la diferenciación y la maduración de dichas células (Boije *et al.*, 2010). Los núcleos Pax2 positivos que encontramos tras el tratamiento con AR 1 μM podrían corresponder a células de Müller, como ocurría en el caso de los tratamientos con AR entre los 3 y 4 dpf. Por otro lado, la presencia de células Pax2 positivas también en la ZPG podría indicar que se trata de células inmaduras que no se han diferenciado aún. Muchas de las células inmunorreactivas para Pax2 de la CCG y la CNI proceden de la ZPG a los 3 y 5 dpf, lo que podría indicar que estas células aún se encuentran inmaduras.

Las células Pax2 positivas de la porción intraretinal del nervio óptico presentes en los animales tratados con AR 1 μM son similares a las que vemos en los controles. Sin embargo, fuera de la retina de los animales tratados, las células inmunorreactivas para Pax2 forman el tallo óptico. Podría ser que las células Pax2 positivas del tallo óptico no poseyeran las características adecuadas para asociarse a los axones en crecimiento y contribuir en su correcta guía a los 3 y 5 dpf, cuando vemos el fallo en el crecimiento de axones jóvenes. Si bien el tallo óptico sostiene el crecimiento de los axones pioneros que salen de la retina a las 30 hpf (Burrill y Easter., 1995), a los 3 y 5 dpf, cuando debería haber desaparecido, puede no ser el sustrato adecuado para la extensión de axones generados posteriormente. Esto añadiría otra explicación a las alteraciones que hemos descrito de los axones Neurolinea positivos del nervio óptico.

En cualquier caso, como revela la hibridación *in situ* para *pax2a*, el AR activa la expresión de este gen en la retina y el tallo óptico, así como en el techo óptico. Ello se traduce en la presencia de células Pax2 positivas en estas regiones. Como comentamos anteriormente, en los animales tratados con AR 1 μM se produce una drástica atenuación del inmunomarcaje para Pax6. Esto puede estar muy relacionado con la activación de la expresión de *pax2* y la presencia de la proteína Pax2 en la retina, en la que se ha descrito que durante el desarrollo se produce una inhibición recíproca de ambos marcadores, de forma que se encuentran en dominios no solapados durante la formación de la copa óptica (Macdonald *et al.*, 1995; Torres *et al.*, 1996; Macdonald y Wilson, 1996; Macdonald *et al.*, 1997; Schwarz *et al.*, 2000). Esta inhibición recíproca parece estar actuando también

durante la regeneración del nervio óptico tras axotomía, ya que se ha descrito que aumenta la expresión de *pax2a* mientras que se inhibe la de *pax6* (Cid, 2006; Rodger *et al.*, 2006; Parrilla *et al.*, 2012).

Hemos realizado dobles inmunofluorescencias para Pax2-GS, Pax2-GFAP y Pax2-CR en la retina y el techo óptico de animales de 3 dpf, para intentar determinar la identidad de las células Pax2 positivas de la retina.

No hemos encontrado que haya solapamiento del marcaje para Pax2 y GS, por lo que descartamos que sean células de Müller. Este resultado es diferente al que obtuvimos tras los tratamientos con AR entre los 3 y 4 dpf, pero puede deberse a que en el caso de los tratamientos entre las 24 y las 48 hpf, las células de Müller aún no se han empezado a diferenciar y por tanto no pueden responder aún al AR y activar la síntesis de Pax2.

Tampoco vemos solapamiento entre los marcajes de GFAP y Pax2, lo que es indicativo de que no se trata de astrocitos reactivos, ya que el marcaje que encontramos para GFAP se encuentra en los procesos vitreales de las células de Müller, donde se localiza mediante inmunohistoquímica durante el desarrollo normal del pez cebra. Hemos realizado pruebas utilizando otros marcadores astrocitarios como la vimentina o la citoqueratina, pero tampoco hemos observado solapamiento con el marcaje para Pax2. En el techo óptico se produce una fuerte reacción glial ya que el marcaje para GFAP se encuentra muy extendido en los animales tratados con AR, lo que muestra una reacción diferencial al estímulo teratogénico del AR en diferentes regiones del encéfalo.

En el caso de los dobles marcajes para Pax2 y CR tampoco hay solapamiento, lo que nos indica que no se trata de neuronas diferenciadas. Probablemente las células Pax2 positivas de la retina sean células inmaduras, que aún no expresen marcadores de diferenciación.

En cuanto a los mecanismos de guía axonal, analizamos la expresión de *slit2*, que a las 48 hpf, en la retina control, se expresa en los márgenes de la retina, entre la CCG y la CNI prospectivas y en el nervio óptico. A los 3 y 5 dpf, el marcaje se encuentra en la ZPG, la CCG, la CPI y la parte vitreal de la CNI. Este patrón de marcaje coincide con el descrito anteriormente en pez cebra (Campbell *et al.*, 2007) y es coherente con su papel en la guía axonal intrarretinal. En los animales tratados con AR no encontramos diferencias a las 48 hpf, pero a los 3 dpf el marcaje en la ZPG es muy débil, y a los 5 dpf apenas hay marcaje en la retina. La disminución de la expresión de *slit2* en la CCG en los animales tratados con AR podría contribuir a que la guía de los axones no ocurra

adecuadamente, y por ello vemos axones que crecen ectópicamente dentro de la retina y axones que no se extiendan fuera de ella.

Inhibición de la señal del AR durante la retinogénesis embrionaria

Es bien conocido que las modificaciones de la señal del AR producen malformaciones oculares en el pez cebra, al igual que en otros vertebrados. Así, tanto el exceso de AR (Holder y Hill, 1991; Hyatt *et al.*, 1992; Stainier y Fishman, 1992; Hill *et al.*, 1995; Kashyap *et al.*, 2011) como la deficiencia de esta molécula (Wilson *et al.*, 1953; Dowling., 1964), o la inhibición de las enzimas Raldhs (Marsh-Amstrong *et al.*, 1994; Kashyap *et al.*, 2011; Le *et al.*, 2012) o de los receptores RAR/RXR (Lupo *et al.*, 2011) producen microftalmia. Sin embargo, en estos trabajos no se han descrito alteraciones neuroquímicas dentro de la retina.

Para comprobar el efecto de la inhibición de la síntesis endógena de AR sobre la neurogénesis y la diferenciación de la retina embrionaria, tratamos a los animales con DEAB, un inhibidor de las Raldhs, entre las 24 y las 48 hpf. Se ha demostrado que esta sustancia es capaz de bloquear la señal del AR en el tubo neural (Perz-Edwards *et al.*, 2001) y en la retina del pez cebra (Kashyap *et al.*, 2011; Le *et al.*, 2012), pero no se conocen sus efectos específicos sobre la retinogénesis. Por otro lado, el efecto del AR puede bloquearse inhibiendo sus receptores nucleares. Nosotros hemos empleado AGN para inhibir los RAR. Se ha descrito que esta molécula inhibe los receptores y produce coloboma en el pez cebra, alterando la expresión de algunos genes de la retina ventral y el tallo óptico (Lupo *et al.*, 2011), pero tampoco se conocen sus efectos sobre la retinogénesis embrionaria. En el presente Trabajo hemos utilizado DEAB y AGN para inhibir la señal del AR durante la retinogénesis embrionaria y hemos analizado algunos marcadores moleculares mediante inmunohistoquímica en secciones de retina de animales de 3 dpf.

Tras llevar a cabo las mediciones del área de las secciones de retina utilizadas para realizar las diferentes técnicas inmunohistoquímicas, hemos encontrado que los animales tratados con DEAB 20 μ M tienen retinas de menor tamaño que los controles tratados con la misma concentración de DMSO. En las retinas analizadas no encontramos evidencias de muerte celular, como pueden ser núcleos picnóticos. Por ello no realizamos un análisis específico de la apoptosis mediante la técnica de TUNEL o el marcaje con naranja de

acridina. Las mediciones del área de las secciones de retina de los animales tratados con AGN también muestran que se produce reducción del tamaño de la misma al inhibir con AGN los receptores RAR del AR.

La densidad de células en división positivas para PH3, es mayor en los animales tratados con DEAB que en los controles. Esto puede ser debido a que, como describimos para el tratamiento con AR 1 μM , la proliferación se produzca más lentamente de lo normal y por eso en el momento de la fijación hay más células positivas para PH3. Así pues, en lugar de generarse más células diferenciadas, se acumulan los progenitores en división. También podría ser debido a un retraso en la formación de la retina, que produce que la disminución de la proliferación que ocurre durante el desarrollo normal sea más lenta.

En los animales tratados con AGN hay células PH3 positivas en la CNE, además de en la ZPG. Esto nos está indicando un retraso en la diferenciación celular, ya que la CNE todavía es proliferativa a los 3 dpf. Además, hay mayor densidad de células positivas para PH3 en los animales tratados con AGN, al igual que ocurre con el tratamiento con DEAB.

En los animales tratados con DEAB hay menos células Pax6 positivas que en los controles, lo que podría indicar un retraso en la diferenciación celular, al igual que planteamos en el caso de los animales tratados con AR 1 μM . Al analizar el marcaje para Sox2, también encontramos que ocurre lo mismo que en los tratamientos con AR, ya que se reduce drásticamente la inmunoreactividad para esta proteína, de forma que apenas unas pocas células pueden contarse como Sox2. Esto podría estar relacionado con la reducción del marcaje para Pax6, puesto que ambos marcadores se activan de forma recíproca (Lengler *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2009). Cuando no hay expresión de Sox2, las células madre de la retina podrían perder su capacidad de autorrenovación, lo que podría conducir al agotamiento de los nichos neurogénicos y esto, a su vez, al fenotipo microftálmico.

En los animales tratados con AGN también detectamos una reducción de la densidad de células positivas para Pax6. Sin embargo, la inmunoreactividad para Sox2 es similar en los controles y en los tratados; incluso la densidad de células Sox2 positivas es mayor en los tratados. De hecho, además de las células positivas para Sox2 que encontramos en las mismas regiones de la retina que en los animales control, hay algunas células Sox2 positivas en las proximidades de la CPE, que parecen encontrarse dentro de la CNE, de igual forma que en los animales tratados con AR 1 μM a los 3 dpf. Esto

podría deberse a un retraso en la diferenciación de la retina, como comentamos en el caso del tratamiento con AR, ya que la posición de esas células se corresponde con estadios anteriores del desarrollo.

El tratamiento con DEAB produce la pérdida de inmunorreactividad para Sox2, mientras que el tratamiento con AGN no. Ello podría ser debido a que no hayamos conseguido un bloqueo eficaz de todos los receptores RAR, o a que otro mecanismo compense la inactividad de los RAR, como por ejemplo, la activación de los receptores RXR.

El posible retraso en la diferenciación celular y la falta de generación de neuronas se confirma al analizar la inmunohistoquímica para CR. La densidad de las células positivas para CR es menor en los animales tratados con DEAB o con AGN que en los controles. En cuanto al nervio óptico, los axones inmunorreactivos para CR que encontramos tanto en los animales tratados como en los controles, indican que las células ganglionares que sí se diferencian maduran y emiten sus axones de forma correcta.

El resultado de la técnica inmunohistoquímica para GS también apoya que el tratamiento con DEAB o con AGN produzca un retraso en la diferenciación, ya que a pesar de no encontrar alteraciones morfológicas en las células de Müller, su densidad es menor en los tratados que en los controles. Además, el inmunomarcaje para GFAP, que como la GS es un marcador de diferenciación de las células de Müller, es muy reducido en los animales tratados con DEAB.

En los animales tratados con DEAB el marcaje para Neurolina se encuentra extendido por toda la CCG, mientras que en los controles está más restringido a los márgenes. Durante el desarrollo normal, según maduran las células ganglionares de la retina en la parte central de la CCG, pierden el marcaje para Neurolina, a la vez que ganan marcaje para CR. Así, el hecho de que las células ganglionares retengan el marcaje para Neurolina, mientras que las células CR positivas son menos numerosas que en los controles, podría indicar cierto retraso en la diferenciación celular de la CCG, coincidiendo con lo descrito para GS y GFAP en la retina. En cuanto al nervio óptico, considerando el marcaje observado para Neurolina y Pax2, parece que se ha formado correctamente y el crecimiento de axones jóvenes asociados a células fusiformes Pax2 positivas no se encuentra alterado.

En lo que respecta al marcaje para Neurolina en los animales tratados con AGN, se producen las mismas alteraciones que describimos en los animales tratados con AR 1 μ M. La CCG presenta inmunorreactividad en toda su extensión y hay procesos ectópicos

Neurolina positivos en la CNI. La fuerte inmunorreactividad para Neurolina en la CCG de los animales tratados con AGN, en lugar de en los márgenes como ocurre en los controles, podría reflejar un retraso en la retinogénesis, al igual que lo descrito para el tratamiento con DEAB. Lo más llamativo es la presencia de procesos ectópicos Neurolina positivos. Podría ocurrir que las células ganglionares de la retina percibieran la ausencia de señalización del AR y reaccionasen incrementando la expresión de Neurolina para compensar la falta de señal. Sin embargo, al igual que en los animales tratados con DEAB, el nervio óptico no parece estar afectado, pues no hay diferencias en el marcaje para Neurolina y Pax2.

Los resultados obtenidos tras la inhibición de la síntesis de AR y de sus receptores RAR indican que la microftalmia podría ser debida a un retraso en la retinogénesis. Si con los tratamientos con DEAB y AGN hubiéramos conseguido bloquear la señal del AR en nuestro modelo *in vivo*, podemos afirmar que el AR es necesario para el avance de la diferenciación celular de la retina.

Por otro lado, es llamativo que tanto el tratamiento con AR como la inhibición de la señal mediada por esta molécula durante la retinogénesis conduzcan al mismo fenotipo: la microftalmia. En un reciente estudio sobre el desarrollo embrionario del riñón de ratón (Lee *et al.*, 2012), se propone que el efecto teratogénico del AR es debido a que el exceso de AR produce en realidad la deficiencia de la señal del AR a largo plazo. En el citado estudio se demuestra que la administración de AR conduce a la reducción de la expresión de *Raldh*, mientras que aumenta la de *Cyp26*. Además, se reducen los niveles de AR en el tejido renal, que presenta malformaciones días después del tratamiento con AR, y que pueden revertirse mediante la administración materna de bajas dosis de AR.

El estudio de las enzimas implicadas en la síntesis y degradación del AR en el pez cebra, podría ayudar a comprobar si estos mecanismos son también la causa de la microftalmia debida a la manipulación experimental de la señal del AR que hemos realizado en el presente Trabajo.

Mutantes para *raldh3*

Otra manera más precisa de estudiar los efectos de la ausencia de AR en la retinogénesis, es la utilización de mutantes en los que algún paso de la ruta de señalización del AR esté bloqueado. En el presente Trabajo, y por vez primera, hemos

utilizado la línea mutante sa118. El alelo sa118 codifica para la enzima Raldh3, que sintetiza AR en la región ventral de la retina. Los mutantes poseen una mutación puntual que produce una enzima truncada no funcional.

Se ha descrito que los ratones *knockout* para *Raldh3* presentan malformaciones oculares (Dupè *et al.*, 2003). Por otra parte, un trabajo realizado en el pez cebra demostró que la administración de citral, un inhibidor de la actividad Raldh3, durante la formación de las vesículas ópticas conducía a la formación de ojos sin la mitad ventral de la retina y que esa malformación se revertía tratando a los embriones con AR (Marsh-Armstrong *et al.*, 1994). Estas malformaciones también se han descrito en *Xenopus* (Lupo *et al.*, 2005) y en codorniz (Maden *et al.*, 2007). Cuando realizamos los cruces de los animales adultos reproductores portadores de la mutación en el alelo sa118, esperábamos obtener que aproximadamente la cuarta parte de los embriones mostrara algún tipo de defecto en la morfogénesis del ojo, como por ejemplo coloboma.

Sin embargo, tras la observación bajo la lupa binocular del desarrollo de los embriones homocigotos para el alelo sa118 (*raldh3*^{-/-}), no hemos encontrado malformaciones evidentes, ni en los ojos ni en ninguna otra parte del animal. De hecho, los animales mutantes eran morfológicamente iguales a los silvestres y las mediciones del tamaño de la retina que realizamos no mostraron diferencias entre los mutantes y los silvestres.

La expresión de los genes que codifican para las enzimas Raldhs, se localiza en dos dominios de la retina a lo largo de su eje dorso-ventral durante la morfogénesis ocular del pez cebra: en un dominio dorsal se expresa *raldh2* (Marsh-Armstrong *et al.*, 1994; Begemann *et al.*, 2001; Grandel *et al.*, 2002) y en un dominio ventral *raldh3*, y muy débilmente también *raldh2* (Pittlik *et al.*, 2007, Liang *et al.*, 2008). Este mismo patrón, con un dominio dorsal y otro ventral, sin solapamiento entre ambos, es un rasgo común de la retina de los vertebrados (Matt *et al.*, 2005, Molotkov *et al.*, 2006). El pez medaka, que carece de expresión de *raldh3* en la región ventral de la retina, tiene una fuerte expresión de *raldh2* en esa región, además de en la retina dorsal (Cañestro *et al.*, 2009). Ello indica que estas enzimas deben tener una función durante la retinogénesis.

El hecho de que no observemos alteraciones en la morfología de los ojos de los embriones mutantes *raldh3*^{-/-} indica que la morfogénesis ocular del pez cebra puede ocurrir correctamente sin la enzima Raldh3 funcional. Estudios realizados en mamíferos proponen que la señalización del AR dentro de la retina no actúa en la correcta formación del ojo, sino que el proceso ocurre por la acción de la señal del AR dentro del

mesénquima periocular, el tejido embrionario que rodea al ojo (Matt *et al.*, 2005, 2008, Molotkov *et al.*, 2006). Sin embargo, un trabajo realizado en pez cebra (Lupo *et al.*, 2011) demuestra que, tanto la señal del AR dentro de la retina ventral, como la del mesénquima periocular, controlan la morfogénesis del ojo mediante mecanismos independientes y no redundantes.

En los mutantes *raldh3*^{-/-} que hemos analizado en el presente Trabajo podrían estar actuando diferentes mecanismos que conllevaran a la correcta formación de la retina. Podría ocurrir que el gen *raldh2* de la retina se sobreexpresara en el dominio ventral, como una forma de compensación por la inactividad de Raldh3.

Sin embargo, nuestros resultados indican que no hay una fuente de AR en la retina ventral que compense la ausencia de la enzima Raldh3, ya que al realizar la hibridación *in situ* para detectar el ARNm de *raldh2* no hemos encontrado diferencias entre los mutantes y los silvestres. La sobreexpresión dentro de la retina de algún gen diana del AR que esté implicado en la morfogénesis podría compensar la mutación sal18.

En cuanto a los procesos de proliferación celular, no hay diferencias en el número de células mitóticas entre los animales silvestres y los mutantes, lo que concuerda con que el tamaño de las retinas de ambos grupos sea similar.

Respecto al marcaje para Pax6, únicamente detectamos diferencias cuantitativas a las 48 hpf, ya que en los embriones mutantes hay menos células Pax6 positivas que en los silvestres. Teniendo en cuenta que a las 48 hpf Pax6 se encuentra en células que están en proceso de diferenciación en las regiones de la retina que darán lugar a la CCG y la parte vitreal de la CNI, tal vez esa diferencia transitoria en el número de células positivas para Pax6 se deba a un pequeño retraso en la diferenciación celular en las retinas de los mutantes.

Sin embargo, ese retraso en la diferenciación de la retina, si es que se produce, no se ve reflejado en la diferenciación de la CCG y la formación del nervio óptico, positivos para neurolina, ya que no hay diferencias entre los animales silvestres y los mutantes, tanto a las 48 hpf como a los 3 dpf. La expresión del factor de transcripción Pax2 está activada por AR (Hyatt *et al.*, 1996a), pero no hemos visto diferencias en el marcaje para esta proteína, que en ambos grupos se encuentra en células asociadas a los axones neurolina positivos. Esto apoya el modelo propuesto por Lupo *et al.* (2011), según el cual el AR y Pax2 actúan de forma paralela regulando la expresión de sus genes diana sin que sean necesarios el uno para la acción del otro.

Nuestros resultados, tomados en conjunto, indican que cuando la retina de los animales mutantes *raldh3*^{-/-} está prácticamente formada, a los 3 dpf, con todas sus capas organizadas, no presenta alteraciones morfológicas, y tampoco en el marcaje de las proteínas que hemos estudiado. Estos resultados parecen contradecir a los obtenidos por Hyatt *et al.* (1996a), quienes al inhibir la Raldh3 durante la formación de las vesículas ópticas obtienen alteraciones en la morfogénesis ocular. Sin embargo, apoyan la presencia de otros mecanismos que compensen la inactividad de la enzima Raldh3. En dicho estudio, la inhibición de la enzima se llevó a cabo durante un periodo de sólo dos horas. Ese periodo puede ser demasiado corto como para que se desencadenen mecanismos celulares o moleculares que palien la inhibición de la síntesis de AR en la retina ventral. En el caso del mutante *raldh3*^{-/-}, la enzima es inactiva durante todo el desarrollo, y tal vez esos posibles mecanismos puedan desencadenarse y establecerse a tiempo como para permitir que la retinogénesis se produzca correctamente.

Son necesarios estudios en profundidad de los posibles mecanismos que estén compensando la señalización del AR en la retina ventral. Por ejemplo, el análisis de la expresión de genes que se encuentren regulados por AR, así como de otros marcadores cuya expresión pudiera estar modificada como consecuencia de la mutación. Estos análisis podrían explicar por qué no se producen en la retina alteraciones similares a las que ocurren cuando inhibimos toda la señal del AR con DEAB o AGN, o cuando se inhibe la Raldh3 durante un corto periodo de tiempo.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados en este Trabajo de Tesis Doctoral, y como consecuencia de los resultados obtenidos y de la discusión llevada a cabo, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1. La exposición a AR durante la retinogénesis larvaria produce microftalmia y un bloqueo transitorio del crecimiento de nuevos axones del nervio óptico, probablemente debido a la falta de generación de nuevas células ganglionares de la retina.
2. La exposición a AR durante la retinogénesis embrionaria conduce a la microftalmia persistente, debida a un incremento de la muerte celular por apoptosis y a la alteración de la expresión de genes y proteínas implicadas en la neurogénesis y la diferenciación. Además, se bloquea el crecimiento de nuevos axones del nervio óptico, posiblemente debido a la pérdida de funcionalidad de la zona periférica germinal.
3. La inhibición de la síntesis de AR con DEAB y el bloqueo de la unión del AR a sus receptores nucleares RAR con AGN durante la retinogénesis embrionaria produce microftalmia debido a un retraso de la diferenciación celular dentro de la retina.
4. El déficit de la señal del AR produce el mismo tipo de alteraciones morfológicas y neuroquímicas en la retina que el exceso de la misma. Ello podría ser debido a que el exceso de esta sustancia produce una regulación de la ruta de señalización del AR que conduce a una disminución de dicha señal a largo plazo.
5. La ausencia de síntesis endógena de AR por la enzima Raldh3 no afecta a la especificación y morfogénesis de la retina del pez cebra ni parece afectar a la neurogénesis y la diferenciación celular en la misma. Este hecho podría ser debido a la existencia de mecanismos de compensación del déficit de la señalización del AR.

Conclusión general: El AR interviene en la retinogénesis embrionaria y larvaria, ya que la modificación experimental de sus niveles afecta a dicho proceso.

BIBLIOGRAFÍA

- Adler, R. y Belecky-Adams, T.L. (2002).** The role of bone morphogenetic proteins in the differentiation of the ventral optic cup. *Development* 129, 3161-3171.
- Arenzana, F.J. (2006).** Caracterización neuroquímica de las áreas visuales primarias del pez cebra en condiciones normales y en ciclopedia inducida por etanol. *Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.*
- Arenzana, F.J., Santos-Ledo, A., Porteros, A., Aijón, J., Velasco, A., Lara, J. M. y Arévalo, R. (2011).** Characterisation of neuronal and glial populations of the visual system during zebrafish lifespan. *Int J Dev Neurosci* 29, 441-449.
- Arévalo, R., Alonso, J.R., Porteros, A., Briñón, J.G., Crespo, C., Lara, J. y Aijón, J. (1995).** Calretinin-like immunoreactivity in the optic tectum of the tench (*Tinca tinca* L). *Brain Res* 671, 112-118.
- Balmer, J. E. y Blomhoff, R. (2002).** Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res* 43, 1773-1808.
- Baydas, G. y Tuzcu, M. (2005).** Protective effects of melatonin against ethanol-induced reactive gliosis in hippocampus and cortex of young and aged rats. *Exp Neurol* 194, 175-181.
- Begemann, G., Schilling, T.F., Rauch, G.J., Geisler, R. e Ingham, P.W. (2001).** The zebrafish neckless mutation reveals a requirement for raldh2 in mesodermal signals that pattern the hindbrain. *Development* 128, 3081-3094.
- Bernardos, R.L., Barthel, L.K., Meyers, J.R. y Raymond, P.A. (2007).** Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Müller glia that function as retinal stem cells. *J Neurosci* 27, 7028-7040.
- Biehlmaier, O., Neuhaus, S.C. y Kohler, K. (2001).** Onset and time course of apoptosis in the developing zebrafish retina. *Cell Tissue Res* 306, 199-207.
- Bill, B.R., Petzold, A.M., Clark, K.J., Schimmenti, L.A. y Ekker, S.C. (2009).** A primer for morpholino use in zebrafish. *Zebrafish* 6, 69-77.
- Boije, H., Ring, H., López-Gallardo, M., Prada, C. y Hallböök, F. (2010).** Pax2 is expressed in a subpopulation of Müller cells in the central chick retina. *Dev Dyn* 239, 1858-1866.
- Boylan, J.F. y Gudas, L.J. (1992).** The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-trans-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells. *J Biol Chem* 267, 21486-21491.
- Brandt, M.D., Jessberger, S., Steiner, B., Kronenberg, G., Reuter, K., Bick-Sander, A., von der Behrens, W. y Kempermann, G. (2003).** Transient calretinin expression defines early postmitotic step of neuronal differentiation in adult hippocampal neurogenesis of mice. *Mol Cell Neurosci* 24, 603-613.
- Brown, N.L., Kanekar, S., Vetter, M.L., Tucker, P.K., Gemza, D.L. y Glaser, T. (1998).** Math5 encodes a murine basic helix-loop-helix transcription factor expressed during early stages of retinal neurogenesis. *Development* 125, 4821-4833.
- Burrill, J.D. y Easter, S.S. Jr. (1995).** The first retinal axons and their microenvironment in zebrafish: cryptic pioneers and the pretract. *J Neurosci* 15, 2935-2947.
- Bylund, M., Andersson, E., Novitsch, B.G. y Muhr, J. (2003).** Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat Neurosci* 6, 1162-1168.
- Calderone, V., Folli, C., Marchesani, A., Berni, R. y Zanotti, G. (2002).** Identification and structural analysis of a zebrafish apo and holo cellular retinol-binding protein. *J Mol Biol* 16, 527-535.
- Campbell, D.S., Stringham, S.A., Timm, A., Xiao, T., Law, M.Y., Baier, H., Nonet, M.L. y Chien, C.B. (2007).** Slit1a inhibits retinal ganglion cell arborization and synaptogenesis via Robo2-dependent and -independent pathways. *Neuron* 55, 231-245.

- Cañestro, C., Postlethwait, J.H., González-Duarte, R. y Albalat, R. (2006).** Is retinoic acid genetic machinery a chordate innovation? *Evol Dev* 8, 394-406.
- Cañestro, C., Catchen, J.M., Rodríguez-Marí, A., Yokoi, H. y Postlethwait, J.H. (2009).** Consequences of lineage-specific gene loss on functional evolution of surviving paralogs: ALDH1A and retinoic acid signaling in vertebrate genomes. *PLoS Genet* 5, e1000496.
- Cardone, B. y Roots, B.I. (1990).** Comparative immunohistochemical study of glial filament proteins (glial fibrillary acidic protein and vimentin) in goldfish, octopus, and snail. *Glia* 3, 180-192.
- Castro, A., Becerra, M., Manso, M.J. y Anadón, R. (2003).** Distribution and development of calretinin-like immunoreactivity in the telencephalon of the brown trout, *Salmo trutta fario*. *J Comp Neurol* 467, 254-269.
- Castro, A., Becerra, M., Manso, M.J. y Anadón, R. (2006).** Calretinin immunoreactivity in the brain of the zebrafish, *Danio rerio*: distribution and comparison with some neuropeptides and neurotransmitter synthesizing enzymes. II. Midbrain, hindbrain and spinal cord. *J Comp Neurol* 494, 792-814.
- Cederlund, M.L., Morrissey, M.E., Baden, T., Scholz, D., Vendrell, V., Lagnado, L., Connaughton, V.P. y Kennedy, B.N. (2011).** Zebrafish Tg(7.2mab2112:EGFP)ucd2 transgenics reveal a unique population of retinal amacrine cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 1613-1621.
- Cervený, K.L., Cavodeassi, F., Turner, K.J., de Jong-Curtain, T.A., Heath, J.K. y Wilson, S. (2010).** The zebrafish *flotte-lotte* mutant reveals that the local retinal environment promotes the differentiation of proliferating precursor emerging from their stem cell niche. *Development* 137, 2107-2115.
- Chalepakis, G., Fritsch, R., Fickenscher, H., Deutsch, U., Goulding, M. y Gruss, P. (1991).** The molecular basis of the undulated/Pax-1 mutation. *Cell* 66, 873-884.
- Chambon, P. (1993).** The molecular and genetic dissection of the retinoid signalling pathway. *Gene* 135, 223-228.
- Chambon, P. (1996).** A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 10, 940-954.
- Chu, Y., Hughes, S. y Chan-Ling, T. (2001).** Differentiation and migration of astrocyte precursor cells and astrocytes in human fetal retina: relevance to optic nerve coloboma. *FASEB J* 15, 2013-2015.
- Cid, E. (2006).** Participación de las poblaciones proliferativas y de factores de transcripción en el crecimiento continuado y la regeneración del sistema visual de teleosteos. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca.
- Cole, L.K. y Ross, L.S. (2001).** Apoptosis in the developing zebrafish embryo. *Dev Biol* 240, 123-142.
- Cohlán, S.Q. (1953).** Excessive intake of vitamin A as a cause of congenital anomalies in the rat. *Science* 117, 535-536.
- Costaridis, P., Horton, C., Zeitlinger, J., Holder, N. y Maden, M. (1996).** Endogenous retinoids in the zebrafish embryo and adult. *Dev Dyn* 205, 41-51.
- Curto, G.G., Lara, J.M., Parrilla, M., Aijón, J. y Velasco, A. (2007).** Modifications of the retina neuronal populations of the heterozygous mutant small eye mouse, the *Sey*(Dey). *Brain Res* 1127, 163-176.
- Czerny, T., Schaffner, G. y Busslinger, M. (1993).** DNA sequence recognition by Pax proteins: bipartite structure of the paired domain and its binding site. *Genes Dev* 7, 2048-2061.
- Dahl, D., Crosby, C.J., Sethi, J.S. y Bignami, A. (1985).** Glial fibrillary acidic (GFA) protein in vertebrates: immunofluorescence and immunoblotting study with monoclonal and polyclonal antibodies. *J Comp Neurol* 239, 75-88.

- Davuluri, G., Gong, W., Yussuf, S., Lorent, K., Muthumani, M., Dolan, A. C. y Pack, M. (2008).** Mutation of the zebrafish nucleoporin *elys* sensitizes tissue progenitors to replication stress. *PLoS Genet* 4, e1000240.
- Deiner, M.S., Kennedy, T.E., Fazeli, A., Serafini, T., Tessier-Lavigne, M. y Sretavan, D.W. (1997).** Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia. *Neuron* 19, 575-589.
- Derouiche, A. y Ohm, T.G. (1994).** Glutamine synthetase immunoreactivity in the human hippocampus is lamina specific. *Neurosci Lett* 165, 179-182.
- Derouiche, A. y Rauen, T. (1995).** Coincidence of L-glutamate L-aspartate transporter (GLAST) and glutamine synthetase (GS) immunoreactions in retinal glia. Evidence for coupling of GLAST and GS in transmitter clearance. *J Neurosci Res* 42, 131-143.
- Diekmann, H. y Stuermer, C.A. (2009).** Zebrafish *neurodin-a* and *-b*, orthologs of ALCAM, are involved in retinal ganglion cell differentiation and retinal axon pathfinding. *J Comp Neurol* 513, 38-50.
- Dowling, J.E. (1964).** Nutritional and Inherited Blindness in the Rat. *Exp Eye Res* 15, 348-356.
- Dressler, G.R., Deutsch, U., Chowdhury, K., Nornes, H.O. y Gruss, P. (1990).** Pax2, a new murine paired-box-containing gene and its expression in the developing excretory system. *Development* 109, 787-795.
- Duester G. (2000).** Families of retinoid dehydrogenases regulating vitamin A function: production of visual pigment and retinoic acid. *Eur J Biochem* 267, 4315-4324.
- Duester, G. (2008).** Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* 134, 921-931.
- Dupè, V., Matt, N., Garnier, J.M., Chambon, P., Mark, M. y Ghyselinck, N.B. (2003).** A newborn lethal defect due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 14036-14041.
- Durston, A.J., Timmermans, J.P., Hage, W.J., Hendriks, H.F., de Vries, N.J., Heideveld, M. y Nieuwkoop, P.D. (1989).** Retinoic acid causes an anteroposterior transformation in the developing central nervous system. *Nature* 340, 140-144.
- Eagleson, G.W., Johnson-Meeter, L.J. y Frideres, J. (2001).** Effects of retinoic acid upon eye field morphogenesis and differentiation. *Dev Dyn* 221, 350-364.
- Eng, L.F., Vanderhaeghen, J.J., Bignami, A. y Gerstl, B. (1971).** An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res* 28, 351-354.
- Erskine L., Williams, S.E., Brose, K., Kidd, T., Rachel, R.A., Goodman, C.S., Tessier-Lavigne, M. y Mason C.A. (2000).** Retinal ganglion cell axon guidance in the mouse optic chiasm expression and function of Robos and Slits. *J Neurosci* 20, 4975-4982.
- Fan, X., Molotkov, A., Manabe, S., Donmoyer, C.M., Deltour, L., Foglio, M.H., Cuenca, A.E., Blaner, W.S., Lipton, S.A. y Duester, G. (2003).** Targeted Disruption of *Aldh1a1* (*Raldh1*) Provides Evidence for a Complex Mechanism of Retinoic Acid Synthesis in the Developing Retina. *Mol Cell Biol* 23, 4637-4648.
- Fantes, J., Ragge, N.K., Lynch, S.A., McGill, N.I., Collin, J.R., Howard-Peebles, P.N., Hayward, C., Vivian, A.J., Williamson, K., van Heyningen, V. y FitzPatrick, D.R. (2003).** Mutations in *SOX2* cause anophthalmia. *Nat Genet* 33, 461-463.
- Fernald, R.D. (1991).** Teleost vision: seeing while growing. *J Exp Zool Suppl* 5, 167-180.
- Ferreiro-Galve, S., Rodríguez-Moldes, I. y Candal, E. (2010).** Calretinin immunoreactivity in the developing retina of sharks: comparison with cell proliferation and GABAergic system markers. *Exp Eye Res* 91, 378-386.

- Ferreiro-Galve, S., Rodríguez-Moldes, I. y Candal, E. (2012).** Pax6 expression during retinogenesis in sharks: comparison with markers of cell proliferation and neuronal differentiation. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 318, 91–108.
- Fischer, A.J., McGuire, C.R., Dierks, B.D. y Reh, T.A. (2002).** Insulin and fibroblast growth factor 2 activate a neurogenic program in Müller glia of the chicken retina. *J Neurosci* 22, 9387-9398.
- Fischer, A. J., Skorupa, D., Schonberg, D. L. y Walton, N. A. (2006).** Characterization of glucagon-expressing neurons in the chicken retina. *J Comp Neurol* 496, 479–494.
- Fischer, A.J., Zelinka, C. y Scott, M.A. (2010a).** Heterogeneity of glia in the retina and optic nerve of birds and mammals. *PLoS One* 5, e10774.
- Fischer, A.J., Scott, M.A., Zelinka, C. y Sherwood, P. (2010b).** A novel type of glial cell in the retina is stimulated by insulin-like growth factor 1 and may exacerbate damage to neurons and Müller glia. *Glia* 58, 633-649.
- Folli, C., Calderone, V., Ottonello, S., Bolchi, A., Zanotti, G., Stoppini, M. y Berni, R. (2001).** Identification, retinoid binding, and X-ray analysis of a human retinol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 3710–3715.
- Fujii, H., Sato, T., Kaneko, S., Gotoh, O., Fujii- Kuriyama, Y., Osawa, K., Kato, S. y Hamada, H. (1997).** Metabolic inactivation of retinoic acid by a novel P450 differentially expressed in developing mouse embryos. *EMBO J* 16, 4163–4173.
- García-Crespo, D. y Vecino, E. (2004).** Differential expression of calretinin in the developing and regenerating zebrafish visual system. *Histol Histopathol* 19, 1193-1199.
- Giguère, V. (1994).** Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins: complex interplay in retinoid signaling. *Endocr Rev* 15, 61-79.
- Giroud, A. y Martinet, M. (1959).** Ocular malformations with fibrosis of the vitreous in rabbit embryos subjected to hypervitaminosis A. *Bull Soc Ophthalmol Fr* 3, 191-201.
- Giroud, A. y Martinet, M. (1961).** On the subject of cyclocephalic embryos. *C R Seances Soc Biol Fil* 155, 2074-2075.
- Giroud, A. y Martinet, M. (1962).** Lightness of the teratogenic dose of vitamin A. *C R Seances Soc Biol Fil* 156, 449-450.
- Glover, J.C., Renaud, J.S. y Rijli, F.M. (2006).** Retinoic acid and hindbrain patterning. *J Neurobiol* 66, 705-725.
- Grandel, H., Lun, K., Rauch, G.J., Rhinn, M., Piotrowski, T., Houart, C., Sordino, P., Kuchler, A.M., Schulte-Merker, S., Geisler, R., Holder, N., Wilson, S.W. y Brand, M. (2002).** Retinoic acid signalling in the zebrafish embryo is necessary during pre-segmentation stages to pattern the anterior-posterior axis of the CNS and to induce a pectoral fin bud. *Development* 129, 2851–2865.
- Graw, J. (2010).** Eye development. *Curr Top Dev Biol* 90, 343-386.
- Grondona, J.M., Kastner, P., Gansmuller, A., Decimo, D., Chambon, P. y Mark, M. (1996).** Retinal dysplasia and degeneration in RARbeta2/RARgamma2 compound mutant mice. *Development* 122, 2173-2188.
- Gustafson, A.L., Donovan, M., Annerwall, E., Dencker, L. y Eriksson, U. (1996).** Nuclear import of cellular retinoic acid-binding protein type I in mouse embryonic cells. *Mech Dev* 58, 27-38.

- Hájos, F. y Kálmán, M. (1989).** Distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP)- immunoreactive astrocytes in the rat brain. II. Mesencephalon, rhombencephalon and spinal cord. *Exp Brain Res* 78, 164-173.
- Hale, L.A., Tallafuss, A., Yan, Y.L., Dudley, L., Eisen, J.S. y Postlethwait, J.H. (2006).** Characterization of the retinoic acid receptor genes *raraa*, *rarab* and *rarg* during zebrafish development. *Gene Expr Patterns* 6, 546-555.
- Hendzel, M.J., Wei, Y., Mancini, M.A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B.R., Bazett-Jones, D.P. y Allis, C.D. (1997).** Mitosis-specific phosphorylation of histones H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* 106, 348-360.
- Hernández, C., Martín, M., Bodega, G., Suárez, I., Pérez, J. y Fernández, B. (1999).** Response of carp central nervous system to hyperammonemic conditions: an immunocytochemical study of glutamine synthetase (GS), glial fibrillary acidic protein (GFAP) and 70 kDa heat-shock protein (HSP70). *Aquatic Toxicol* 45, 195-207.
- Hernandez, R.E., Putzke, A.P., Myers, J.P., Margaretha, L. y Moens, C.B. (2007).** Cyp26 enzymes generate the retinoic acid response pattern necessary for hindbrain development. *Development* 134, 177-187.
- Hever, A.M., Williamson, K.A. y van Heyningen, V. (2006).** Developmental malformations of the eye: the role of Pax6, Sox2 and Otx2. *Clin Genet* 69, 459-470.
- Hill, J., Clarke, J.D., Vargesson, N., Jowett, T. y Holder, N. (1995).** Exogenous retinoic acid causes specific alterations in the development of the midbrain and hindbrain of the zebrafish embryo including positional respecification of the Mauthner neuron. *Mech Dev* 50, 3-16.
- Hirsch, N. y Harris, W. A. (1997).** Xenopus pax-6 and retinal development. *J Neurobiol* 32, 45-61.
- Hitchcock, P.F., Macdonald, R.E., VanDeRyt, J.T. y Wilson, S.W. (1996).** Antibodies against Pax6 immunostain amacrine and ganglion cells and neuronal progenitors, but not rod precursors, in the normal and regenerating retina of the goldfish. *J Neurobiol* 29, 399-413.
- Holder, N. y Hill, J. (1991).** Retinoic acid modifies development of the midbrain-hindbrain border and affects cranial ganglion formation in zebrafish embryos. *Development* 113, 1159-1170.
- Hu, M. y Easter, S.S. (1999).** Retinal neurogenesis: the formation of the initial central patch of postmitotic cells. *Dev Biol* 207, 309-321.
- Hunter, K., Maden, M., Summerbell, D., Eriksson, U. y Holder, N. (1991).** Retinoic acid stimulates neurite outgrowth in the amphibian spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 3666-3670.
- Hyatt, G.A., Schmitt, E.A., Marsh-Armstrong, N.R. y Dowling, J.E. (1992).** Retinoic acid-induced duplication of the zebrafish retina. *Neurobiology* 89, 8293-8297.
- Hyatt, G.A., Schmitt, E.A., Marsh-Armstrong, N., McCaffery, P., Dräger, U.C. y Dowling, J.E. (1996a).** Retinoic acid establishes ventral retinal characteristics. *Development* 122, 195-204.
- Hyatt, G.A., Schmitt, E.A., Fadool, J.M. y Dowling, J.E. (1996b).** Retinoic acid alters photoreceptor development in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 13298-13303.
- Inoue, M., Kamachi, Y., Matsunami, H., Imada, K., Uchikawa, M. y Kondoh, H. (2007).** PAX6 and SOX2-dependent regulation of the Sox2 enhancer N-3 involved in embryonic visual system development. *Genes Cells* 12, 1049-1061
- Johns, P.R. (1977).** Growth of the adult goldfish eye. III. Source of the new retinal cell. *J Comp Neurol* 176, 343-357.

- Jusuf, P.R. y Harris, W.A. (2009).** Ptf1a is expressed transiently in all types of amacrine cells in the embryonic zebrafish retina. *Neural Dev* 4, 34.
- Kanki, J.P., Chang, S. y Kuwada, J.Y. (1994).** The molecular cloning and characterization of potential chick DM-GRASP homologs in zebrafish and mouse. *J Neurobiol* 25, 831-845.
- Karl, M.O., Hayes, S., Nelson, B.R., Tan, K., Buckingham, B. y Reh, T.A. (2008).** Stimulation of neural regeneration in the mouse retina. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 19508-19513.
- Kashyap, B., Frederickson, L.C. y Stenkamp, D.L. (2007).** Mechanisms for persistent microphthalmia following ethanol exposure during retinal neurogenesis in zebrafish embryos. *Vis. Neurosci* 24, 409-421.
- Kashyap, B., Frey, R.A. y Stenkamp, D.L. (2011).** Ethanol-induced microphthalmia is not mediated by changes in retinoic acid or sonic hedgehog signaling during retinal neurogenesis. *Alcoholism Clin Exp Res* 35, 1644-1661.
- Kastner, P., Grondona, J.M., Mark, M., Gansmuller, A., LeMeur, M., Decimo, D., Vonesch, J.L., Dolle, P. y Chambon, P. (1994).** Genetic analysis of RXR alpha developmental function: convergence of RXR and RAR signaling pathways in heart and eye morphogenesis. *Cell* 78, 987-1003.
- Kawaguchi, R., Yu, J., Honda, J., Hu, J., Whitelegge, J., Ping, P., Wiita, P., Bok, D. y Sun, H. (2007).** A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science* 315, 820-825.
- Kay, J.N., Finger-Baier, K.C., Roeser, T., Staub, W. y Baier, H. (2001).** Retinal ganglion cell genesis requires lakritz, a zebrafish atonal homolog. *Neuron* 30, 725-736.
- Kelley, M.W., Turner, J.K. y Reh, T.A. (1994).** Retinoic acid promotes differentiation of photoreceptors in vitro. *Development* 120, 2091-2102.
- Kelley, M.W., Williams, R.C., Turner, J.K., Creech-Kraft, J.M. y Reh, T.A. (1999).** Retinoic acid promotes rod photoreceptor differentiation in rat retina in vivo. *Neuroreport* 10, 2389-2394.
- Kempermann, G., Jessberger, S., Steiner, B. y Kronenberg, G. (2004).** Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci* 27, 447-452.
- Kidd, T., Brose, K., Mitchell, K.J., Fetter, R.D., Tessier-Lavigne, M., Goodman, C.S. y Tear, G. (1998).** Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell* 92, 205-215.
- Kljavin, I.J. (1987).** Early development of photoreceptors in the ventral retina of the zebrafish embryo. *J Comp Neurol* 260, 461-71.
- Krauss, S., Johansen, T., Korzh, V. y Fjose, A. (1991).** Expression of the zebrafish paired box gene pax[zf-b] during early neurogenesis. *Development* 113, 1193-1206.
- Krauss, S., Maden, M., Holder, N. y Wilson, S.W. (1992).** Zebrafish pax[b] is involved in the formation of the midbrain-hindbrain boundary. *Nature* 360, 87-89.
- Laessing, U., Giordano, S., Stecher, B., Lottspeich, F. y Stuermer, C.A.O. (1994).** Molecular characterization of fish neurolin, a growth associated cell surface protein and member of the immunoglobulin superfamily in the fish retinotectal system with similarities to chick protein DM-GRASP/SC-1/BEN. *Differentiation* 56, 21-29.
- Laessing, U., y Stuermer, C.A. (1996).** Spatiotemporal pattern of retinal ganglion cell differentiation revealed by the expression of neurolin in embryonic zebrafish. *J Neurobiol* 29, 65-74.
- Lampert, J.M., Holzschuh, J., Hessel, S., Driever, W., Vogt, K. y von Lintig, J. (2003).** Provitamin A conversion to retinal via the beta,beta-carotene-15,15'-oxygenase (bcox) is essential for pattern formation and differentiation during zebrafish embryogenesis. *Development* 130, 2173-2186.

- Larison, K.D. y Bremiller, R. (1990).** Early onset of phenotype and cell patterning in the embryonic zebrafish retina. *Development* 109, 567-576.
- Lawrence, J.M., Singhal, S., Bhatia, B., Keegan, D.J., Reh, T.A., Luthert, P.J., Khaw, P. T. y Limb, G.A. (2007).** MIO-M1 cells and similar Müller glial cell lines derived from adult human retina exhibit neural stem cell characteristics. *Stem Cells* 25, 2033-2043.
- Le, H.T., Dowling, J.E. y Cameron, J. (2012).** Early retinoic acid deprivation in developing zebrafish results in microphthalmia. *Vis Neurosci* 29, 219-228.
- Lee, L.M., Leung, C.Y., Tang, W.W., Choi, H.L., Leung, Y.C., McCaffery, P.J., Wang, C.C., Woolf, A.S. y Shum, A.S. (2012).** A paradoxical teratogenic mechanism for retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 13668-13673.
- Lengler, J., Bittner, T., Münster, D., Gawad, A. D. y Graw, J. (2005).** Agonistic and antagonistic action of AP2, Msx2, Pax6, Prox1 and Six3 in the regulation of Sox2 expression. *Ophthalmic Res* 37, 301-309.
- Leonard, L., Horton, C., Maden, M. y Pizzey, J.A. (1995).** Anteriorization of CRABP-I expression by retinoic acid in the developing mouse central nervous system and its relationship to teratogenesis. *Dev Biol* 168, 514-528.
- Li, E. y Norris, A.W. (1996).** Structure/function of cytoplasmic vitamin A-binding proteins. *Annu Rev Nutr* 16, 205-234.
- Li, H., Tierney, C., Wen, L., Wu, J.Y. y Rao, Y. (1997).** A single morphogenetic field gives rise to two retina primordia under the influence of the prechordal plate. *Development* 124, 603-15.
- Li, H., Wagner, E., McCaffery, P., Smith, D., Andreadis, A., Dräger, U.C. (2000).** A retinoic acid synthesizing enzyme in ventral retina and telencephalon of the embryonic mouse. *Mech Dev* 95, 283-289.
- Liang, D., Zhang, M., Bao, J., Zhang, L., Xu, X., Gao, X. y Zhao, Q. (2008).** Expressions of Raldh3 and Raldh4 during zebrafish early development. *Gene Expr Patterns* 8, 248-253.
- Lin, Y.P., Ouchi, Y., Satoh, S. y Watanabe, S. (2009).** Sox2 plays a role in the induction of amacrine and Müller glial cells in mouse retinal progenitor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50, 68-74.
- Linsler, P. y Moscona, A.A. (1979).** Induction of glutamine synthetase in embryonic neural retina: localization in Müller fibers and dependence on cell interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 6476-6480.
- Linsler, P. y Moscona, A.A. (1983).** Hormonal induction of glutamine synthetase in cultures of embryonic retina cells. Requirement for neuron glia contact interactions. *Dev Biol* 96, 529-534.
- Liu, W., Mo, Z. y Xiang, M. (2001).** The Ath5 proneural genes function upstream of Brn3 POU domain transcription factor genes to promote retinal ganglion cell development. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 1649-1654.
- López, S.L. y Carrasco, A.E. (1992).** Retinoic acid induces changes in the localization of homeobox proteins in the antero-posterior axis of *Xenopus laevis* embryos. *Mech Dev* 36, 153-164.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. y Richmond, T.J. (1997).** Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 231-233.
- Lukas, W. y Jones, K.A. (1994).** Cortical neurons containing calretinin are selectively resistant to calcium overload and excitotoxicity in vitro. *Neuroscience* 61, 307-316.
- Lupo, G., Liu, Y., Qiu, R., Chandraratna, R.A., Barsacchi, G., He, R.Q. y Harris, W.A. (2005).** Dorsoventral patterning of the *Xenopus* eye: a collaboration of Retinoid, Hedgehog and FGF receptor signaling. *Development* 132, 1737-1748.

Lupo, G., Gestri, G., O'Brien, M., Denton, R.M., Chandraratna, R.A., Ley S.V., Harris W.A. y Wilson, S.W. (2011). Retinoic acid receptor signaling regulates choroid fissure closure through independent mechanisms in the ventral optic cup and periocular mesenchyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 24, 8698-8703.

Macdonald, R., Barth, K.A., Xu, Q., Holder, N., Mikkola, I. y Wilson, S.W. (1995). Midline signalling is required for Pax gene regulation and patterning of the eyes. *Development* 121, 3267-3278.

Macdonald, R. y Wilson, S.W. (1996.) Pax proteins and eye development. *Curr Opin Neurobiol* 6, 49-56.

Macdonald, R., Scholes, J., Strahle, U., Brennan, C., Holder, N., Brand, M. y Wilson, S.W. (1997). The Pax protein Noi is required for commissural axon pathway formation in the rostral forebrain. *Development* 124, 2397-2408.

Maden, M. (2002). Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat Rev Neurosci* 3, 843-853.

Maden, M., Blentic, A., Reijntjes, S., Seguin, S., Gale, E. y Graham, A. (2007). Retinoic acid is required for specification of the ventral eye field and for Rathke's pouch in the avian embryo. *Int J Dev Biol* 51, 191-200.

Mangelsdorf, D.J. (1994). Vitamin A receptors. *Nutr Rev* 52, 32-44.

Marshall, H., Morrison, A., Studer, M., Popperl, H. y Krumlauf, R. (1996). Retinoids and Hox genes. *FASEB J* 10, 969-978.

Marsh-Armstrong, N., McCaffery, P., Gilbert, W., Dowling, J.E. y Dräger, U.C. (1994). Retinoic acid is necessary for development of the ventral retina in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 7286-7290.

Mark, M., Ghyselinck, N.B. y Chambon, P. (2006). Function of retinoid nuclear receptors: lessons from genetic and pharmacological dissections of the retinoic acid signaling pathway during mouse embryogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 46, 451-480.

Marquardt, T., Ashery-Padan, R., Andrejewski, N., Scardigli, R., Guillemot, F. y Gruss, P. (2001). Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell* 105, 43-55.

Masai, I., Stemple, D.L., Okamoto, H. y Wilson, S.W. (2000). Midline signals regulate retinal neurogenesis in zebrafish. *Neuron* 27, 251-63.

Matt, N., Dupe, V., Garnier, J.M., Dennefeld, C., Chambon, P., Mark, M. y Ghyselinck, N.B. (2005). Retinoic acid-dependent eye morphogenesis is orchestrated by neural crest cells. *Development* 132, 4789-4800.

Matt, N., Ghyselinck, N.B., Pellerin, I. y Dupe, V. (2008). Impairing retinoic acid signalling in the neural crest cells is sufficient to alter entire eye morphogenesis. *Dev Biol* 320, 140-148.

Matsuo, T., Osumi-Yamashita, N., Noji, S., Ohuchi, H., Koyama, E., Myokai, F., Matsuo, N., Taniguchi, S., Doi, H., e Iseki, S. (1993). A mutation in the Pax-6 gene in rat small eye is associated with impaired migration of midbrain crest cells. *Nat Genet* 3, 299-304.

McCaffery, P., Tempst, P., Lara, G. y Drager, U. (1991). Aldehyde dehydrogenase is a positional marker in the retina. *Development* 112, 693-702.

Mearow, K.M., Mill, J.F. y Vitkovic, L. (1989). The ontogeny and localization of glutamine synthetase gene expression in rat brain. *Mol Brain Res* 6, 223-232.

Meister, A. (1974). An enzymatic basis for a blood-brain barrier? The gamma-glutamyl cycle-background and considerations relating to amino acid transport in the brain. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 53, 273-291.

- Meyer, R.L. (1978).** Evidence from thymidine labelling for continuing growth of retina and tectum in juvenil goldfish. *Exp Neurol* 59, 99-111.
- Mic, F., Molotkov, A., Fan, X., Cuenca, A.E. y Duester, G. (2000).** RALDH3, a retinaldehyde dehydrogenase that generates retinoic acid, is expressed in the ventral retina, otic vesicle and olfactory pit during mouse development. *Mech Dev* 97, 227-230.
- Mic, F., Molotkov, A., Benbrook, D.M. y Duester, G. (2003).** Retinoid activation of retinoic acid receptor but not retinoid X receptor is sufficient to rescue lethal defect in retinoic acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 7135-7140.
- Mic, F.A., Molotkov, A., Molotkova, N. y Duester, G. (2004).** *raldh2* expression in optic vesicle generates a retinoic acid signal needed for invagination of retina during optic cup formation. *Dev Dyn* 231, 270-277.
- Miyasaka, N., Sato, Y., Yeo, S.Y., Hutson, L.D., Chien, C.B., Okamoto, H. y Yoshihara, Y. (2005).** Robo2 is required for establishment of a precise glomerular map in the zebrafish olfactory system. *Development* 132, 1283-1293.
- Molotkov, A., Molotkova, N. y Duester, G. (2006).** Retinoic acid guides eye morphogenetic movements via paracrine signaling but is unnecessary for retinal dorsoventral patterning. *Development* 133, 1901-1910.
- Monzón-Mayor, M., Yanes, C., Ghandour, M.S., De, B. y Gombos, G. (1990).** Glial fibrillary acidic protein and vimentin immunohistochemistry in the developing and adult midbrain of the lizard *Gallotia galloti*. *J Comp Neurol* 295, 569-579.
- Morriss, G.M. (1972).** Morphogenesis of the malformations induced in rat embryos by maternal hypervitaminosis A. *J Anat* 113, 241-250.
- Müller, H. (1952).** Bau und wachstum der netzhaut des Guppy (*Lebistes reticulatus*). *Zoologische Jahrbücher Abteilung für Allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere* 63, 275-324.
- Nagashima, M., Sakurai, H., Mawatari, K., Koriyama, Y., Matsukawa, T. y Kato, S. (2009).** Involvement of retinoic acid signaling in goldfish optic nerve regeneration. *Neurochem Int* 54, 229-236.
- Napoli, J.L. (1993).** Biosynthesis and metabolism of retinoic acid: roles of CRBP and CRABP in retinoic acid homeostasis. *J Nutr* 123, 362-366.
- Napoli, J.L. (1996).** Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clin immunol immunopathol* 80, 52-62.
- Neumann, C.J. y Nüsslein-Volhard, C. (2000).** Patterning of the zebrafish retina by a wave of sonic hedgehog activity. *Science* 289, 2137-2139.
- Niclou, S.P., Jia, L. y Raper, J.A. (2000).** Slit2 is a repellent for retinal ganglion cell axons. *J Neurosci* 20, 4962-4974.
- Niederreither, K., McCaffery, P., Drager, U.C., Chambon, P. y Dolle, P. (1997).** Restricted expression and retinoic acid-induced downregulation of the retinaldehyde dehydrogenase type 2 (RALDH-2) gene during mouse development. *Mech Dev* 62, 67-78.
- Niederreither, K. y Dollé, P. (2008).** Retinoic acid in development: towards an integrated view. *Nat Rev Genet* 9, 541-453
- Nornes, S., Clarkson, M., Mikkola, I., Pedersen, M., Bardsley, A., Martinez, J.P., Krauss, S. y Johansen, T. (1998).** Zebrafish contains two pax6 genes involved in eye development. *Mech Dev* 77, 185-196.
- Norenberg, M.D. y Martínez-Hernández, A. (1979).** Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res* 161, 303-310.

- O'Callaghan, J.P. y Sriram, K. (2005).** Glial fibrillary acidic protein and related glial proteins as biomarkers of neurotoxicity. *Expert Opin Drug Saf* 4, 433-442.
- Olson, A.J., Picones, A., Julian, D. y Korenbrot, J.I. (1999).** A developmental time line in a retinal slice from rainbow trout. *J Neurosci Methods* 93, 91-100.
- Ong, D.E. (1994).** Cellular transport and metabolism of vitamin A: roles of the cellular retinoid-binding proteins. *Nutr Rev* 52, S24-31.
- Onteniente, B., Kimura, H. y Maeda, T. (1983).** Comparative study of the glial fibrillary acidic protein in vertebrates by PAP immunohistochemistry. *J Comp Neurol* 215, 427-436.
- Osakada, F., Ikeda, H., Mandai, M., Wataya, T., Watanabe, K., Yoshimura, N., Akaike, A., Sasai, Y. y Takahashi, M. (2008).** Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 26, 215-224.
- Osmond, M.K., Butler, A.J., Voon, F.C. y Bellairs, R. (1991).** The effects of retinoic acid on heart formation in the early chick embryo. *Development* 113, 1405-1417.
- Otteson, D. y Hitchcock, P.F. (2003).** Stem cells in the teleost retina: persistent neurogenesis and injury-induced regeneration. *Vis Res* 43, 927-936.
- Papalopulu, N. y Kintner, C. (1996).** A posteriorising factor, retinoic acid, reveals that anteroposterior patterning controls the timing of neuronal differentiation in *Xenopus* neuroectoderm. *Development* 122, 3409-3418.
- Pares, X., Farres, J., Kedishvili, N. y Duester, G. (2008).** Medium- and short- chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: medium-chain and short-chain dehydrogenases/reductases in retinoid metabolism. *Cell Mol Life Sci* 65, 3936-3949.
- Parrilla, M., Lillo, C., Herrero-Turrión, M.J., Arévalo, R., Lara, J.M., Aijón, J. y Velasco, A. (2009).** Pax2 in the optic nerve of the goldfish, a model of continuous growth. *Brain Res* 1255, 75-88.
- Parrilla, M., Lillo, C., Herrero-Turrión, M.J., Arévalo, R., Aijón, J., Lara, J.M. y Velasco, A. (2012).** Pax2 astrocytes in the goldfish optic nerve head after crush. *Brain Res* 1492, 18-32.
- Paschke, K.A., Lottspeich, F. y Stuermer, C.A. (1992).** Neurolin, a cell surface glycoprotein on growing retinal axons in the goldfish visual system, is reexpressed during retinal axonal regeneration. *J Cell Biol* 117, 863-875.
- Perz-Edwards, A., Hardison, N.L. y Linney, E. (2001).** Retinoic acid-mediated gene expression in transgenic reporter zebrafish. *Dev Biol* 229, 89-101.
- Peterson, R.E., Fadool, J.M., McClintock, J. y Linser, P.J. (2001).** Müller cell differentiation in the zebrafish neural retina: Evidence of distinct early and late stages in cell maturation. *J Comp Neurol* 429, 530-540.
- Pittlik, S., Domingues, S., Meyer, A. y Begemann, G. (2007).** Expression of zebrafish *aldh1a3* (*raldh3*) and absence of *aldh1a1* in teleosts. *Gene Expr Patterns* 8, 141-147.
- Plum, L.A. y Clagett-Dame, M. (1996).** All-trans retinoic acid stimulates and maintains neurite outgrowth in nerve growth factor- supported developing chick embryonic sympathetic neurons. *Dev Dyn* 205, 52-63.
- Prabhudesai, S.N., Cameron, D.A. y Stenkamp, D.L. (2005).** Targeted effects of retinoic acid signaling upon photoreceptor development in zebrafish. *Dev Biol* 287, 157-167.
- Prada, F.A., Quesada, A., Dorado, M.E., Chmielewski, C. y Prada, C. (1998).** Glutamine synthetase (GS) activity and spatial and temporal patterns of GS expression in the developing chick retina: Relationship with synaptogenesis in the outer plexiform layer. *Glia* 22, 221-236.

- Prigent, C. y Dimitrov, S. (2003).** Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *Journal of Cell Science* 116, 3677-3685.
- Raymond, P.A. y Rivlin, P.K. (1987).** Germinal cells in the goldfish retina that produce rod photoreceptors. *Dev Biol* 122, 120-138.
- Raymond, P.A., Barthel, L.K. y Curran, G.A. (1995).** Developmental patterning of rod and cone photoreceptors in embryonic zebrafish. *J Comp Neurol* 359, 537-550.
- Raymond, P.A. (1991).** Cell determination and positional cues in the teleost retina: development of photoreceptors and horizontal cells. En: *Development of the Visual System* (eds. Lam, D.M.K. y Shatz, C.). MIT Press, Cambridge. 59-78.
- Resibois, A. y Rogers, J.H. (1992).** Calretinin in rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroscience* 46, 101-134.
- Rhinn, M. y Dollé, P. (2012).** Retinoic acid signalling during development. *Development* 139, 843-858.
- Ridgway, P. y Almouzni, G. (2001).** Chromatin assembly and organization. *J Cell Science* 114, 2711-2712.
- Riepe, R.E. y Norenburg, M.D. (1977).** Müller cell localization of glutamine synthetase in rat retina. *Nature* 268, 654-655.
- Riesenberg, A.N., Le, T.T., Willardsen, M.I., Blackburn, D.C., Vetter, M.L. y Brown, N.L. (2009).** Pax6 regulation of Math5 during mouse retinal neurogenesis. *Genesis* 47, 175-187.
- Rochette-Egly, C. y Germain, P. (2009).** Dynamic and combinatorial control of gene expression by nuclear retinoic acid receptors (RARs). *Nucl Recept Signal* 7, e005.
- Rodger, J., King, C.E., Lukehurst, S., Chen, P.B., Dunlop, S.A., Beazley, L.D. y Ziman, M.R. (2006).** Changing Pax6 expression correlates with axon outgrowth and restoration of topography during optic nerve regeneration. *Neuroscience* 142, 1043-1054.
- Rothberg, J.M., Hartley, D.A., Walther, Z. y Artavanis-Tsakonas, S. (1988).** slit: an EGF-homologous locus of *D. melanogaster* involved in the development of the embryonic central nervous system. *Cell* 55, 1047-1059.
- Rouédec, D.L., Rayner, K., Rex, M., Wigmore, P.M. y Scotting, P.J. (2002).** The transcription factor cSox2 and Neuropeptide Y define a novel subgroup of amacrine cells in the retina. *J Anat* 220, 51-56.
- Rueger, D.C., Dahl, D. y Bignami, A. (1978).** Purification of a brain-specific astroglial protein by immunoaffinity chromatography. *Anal Biochem* 89, 360-371.
- Rusoff, A.C. y Easter, S.S.Jr. (1980).** Order in the optic nerve of goldfish. *Science* 208, 311- 312.
- Santos-Ledo, A., Arenzana, F.J., Porteros, A., Lara, J., Velasco, A., Aijón, J. y Arévalo, R. (2011).** Cytoarchitectonic and neurochemical differentiation of the visual system in ethanol-induced cyclopic zebrafish larvae. *Neurotoxicol Teratol* 33, 686-697.
- Sanyanusin, P., Schimmenti, L.A., McNoe, L.A., Ward, T.A., Pierpont, M.E., Sullivan, M.J., Dobyns, W.B. y Eccles, M.R. (1995).** Mutation of the PAX2 gene in a family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux. *Nat Genet* 9, 358-364.
- Schmidt-Kästner, R. y Szymas, J. (1990).** Immunohistochemistry of glial fibrillary acidic protein, vimentin and S-100 protein for study of astrocytes in hippocampus of rat. *J Chem Neuroanat* 3, 179-192.

- Schmitt, E.A. y Dowling, J.E. (1994).** Early eye morphogenesis in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J Comp Neurol* 344, 532-542.
- Schmitt, E.A. y Dowling, J.E. (1996).** Comparison of topographical patterns of ganglion and photoreceptor cell differentiation in the retina of the zebrafish, *Danio rerio*. *J Comp Neurol* 371, 222-234.
- Schmitt, E.A. y Dowling, J.E. (1999).** Early retinal development in the zebrafish, *Danio rerio*: light and electron microscopic analyses. *J Comp Neurol* 404, 515-536.
- Schug, T.T., Berry, D.C., Shaw, N.S., Travis, S.N. y Noy, N. (2007).** Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. *Cell* 129, 723-733.
- Schwarz, M., Cecconi, F., Bernier, G., Andrejewski, N., Kammandel, B., Wagner, M. y Gruss, P. (2000).** Spatial specification of mammalian eye territories by reciprocal transcriptional repression of Pax2 and Pax6. *Development* 127, 4325-4334.
- See, A.W. y Clagett-Dame, M. (2009).** The temporal requirement for vitamin A in the developing eye: mechanism of action in optic fissure closure and new roles for the vitamin in regulating cell proliferation and adhesion in the embryonic retina. *Dev Biol* 325, 94-105.
- Sen, J., Harpavat, S., Peters, M.A. y Cepko, C.L. (2005).** Retinoic acid regulates the expression of dorsoventral topographic guidance molecules in the chick retina. *Development* 132, 5147-5159.
- Sensenbrenner, M., Devilliers, G., Bock, E. y Porte, A. (1980).** Biochemical and ultrastructural studies of cultured rat astroglial cells: effect of brain extract and dibutyryl-cyclic-AMP on glial fibrillary acidic protein and glial filaments. *Differentiation* 17, 51-61.
- Sharma, S.C. y Ungar, F. (1980).** Histogenesis of the goldfish retina. *J Comp Neurol* 191, 373-382.
- Shenefelt, R.E. (1972).** Gross congenital malformations. Animal model: treatment of various species with a large dose of vitamin A at known stages in pregnancy. *Am J Pathol* 166, 589-592
- Sherpa, T., Fimbel, S.M., Mallory, D.E., Maaswinkel, H., Spritzer, S.D., Sand, J.A., Li, L., Hyde, D.R. y Stenkamp DL. (2008).** Ganglion cell regeneration following whole retina destruction in zebrafish. *Dev Neurobiol* 68, 166-181.
- Sive, H.L., Draper, B.W., Harland, R.M. y Weintraub, H. (1990).** Identification of a retinoic acid-sensitive period during primary axis formation in *Xenopus laevis*. *Genes Dev* 4, 932-942.
- Smith, A.N., Miller, L.A., Radice, G., Ashery-Padan, R. y Lang, R.A. (2009).** Stage-dependent modes of Pax6-Sox2 epistasis regulate lens development and eye morphogenesis. *Development* 136, 2977-2985.
- Sonneveld, E., van den Brink, C.E., van der Leede, B.J., Maden, M. y van der Saag, P.T. (1999).** Embryonal carcinoma cell lines stably transfected with mRARbeta2-lacZ: sensitive system for measuring levels of active retinoids. *Exp Cell Res* 250, 284-297.
- Sophos, N.A. y Vasiliou, V. (2003).** Aldehyde dehydrogenase gene superfamily: the 2002 update. *Chem Biol Interact* 143-144, 5-22.
- Stainier, D.Y. y Fishman, M.C. (1992).** Patterning the zebrafish heart tube: acquisition of anteroposterior polarity. *Dev Biol* 153, 91-101.
- Stenkamp, D.L., Gregory, J.K. y Adler, R. (1993).** Retinoid effects in purified cultures of chick embryo retina neurons and photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34, 2425-2436.
- Stenkamp, D.L., Frey, R.A., Mallory, D.E. y Shupe, E.E. (2002).** Embryonic retinal gene expression in sonic-you mutant zebrafish. *Dev Dyn* 225, 344-350.
- Stevens, C.B., Cameron, D.A. y Stenkamp, D.L. (2011).** Plasticity of photoreceptor-generating retinal progenitors revealed by prolonged retinoic acid exposure. *BMC Dev Biol* 11, 51.

- Stuermer, C.A. (1988).** Retinotopic organization of the developing retinotectal projection in the zebrafish embryo. *J Neurosci* 8, 4513-4530.
- Stuermer, C.A. y Bastmeyer, M. (2000).** The retinal axon's pathfinding to the optic disk. *Prog Neurobiol* 62, 197-214.
- Stull, D.L. y Wikler, K.C. (2000).** Retinoid-dependent gene expression regulates early morphological events in the development of the murine retina. *J Comp Neurol* 417, 289-298.
- Suárez, I., Bodega, G., Arilla, E. y Fernández, B. (1997).** Region-selective glutamine synthetase expression in the rat central nervous system following portocaval anastomosis. *Neuropath Appl Neurobiol* 23, 254-261.
- Suzuki, R., Shintani, T., Sakuta, H., Kato, A., Ohkawara, T., Osumi, N. y Noda, M. (2000).** Identification of RALDH-3, a novel retinaldehyde dehydrogenase, expressed in the ventral region of the retina. *Mech Dev* 98, 37-50.
- Talens-Visconti, R., Sánchez-Vera, I., Kostic, J., Pérez-Arago, M.A., Erceg, S., Stojkovic, M. y Guerri, C. (2011).** Neural differentiation from human embryonic stem cells as a tool to study early brain development and the neuroteratogenic effects of ethanol. *Stem Cells Dev* 20, 327-339.
- Tallafuss, A., Hale, L.A., Yan, Y.L., Dudley, L., Eisen, J.S. y Postlethwait, J.H. (2006).** Characterization of retinoid-X receptor genes rxra, rxrba, rxrbb and rxrg during zebrafish development. *Gene Expr Patterns* 6, 556-565.
- Taranova, O.V., Magness, S.T., Fagan, B.M., Wu, Y., Surzenko, N., Hutton, S.R. y Pevny, L.H. (2006).** SOX2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence. *Genes Dev* 20, 1187-1202.
- Thompson, H., Andrews, W., Parnavelas, J.G. y Erskine, L. (2009).** Robo2 is required for Slit-mediated intraretinal axon guidance. *Dev Biol* 15, 418-426.
- Torres, M., Gómez-Pardo, E. y Gruss, P. (1996).** Pax2 contributes to inner ear patterning and optic nerve trajectory. *Development* 122, 3381-3391.
- Treisman, J., Harris, E. y Desplan, C. (1991).** The paired box encodes a 2Nd DNA binding domain in the paired homeo domain protein. *Genes Dev* 5, 594-604.
- Trevarrow, B. Marks, D.L. y Kimmel, C.B. (1990).** Organization of hindbrain segments in the zebrafish embryo. *Neuron* 4, 669-679.
- Velasco, A. (1992).** Glía en el Sistema Nervioso Central de teleósteos. Aportaciones morfológicas e inmunocitoquímicas. *Universidad de Salamanca. Trabajo de Grado.*
- Vogel, S., Mendelsohn, C.L., Mertz, J.R., Piantadosi, R., Waldburger, C., Gottesman, M.E. y Blaner, W.S. (2001).** Characterization of a new member of the fatty acid-binding protein family that binds all-*trans*-retinol. *J Biol Chem* 276, 1353-1360.
- Wallace, V.A. y Jensen, A.M. (1999).** IBMX, taurine and 9-*cis* retinoic acid all act to accelerate rhodopsin expression in postmitotic cells. *Exp Eye Res* 69, 617-627.
- Ward, S.J., Chambon, P., Ong, D.E. y Bavik, C. (1997).** A retinol-binding protein receptor-mediated mechanism for uptake of vitamin A to postimplantation rat embryos. *Biol Reprod* 57, 751-755.
- Warkany, J. y Schraffenberger, S. (1946).** Congenital malformations induced in rats by maternal vitamin A deficiency. I. Defects of the eye. *Archs Ophthalmol* 35, 150-169.
- Waxman, J.S. y Yelon, D. (2009).** Increased Hox activity mimics the teratogenic effects of excess retinoic acid signaling. *Dev Dyn* 238, 1207-1213.

Wehman, A.M., Staub, W., Meyers, J.R., Raymond, P.A. y Baier, H. (2005). Genetic dissection of the zebrafish retinal stem-cell compartment. *Dev Biol* 281, 53-65.

Westerfield, M. (1995). The Zebrafish Book. A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). Eugene: University of Oregon Press.

White, J.A., Guo, Y.D., Baetz, K., Beckett-Jones, B., Bonasoro, J., Hsu, K.E., Dilworth, F.J., Jones, G. y Petkovich, M. (1996). Identification of the retinoic acid-inducible all-trans-retinoic acid 4-hydroxylase. *J Biol Chem* 271, 29922–29927.

White, J.A., Ramshaw, H., Taimi, M., Stangle, W., Zhang, A., Everingham, S., Creighton, S., Tam, S.P., Jones, G. y Petkovich, M. (2000). Identification of the human cytochrome P450, P450RAI-2, which is predominantly expressed in the adult cerebellum and is responsible for all-trans-retinoic acid metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 6403-6408.

Wicht, H., Derouiche, A. y Korf, H.W. (1994). An immunocytochemical investigation of glial morphology in the pacific hagfish: radial and astrocyte-like glia have the same phylogenetic age. *J Neurocytol* 23, 565-576.

Williamson, K.A., Hever, A.M., Rainger, J., Rogers, R.C., Magee, A., Fiedler, Z., Keng, W.T., Sharkey, F.H., McGill, N., Hill, C.J., Schneider, A., Messina, M., Turnpenney, P.D., Fantes, J.A., van Heyningen, V. y FitzPatrick, D.R. (2006). Mutations in SOX2 cause anophthalmia-esophageal-genital (AEG) syndrome. *Hum Mol Genet* 15, 1413-1422.

Wilson, J. G., Roth, C. B. y Warkany, J. (1953). An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *Am J Anat* 92, 189-217.

Wong, K., Park, H.T., Wu, J.Y., y Rao, Y. (2002). Slit proteins: molecular guidance cues for cells ranging from neurons to leukocytes. *Curr Opin Genet Dev* 12 , 583–591.

Wood, H., Pall, G. y Morriss-Kay, G. (1994). Exposure to retinoic acid before or after the onset of somitogenesis reveals separate effects on rhombomeric segmentation and 3' HoxB gene expression domains. *Development* 120, 2279-2285.

Yang, P., Seiler, M.J., Aramant, R.B. y Whittemore, S.R. (2002). Diferential lineage restriction of rat retinal progenitor cells in vitro and in vivo. *J Neurosci Res* 69, 466-476.

Yazulla, S. y Studholme, K.M. (2001). Neurochemical anatomy of the zebrafish retina as determined by immunocytochemistry. *J Neurocytol* 30, 551-592.

Yeo, S.Y., Little, M.H., Yamada, T., Miyashita, T., Halloran, M.C., Kuwada, J.Y., Huh, T.L. y Okamoto, H. (2001). Overexpression of a slit homologue impairs convergent extension of the mesoderm and causes cyclopia in embryonic zebrafish. *Dev Biol* 230, 1-17.

Zhang, X.K. y Kahl, M. (1993). Regulation of retinoid and thyroid hormone action through homodimeric and heterodimeric receptors. *Trends Endocrinol Metab* 4, 156-162.

Zhao, D., McCaffery, P., Ivins, K.J., Neve, R.L., Hogan, P., Chin, W.W. y Dräger, U.C. (1996). Molecular identification of a major retinoic-acid synthesizing enzyme: a retinaldehyde-specific dehydrogenase. *Eur J Biochem* 240, 15–22.