



VNIVERSIDAD DE SALAMANCA



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

***ANÁLISIS
INMUNOCITOQUÍMICO DE LA
EXPRESIÓN DE PCNA Y PROX-1
DURANTE EL DESARROLLO DE LA
VÍA VISUAL DEL PEZ CEBRA
MUTANTE *cyc* m294***

JUNIO 2009

AUTORA: ANA GUTIÉRREZ RODRÍGUEZ

TUTOR: DR. ÁNGEL PORTEROS HERRERO

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| ÍNDICE | 2 |
| INTRODUCCIÓN | 3 |
| DESARROLLO DEL TUBO NEURAL | 4 |
| DESARROLLO DE LA VÍA VISUAL | 5 |
| ALTERACIONES EN LA SEÑALIZACIÓN NODAL: MUTACIONES CYCLOPS | 7 |
| HOLOPROSENCEFALIA Y CICLOPIA | 11 |
| OBJETIVOS E HIPÓTESIS | 12 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 14 |
| MATERIAL: | 15 |
| MÉTODOS: | 15 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 18 |
| DISTRIBUCIÓN DEL MARCAJE PARA PCNA | 20 |
| DISTRIBUCIÓN DEL MARCAJE PARA PROX-1 | 22 |
| ICONOGRAFÍA | 24 |
| CONCLUSIONES | 31 |
| BIBLIOGRAFÍA | 33 |

INTRODUCCIÓN

DESARROLLO DEL TUBO NEURAL

Debido a las semejanzas existentes en las etapas iniciales del desarrollo embrionario de todos los vertebrados, podemos abordar experimentalmente el análisis de malformaciones congénitas en los humanos mediante el estudio del desarrollo del pez teleosteo *Danio rerio*, conocido como pez cebra. Este pez, debido a sus muchas ventajas (como son la transparencia de sus embriones y su capacidad reproductiva y rápido desarrollo) es actualmente ampliamente utilizado como modelo de estudio del desarrollo de los vertebrados.

Es necesario, para poder situar el presente trabajo, repasar algunos de los procesos que acontecen durante el desarrollo del embrión en los vertebrados. Tras la fecundación el cigoto mediante mitosis se segmenta y cavita hasta el estadio de blástula para pasar después a formar la gástrula. En la gástrula encontramos tres capas: endodermo, mesodermo y ectodermo. A partir del ectodermo se formara el sistema nervioso. Las células del ectodermo producen el factor BMP-4 que diferencia las células del ectodermo a epidermis. Por su parte, la notocorda al interactuar con el ectodermo produce factores de inducción neural que inhiben a BMP-4, lo que permite que una porción del ectodermo dorsal se convierta en la placa neural, que mediante un proceso conocido como neurulación dará lugar al tubo neural. La neurulación no ocurre de forma simultánea, sino que sigue un gradiente rostrocaudal. Este gradiente se origina debido a la expresión de una serie de genes homeóticos, regulados todos por el ácido retinoico (Wilkinson, 1989). Cabe destacar que la notocorda secreta el factor sonic hedgehog (shh), que promueve el desarrollo de la parte ventral del tubo neural. La determinación de la parte dorsal es promovida por proteínas de la superfamilia TGF- β . De esta manera, se induce la regionalización dorsoventral del tubo neural, surgiendo así de la porción más dorsal a la más ventral, la placa del techo, la placa lateral alar y la placa lateral basal (Kuhlenbeck, 1973).

Una vez formado el tubo neural y establecida su polaridad, la porción más anterior experimenta una serie de cambios. El tubo se dilata en su parte anterior, para dar lugar a tres vesículas primarias: prosencéfalo, mesencéfalo y

rombencéfalo. Posteriormente, el prosencéfalo se subdividirá longitudinalmente en telencefalo en la posición más anterior y en diencefalo en la más posterior. El rombencéfalo por su parte dará lugar al metencéfalo y al mielencéfalo. El mesencéfalo por su parte, no sufre divisiones (Appel y cols., 2000).

DESARROLLO DE LA VÍA VISUAL

En el momento de cerrarse el tubo neural, aparecen unas protuberancias situadas a ambos lados de la parte anterior del prosencéfalo, que son los lóbulos ópticos. Las porciones más posteriores de los lóbulos ópticos se separan del encéfalo, mientras que las más anteriores se mantienen unidas. Al mismo tiempo aparece una invaginación en la superficie externa de cada lóbulo óptico que irá creciendo hasta que los lóbulos se conviertan en las copas ópticas. Posteriormente, la conexión existente entre la copa óptica y el encéfalo se reduce hasta ser una pequeña fisura ventral denominada fisura óptica, por la que pasarán los axones y los vasos sanguíneos de la retina (Schmitt y Dowling, 1994).

Por otra parte, el ectodermo da lugar a las placodas del cristalino, que se invaginarán después para formar una vesícula que se cerrará y separará de la superficie del ectodermo (Alder y Canto-Soler, 2007).

La invaginación dorsal de las vesículas ópticas genera una capa interna que forma la retina neural y una capa externa que da lugar al epitelio pigmentario (Alder y Canto-Soler, 2007). En la retina se producen una serie de mitosis, y las células recién formadas migran hasta su localización específica donde se producirá su diferenciación definitiva. La diferenciación tiene lugar de forma gradual, primero se diferencian las células ganglionares, después las interneuronas y por último los fotorreceptores (Cepko y cols., 1996).

La retina ya formada presenta una estructura laminar estratificada en la que alternan capas de somas celulares con otras de neuropilo (Ramón y Cajal, 1882; 1889; Duke-Elder, 1958; Wagner, 1990). Su organización es muy similar

entre todos los vertebrados. Desde la esclera hacia la región vitreal, las capas en que se divide la retina son las siguientes:

- Epitelio pigmentario: es la capa más externa y es el componente no neural de la retina.
- Capa de los fotorreceptores: formada por los segmentos externos e internos de los fotorreceptores, conos y bastones.
- Capa nuclear externa: está constituida por los cuerpos celulares de los fotorreceptores. En su límite vitreal se encuentra la membrana limitante externa, constituida por los extremos de las prolongaciones de las células de Müller que se unen entre sí o con los fotorreceptores.
- Capa plexiforme externa: es una capa de neuropilo en la que hacen sinapsis los fotorreceptores, las células bipolares, las células horizontales y las células interplexiformes.
- Capa nuclear interna: contiene los cuerpos celulares de las células horizontales, bipolares, amacrinas, interplexiformes y de Müller.
- Capa de las células ganglionares: en ella se encuentran las células ganglionares y células amacrinas desplazadas, que son las neuronas más próximas al cuerpo vítreo.
- Capa de las fibras del nervio óptico: constituida por los axones de las células ganglionares que se disponen en fascículos paralelos a la superficie de la retina y convergen hacia la papila óptica, donde se pierde la laminación, ya que las fibras atraviesan toda la extensión de la retina para formar el nervio óptico.

La vía visual de los teleósteos es un sistema con conexiones bidireccionales en el que las proyecciones retinópetas son poco importantes respecto a las retinófugas (Meyer y cols., 1993). Las dos vías principales de entrada de las fibras retinianas en el diéncéfalo son los tractos ópticos dorsomedial y ventrolateral (Meader, 1934). Estos tractos llegan a núcleos de la

zona de transición diencéfalo-mesencéfalo (Butler y Saidel, 1991), del tálamo (Springer y Gaffney, 1981) y del hipotálamo (Vanegas e Ito, 1983). A continuación presentan un crecimiento dorsalizado y contralateral al lóbulo tectal. Cada axón retiniano termina en una posición que refleja la localización de estos cuerpos celulares en el ojo, formando una proyección retinotópica en el techo óptico (Cuverwell y Karlstrom, 2002). Las células ganglionares de la parte dorsal del ojo envían sus axones a la parte ventral del techo óptico mientras que las células ganglionares ventrales proyectan dorsalmente. Además las células ganglionares de la zona nasal (anterior) proyectan al techo óptico posterior y las células ganglionares de la retina temporal proyectan en la región del techo óptico anterior (Cuverwell y Karlstrom, 2002). Las relaciones topográficas entre retina y techo óptico en el pez cebra aparecen en edades tempranas durante el desarrollo y se mantienen tras la regeneración en animales juveniles y adultos (Easter y Stuermer, 1984; Burrill y Easter, 1994). Esto es debido a que tanto la retina como el techo óptico de estas especies continúan creciendo durante toda la vida del animal y las proyecciones retinotectales experimentan un reordenamiento constante (Easter y Stuermer, 1984).

ALTERACIONES EN LA SEÑALIZACIÓN NODAL: MUTACIONES CYCLOPS

La consecución del patrón de diferenciación del sistema nervioso está regulada por interacciones moleculares complejas. De entre los factores proteicos que intervienen en la regulación de los procesos de desarrollo, las proteínas Nodal juegan un papel importante. Estas proteínas se encuentran presentes en todos los vertebrados y actúan en la transmisión de información sobre el patrón de desarrollo prospectivo del cigoto. Las proteínas Nodal constituyen una subclase dentro de la superfamilia de proteínas conocidas como TGF- β . Intervienen en la inducción del mesodermo, en el desarrollo de SNC rostral y en la determinación de la asimetría derecha-izquierda del embrión (Sampath y cols., 1998). Los factores Nodal llevan a cabo sus

funciones de señalización mediante receptores transmembrana serina-treonina-quinasa tipo-I y tipo-II (Tian y cols. 2008).

En el ratón solamente existe una proteína Nodal que interviene en la gastrulación, en la formación del mesodermo y en la diferenciación cefálica. En cambio, en el pez cebra la duplicación del genoma ha ocasionado la aparición de múltiples genes que se han repartido estas funciones: los diferentes factores Nodal (Fan y cols., 2007).

El gen nodal related-2 (*ndr-2*) codifica la proteína Cyclops (*Cyc*) y en el pez cebra se localiza en una región del cromosoma 12 denominada: LG12 (Talbot y cols., 1998), expresándose en:

- Hipoblasto del escudo embrionario.
- Mesendodermo axial (especialmente en la placa precordial).
- Neuroectodermo ventral.
- Brote inicial de la cola.

El factor perteneciente a la familia de genes Nodal conocido como *nodal related-1* (*ndr-1*) regula muchas de las funciones que desempeña el gen *ndr-2*, razón por la que lo citamos en este trabajo. Este gen *ndr-1* interacciona con *ndr-2* durante la gastrulación en la inducción de la capa germinal y en el patrón de diferenciación del sistema nervioso central. También interviene en el establecimiento de la asimetría derecha-izquierda del corazón y de otros órganos en los vertebrados. Los mutantes *ndr-2* y *ndr-1* pierden los tejidos derivados del mesendodermo, además de no presentar el escudo embrionario, esencial para el desarrollo adecuado del mesodermo dorsal del que deriva luego el tubo neural (Dougan y cols., 2003).

Se ha observado que la proteína *Cyc* se expresa durante la primera parte de la gastrulación en las células que se encuentran rodeando el blastodermo marginal. Durante la mitad de la gastrulación aparece en la línea media del mesodermo. Al final de la gastrulación encontramos a *Cyc* en el mesendodermo precordial y en el mesodermo posterior que dará lugar a la cola,

desapareciendo su expresión en el estadio de 2-3 somitos del embrión (Sampath y cols. 1998).

También se ha visto como la proteína Cyc (Fig. 1) tiene capacidad para autorregularse, puesto que se requiere para mantener la expresión del gen *ndr-2* en el mesodermo axial anterior y el neuroectodermo ventral durante la gastrulación tardía (Reblagliati y cols., 1998).

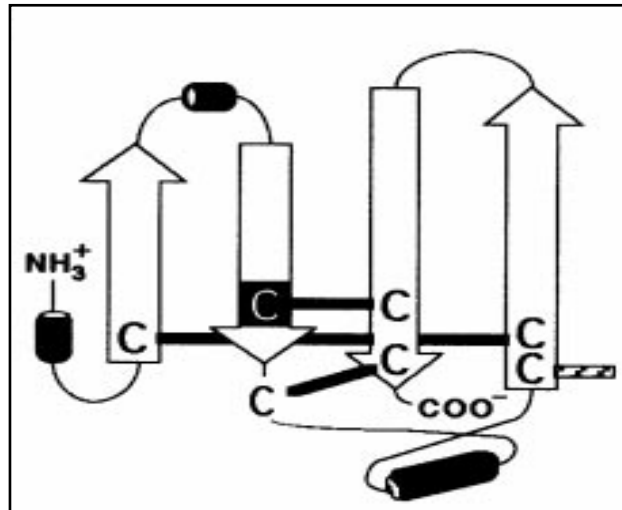


Figura 1: ESTRUCTURA SECUNDARIA DE LA PROTEÍNA CYCLOPS
Figura extraída de Sampath y cols., 1998.

La proteína Cyc interviene en la señalización intercelular. Presenta un pro-dominio (Fig. 2), del que recientemente se ha descubierto que el pro-dominio de la proteína Cyc en el pez cebra presenta importantes funciones reguladoras de la estabilidad de la proteína. Mutantes que carecían de este dominio presentaban la proteína Cyc no funcional, lo que evidencia que este pro-dominio es imprescindible para que Cyc sea activo. Además se ha identificado una zona en este dominio que funciona como un precursor para la degradación lisosomal de Cyc (Tian y cols., 2008).

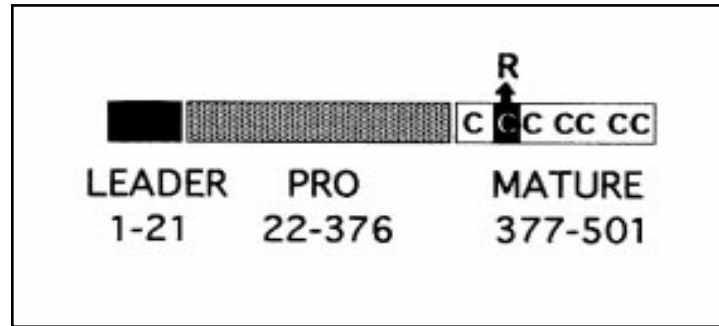


Figura 2: REGIÓN LÍDER, PRO-DOMINIO Y COMIENZO DE LA SECUENCIA DE BASES DEL GEN *cyc* MUTADO.
 Figura extraída de Tian y cols., 2008.

Los embriones de pez cebra con mutaciones en el gen *ndr-2* (que es el que codifica para *Cyc*) muestran defectos severos en el desarrollo (Rebagliati y cols. 1998), entre ellos:

- La parte media de la placa del suelo y en la parte ventral encefálica que promueven el desarrollo de ciclopedia, debido a una división incompleta del campo visual prospectivo.
- Mesodermo precordial.
- Notocorda.
- La conducción de los axones.
- La morfología corporal general, presentando la cola desviada en dirección ventral.
- Asimetría derecha-izquierda del cuerpo.

Además, los peces cebra mutantes para *Cyc* forman notocorda, pero presentan problemas para la correcta diferenciación del tubo neural ventral. De ello se deduce que *Cyc* tiene un importante papel en la regulación de la expresión de *shh* en el tubo neural, por lo que los mutantes se ven afectados en el desarrollo nervioso. Se ha determinado que en el promotor de *shh* existe

una región que es activada por las proteínas Smad-2 y Fast-1, activadas a su vez por Cyc (Müller y cols., 2000).

HOLOPROSENCEFALIA Y CICLOPIA

En humanos la alteración congénita del encéfalo anterior más común es la holoprosencefalia (HPE) (Doubourg y cols., 2007). Se trata de la patología en la que los enfermos presentan un fenotipo similar al de los peces cebra mutantes para *ndr-2* (o cíclopes).

Se trata de una malformación del encéfalo resultado de la incorrecta separación del prosencéfalo en los hemisferios derecho e izquierdo que ocurre del 18 al 28 día de la gestación en humanos (Doubourg y cols., 2007). Hay un amplio rango en el grado de error en la separación que origina la HPE.

Los pacientes presentan problemas neuronales como retraso en el desarrollo, en mayor o menor grado de acuerdo con la severidad de la malformación. Aproximadamente la mitad de los pacientes desarrollan epilepsia. También aparece hidrocefalia, retraso mental, hipotonía, debilidad, espasticidad, distonia y movimientos anormales.

Las causas de la HPE son variadas, puede ser causada por factores ambientales o metabólicos. Los factores ambientales identificados como causa de la HPE son la diabetes mellitus y si la madre ingiere alcohol durante el embarazo, los riesgos aumentan con el consumo de tabaco. También la exposición prenatal a sustancias como el ácido retinoico, inhibidores de la síntesis del colesterol. Infecciones como la rubéola, toxoplasmosis o citomegalovirus pueden causar en el feto el desarrollo de la HPE. Debido a anomalías cromosomales puede aparecer la HPE. Puede originarse como consecuencia de alteraciones en varios genes, uno de ellos es el gen nodal de humanos, que se corresponde con el gen *ndr-2* del pez cebra (Doubourg y cols 2007).

Debido a la correspondencia existente entre el gen *nodal* de humanos con el gen *ndr-2* del pez cebra. El análisis de las consecuencias

neuroanatómicas y neuroquímicas de la mutación en el gen *ndr-2* en el pez cebra nos permitirá profundizar en el conocimiento de las causas subyacente al desarrollo de la holoprosencefalia, cuya manifestación más drástica es el desarrollo visual anómalo y la aparición de ciclopia como consecuencia de la ausencia de migración de los primordios de las vesícula ópticas (Cohen y Sulik, 1992; Johnston y Bronsky, 1995).

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

La proteína denominada PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) es miembro de la familia de proteínas conocida como “sliding clamp family”. Esta proteína nuclear es sintetizada en la fase G1 temprana y en la fase S del ciclo celular. La PCNA favorece la síntesis de ADN, ya que es un cofactor de la ADN polimerasa δ , se encarga de aumentar la efectividad de la enzima ADN-polimerasa durante la replicación del ADN, debido a que incrementa la interacción del ADN con esta proteína. De esta forma, la PCNA evita que la polimerasa se separe del ADN en su avance a lo largo de la hebra de ADN. Sin embargo, también se ha observado que la PCNA está implicada en muchos otros procesos en el metabolismo celular como en el procesamiento de los fragmentos de Okazaki, la reparación del ADN, la metilación del ADN, la regulación del ciclo celular, y la remodelación de la cromatina (Maga y cols. 2003).

El gen homeótico *prox-1* de los vertebrados (homólogo al gen *prospero* de *Drosophila*) codifica para la proteína Prox-1, una proteína nuclear que parece actuar como factor de transcripción y que se encuentra implicada, entre otras funciones, en el desarrollo del sistema nervioso central y en especial en el desarrollo del ojo. En el pez cebra Prox-1 presenta elevada homología con otros vertebrados (con un 84%, 83% y 82% de homología con el ratón, el ser humano y el pollo respectivamente). En los vertebrados encontramos Prox-1 en las neuronas recién formadas del sistema nervioso central, en la lente del ojo en desarrollo, en el páncreas, en el hígado, en el corazón y en el músculo esquelético en desarrollo. En el pez cebra encontramos por primera vez Prox-1

en el estado de 10 somitos en el ectodermo sobre el ojo en formación y continuando caudalmente hasta la vesícula óptica. En el embrión de 28 horas post-fecundación se expresa en la lente del ojo, en la parte ventral del cerebro posterior y en la frontera entre el cerebro medio y anterior. Más caudalmente se expresa en el ganglio del trigémino, en la vesícula óptica y en los precursores de las células musculares (Glasgow y cols., 1998).

En el presente trabajo hemos estudiado la presencia de estos factores PCNA y Prox-1 durante el desarrollo de peces cebras cíclopes, mutantes *cyc m294*, para analizar cómo se ve afectada la proliferación celular y la morfogénesis visual general.

Mediante la comparación de los animales control con los mutantes podemos conocer las alteraciones que se producen en el patrón de división y de diferenciación como cuestiones clave del desarrollo del sistema visual en el pez cebra que pueden verse afectadas por la mutación.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL:

Se ha usado como animal de experimentación el pez cebra, *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822). Los animales controles de la estirpe AB, así como mutantes *cyc m294*, se mantienen a 28.5 ° con ciclos de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Machos y hembras se mantienen separados hasta la tarde antes del día de la puesta, momento en que dos hembras y un macho se colocan en las peceras de cría.

Al día siguiente se produce, tras el primer estímulo luminoso, la liberación de los óvulos y de los espermatozoides. Los embriones (tanto controles como mutantes) obtenidos se colocan en placas de 96 pocillos con medio E3 (5 mM de NaCl, 0,17 mM de KCl, 0,33 mM de CaCl₂ y 0,33 mM de MgSO₄) al que se le añaden un par de gotas de azul de metileno para evitar el desarrollo de hongos. Estas placas se mantienen en una estufa a 28,5°C.

MÉTODOS:

FIJACIÓN:

Todos los animales se anestesiaron con etil 3-aminobenzoato metanosulfonato (# A-5040, Sigma Co., St. Louis, MO, EE. UU.) al 0.03% en agua. Los ejemplares utilizados fueron fijados con paraformaldehído al 4% durante 30 minutos a Temperatura Ambiente (TA). A continuación se realizaron una serie de lavados en Tampón Fosfato (TF) y posteriormente fueron mantenidos en mezcla congeladora a -20°C hasta su procesamiento.

CORTE:

Tras ser fijados, los embriones se encastraron en un medio compuesto por agar al 1,5% y sacarosa al 5% en tampón fosfato. Después se mantuvieron en una solución de sacarosa al 30 % en tampón fosfato durante 48 horas a 4°C para crioproteger al tejido. Posteriormente se cortaron en un criostato a una temperatura de -27 °C.

TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA: MÉTODO DE FLUORESCENCIA

1. Las secciones cortadas son recogidas en un porta objetos .
2. Después se lavan las secciones en tampón fosfato durante 15 minutos, de esta manera se eliminan los posibles restos de sacarosa y fijador.
3. Posteriormente se realiza la preincubación, para evitar las uniones inespecíficas del anticuerpo primario. Las secciones se incuban en un medio compuesto por suero de cabra o caballo al 5 %, Triton X-100 al 0,2% diluido todo en tampón fosfato, durante una hora en una cámara húmeda a temperatura ambiente.
4. El siguiente paso es llevar a cabo la incubación con el anticuerpo primario, en una solución que contiene suero de cabra o caballo al 5%, Triton X-100 al 0,2%, tampón fosfato. Esto se mantiene incubando durante dos noches a 4°C los siguientes anticuerpos:

| ANTICUERPO | TIPO | CONCENTRACIÓN | PROCEDENCIA |
|-------------------|-------------|----------------------|-----------------------------------|
| PCNA | MONOCLONAL | 1:500 | Santa Cruz Biotechnology, Inc. |
| PROX-1 | POLICLONAL | 1:1000 | Covance |

5. A continuación se efectúan tres lavados en tampón fosfato de 15 minutos cada uno.
6. Incubación con el anticuerpo secundario durante una hora en cámara húmeda y a temperatura ambiente. La solución usada está compuesta por inmunoglobulina-G anti-ratón con una partícula fluorescente Cy2 de cabra para el anticuerpo monoclonal (de color verde) y anti-conejo con una partícula fluorescente Cy3 (de color rojo) de cabra para el anticuerpo policlonal. En ambos casos la concentración es

de 1:250 en tampón fosfato. Además la solución tiene suero de cabra al 5% y Triton X-100 al 0,2%.

7. Lavado de las secciones tres veces durante 15 minutos.

8. Incubación con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol) que marca los núcleos de azul. La incubación se realiza durante 7 minutos a temperatura ambiente.

9. Lavado de las secciones 3 veces durante 15 minutos.

10. Montaje de las secciones con *Prolong Gold antifade reagent* y cubreobjetos.

CONTROLES DE LA REACCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA:

- Eliminación del anticuerpo primario en la primera incubación.
- Eliminación del anticuerpo secundario en la segunda incubación.

ANÁLISIS Y FOTOGRAFIADO:

Se llevó a cabo en un microscopio Leica DMLs y una lupa binocular Leica Z45E. Las imágenes se fotografiaron con una cámara fotográfica digital DP Olympus acoplada a un fotomicroscopio Olympus Provis AX70 con objetivos PlanApo 1.25x y Uplan F1 4x, 20x, 40x y 100x.

El software usado fue Capture versión 2.0.7, para controlar la cámara que posee un filtro tricrómico secuencial.

Finalmente, se usó el programa Adobe Photoshop versión 7.0 para ajustar el contraste y brillo de las fotografías a lo observado directamente en el microscopio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este Trabajo de Fin de Master hemos analizado animales con edades de 2 dpf (Fig.3) y 3dpf (Fig.4), tanto en controles de la estirpe AB como mutantes *cyc* m294. Inicialmente hemos establecido las principales diferencias ontogénicas entre ambos grupos.

En el ojo del embrión de 2 dpf podemos distinguir el cristalino y las capas neurales de la retina. Aparecen los axones de los nervios ópticos que salen desde la parte posterior del ojo hasta entrar al encéfalo. En esta retina aparecen ya las células ganglionares diferenciadas y el epitelio pigmentario también (Fulwiler y cols., 1997).

Durante el desarrollo normal del sistema nervioso visual del pez cebra, los ojos se desarrollan en los laterales del prosencéfalo. En los mutantes *cyc* m294 el prosencéfalo ventral presenta un desarrollo anormal y las dos vesículas ópticas se encuentran unidas parcialmente en la parte ventral de lo que queda del prosencéfalo. Cerca de la línea media de la cabeza del mutante las dos retinas se encuentran fusionadas; en esta región se pueden observar alteraciones en la disposición celular con respecto al control, así como alta tasa de proliferación.

Las células en la retina en el individuo control de la estirpe AB se disponen en capas curvadas concéntricas, y esta disposición se mantiene constante desde el centro a la periferia. Sin embargo, en el mutante *cyc* m294 la disposición de las capas es irregular y más compleja. En lugar de las capas curvadas concéntricas que aparecen en el embrión de tipo silvestre, en el mutante aparecen filas dorsoventrales de células, en disposición simétrica con respecto a la línea media. Estas capas de células intersectan axones ópticos cerca de la parte ventral de la retina. En la zona dorsal al punto de intersección de los axones ópticos con las capas de células recuperan el patrón de distribución del tipo silvestre. El epitelio pigmentario solamente se desarrolla en esta región curvada de la retina fusionada del mutante cíclope como ya se había descrito previamente (Fulwiler y cols., 1997).

En la zona dorsal de la retina del mutante *cyc* m294 aparecen filas de fotorreceptores, esta disposición va desapareciendo en las secciones más

periféricas. En la zona ventral aparecen rosetas de fotorreceptores próximos a la línea media.

Las rosetas dispuestas en la parte ventral del centro de la retina van gradualmente formando una capa horizontal de fotorreceptores, que conecta lateralmente con las capas de las dos retinas fusionadas, formándose así un puente celular entre las dos retinas.

En los embriones controles de la estirpe AB de 2 dpf se pueden distinguir ya varias estructuras encefálicas: en la parte rostral podemos ver el tercer ventrículo, y en posición dorsal al mismo comienza a diferenciarse el diencéfalo. Por encima de éste encontramos el mesencéfalo, donde podemos distinguir perfectamente el techo óptico y hacia zonas más internas el tegmentum. En la parte inferior del embrión aparece la comisura anterior y más caudalmente a ésta la comisura post-óptica.

En el embrión de 3 dpf podemos apreciar un mayor desarrollo encefálico. Se distinguen estructuras que no estaban presentes en el embrión de 2 dpf como el quiasma óptico y el área preóptica.

DISTRIBUCIÓN DEL MARCAJE PARA PCNA

ANIMALES CONTROLES:

En la sección sagital del encéfalo del embrión del pez cebra de 2 dpf se pueden observar diferentes áreas neuronales que comienzan a definirse mediante estudio con marcadores que indican la expresión de la proteína PCNA, que indica que existe división celular en las zonas donde aparece inmunorreactividad para este marcador (Maga y cols., 2003).

En secciones encefálicas anteriores (Fig.5, A-C) se observa cómo no existe una frontera clara aún entre el pallium y el subpallium, situado más ventrocaudalmente, ya que ambas áreas se encuentran dividiéndose. Tampoco existe división entre el subpallium y el área preóptica, apareciendo ambas situadas contiguas dorsalmente a la comisura anterior. Por el contrario, las

células del subpallium en división en la parte ventral quedan delimitadas por un conjunto de células postmitóticas, apareciendo después más caudalmente el área preóptica en proliferación. Todas las células de la zona más anterior dorsal y ventral del tálamo así como del pretectum están en proliferación, no pudiéndose distinguir bien los límites entre estas zonas. En la región dorsal de la sección se puede observar el techo óptico en proliferación como ya ha sido descrito previamente por Wullimann y cols. en 2002.

En el embrión de *Danio rerio* de 3 dpf (Fig.7, A-C) aparece una clara frontera de células postmitóticas entre las zonas de división del pallium y del subpallium. El área preóptica aparece ya claramente definida. En el hipotálamo se pueden diferenciar tres conjuntos de células en proliferación: la anterior, la intermedia y la caudal según la clasificación de Wullimann y cols. en 2002.

En la sección del ojo de 2 dpf (Fig.6, A-C) aparecen células en proliferación en la retina y en el cristalino. Cuando han transcurrido 3 días desde la fecundación se sigue produciendo división celular en la retina, aunque, en menor cantidad que en el embrión de 2 dpf. En el ojo del embrión de 3 dpf no aparece PCNA en el cristalino.

MUTANTE CYCLOPS m294

El embrión mutante *cyc* m294 encontramos diferencias en los dos estadios analizados con respecto al embrión control. El embrión de 2 dpf mutante *cyc* m294 (Fig.5, D-F) presenta una ausencia prácticamente total de proliferación celular en el tálamo. Existe proliferación celular en la parte más caudal del hipotálamo y en el techo óptico, aunque es escasa. Encontramos marcaje contra PCNA en la retina, pero no en el cristalino.

En embriones mutantes *cyc* m294 (Fig.7, D-F) se aprecia proliferación celular en el hipotálamo, en el techo óptico y muy pocas células en proliferación en la retina

Comparando las observaciones de las secciones sagitales de 2 dpf (Fig. 6, D-F) y 3 dpf (Fig.8, D-F) del control con el mutante constatamos como la tasa

de división celular del mutante *cyc m294* es menor que la que se produce en el animal control de la estirpe AB.

DISTRIBUCIÓN DEL MARCAJE PARA PROX-1

ANIMALES CONTROLES:

El otro marcador empleado en este trabajo ha sido el factor de transcripción Prox-1, como indicador del proceso de diferenciación celular en la célula en la que se expresa (Glasgow y cols., 1998).

En secciones del ojo del embrión control de la estirpe AB de 2 dpf no observamos marcaje para Prox-1 (Fig.6, C). En el encéfalo del control de 2 dpf (Fig.5, D) Prox-1 se expresa en muy pocas células, lo que indica que en este estadio temprano es escasa la diferenciación celular. Se observan células inmunorreactivas a Prox-1 en el hipotálamo más rostral y en el pretectum, y en ambos casos, el número de células que aparecen marcadas es muy bajo.

En el encéfalo de embriones controles de 3 dpf de la estirpe AB (Fig.7, C) encontramos mayor número de células que presentan expresión de Prox-1 respecto a embriones controles de 2 dpf, esto es debido a que se trata de un estadio de maduración mayor, y las células comienzan a determinar su destino. Además de en las zonas anteriormente descritas, aparece por primera vez marcaje para Prox-1 en el estadio de 3 dpf en el tálamo y en el techo óptico. En todos los casos el número de células inmunorreactivas es muy escaso y todas presentan gran similitud morfológica.

En la retina del embrión de 2 dpf (Fig.6, C) no aparecen células inmunorreactivas a Prox-1 en la retina, como Prox-1 es un factor de transcripción implicado en la diferenciación celular de las estructuras implicadas en los procesos visuales (Glasgow y cols., 1998), implicaría que en este estadio aún no se ha iniciado el proceso de diferenciación de los diferentes tipos celulares. En cambio, si aparecen en el cristalino de 2 dpf células inmunorreactivas para Prox-1.

En el animal de 3 dpf aparece inmunorreactividad contra Prox-1 en la retina (Fig.8, C), pudiendo observar la aparición de fluorescencia roja en algunos de los principales tipos de células de la retina que ya se encuentran diferenciados, apareciendo la capa nuclear interna (CNI) donde las células tienen una forma redondeada y la capa de células ganglionares (CCG) donde las células son más fusiformes, al igual que en el estadio de 2 dpf.

MUTANTE CYCLOPS m294

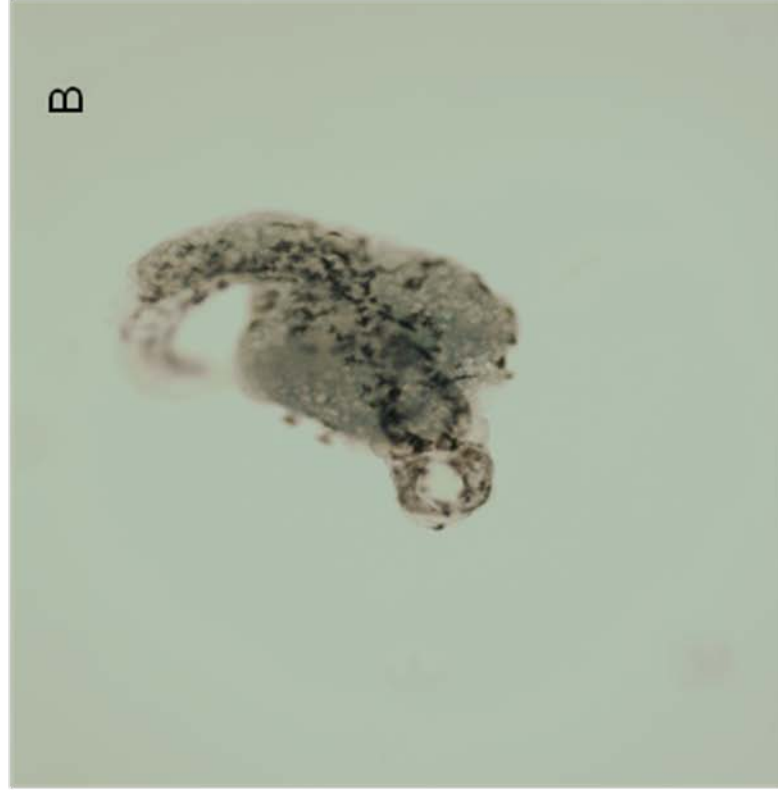
En secciones del encéfalo de animales mutantes de 2 dpf (Fig.5, F) no aparecen células que expresen Prox-1. En la retina del mutante de 2 dpf (Fig.6, F) tampoco aparece marcaje para el factor de transcripción Prox-1 (Glasgow y cols., 1998), por lo tanto, no hay procesos de diferenciación en la retina ni en el encéfalo en este estado del mutante. Podemos, por lo tanto, deducir que el proceso de diferenciación se encuentra retardado en el mutante.

En el encéfalo del animal mutante *cyc* m294 de 3 dpf (Fig.7, F) aparece marcaje para la proteína Prox-1, indicando la existencia de diferenciación en este estado, fundamentalmente en el pretectum, en el hipotálamo y en el techo óptico. En la retina de la misma edad (Fig.8, F) aparece marcaje para Prox-1 en las mismas capas que en los controles, en la CNI y CCG, si bien la forma de las células es más irregular que en el control. En el cristalino la diferenciación celular es mínima.

ICONOGRAFÍA



A



B

Figura 3. Embrión *in toto* AB, 2dpf (A) . Embrión mutante *cyc* m294, 2dpf(B).

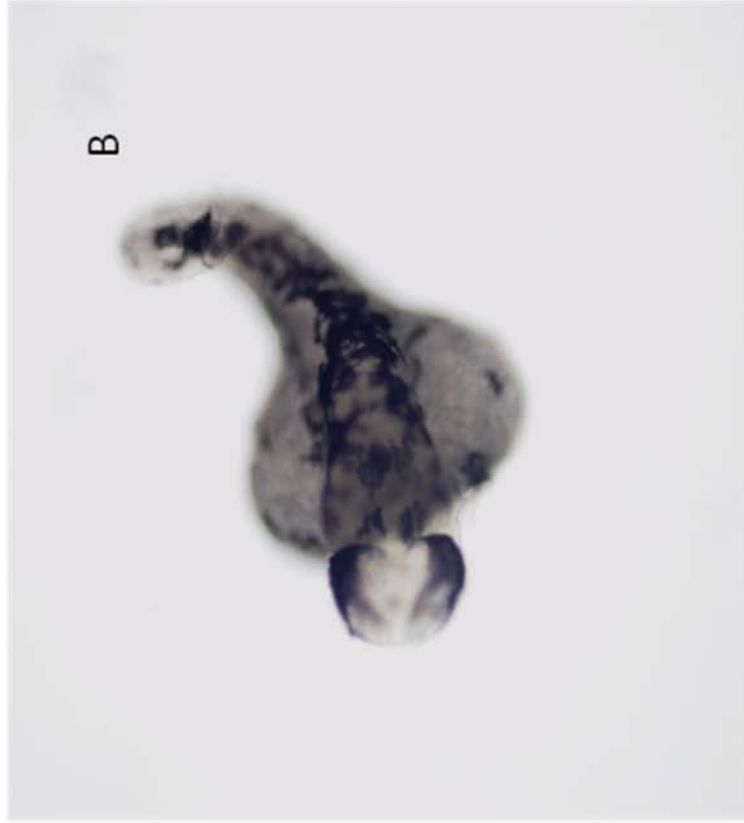


Figura 4: Embrión *in toto*, AB, 3 dpf (A). Embrión *in toto*, *cyc* m294, 3 dpf (B).

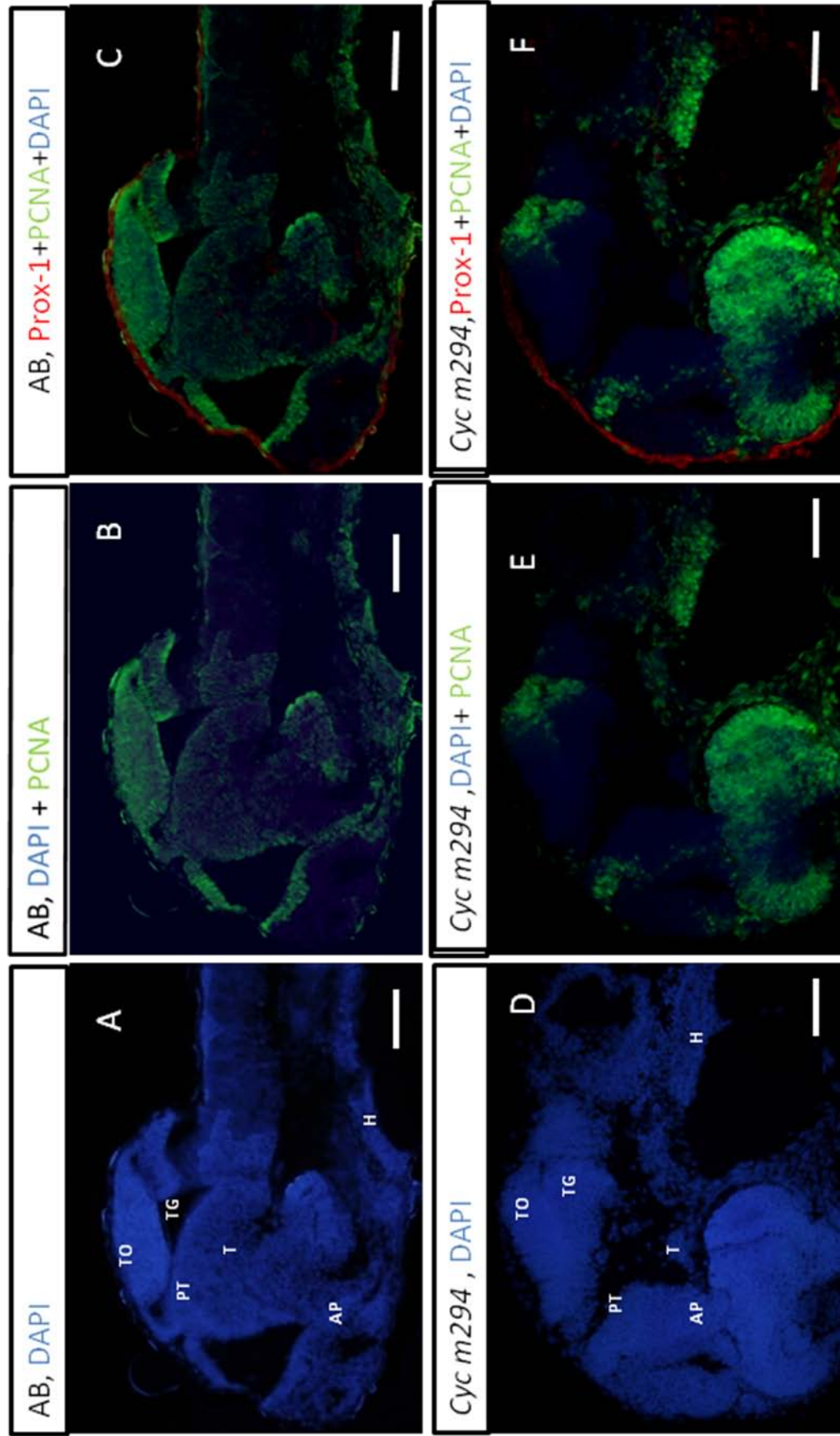


Figura 5 : Imágenes de cortes sagitales del encéfalo de pez cebra de 2 dpf controles de la estirpe AB (fotos A, B, C) y mutantes *cyc m294* (fotos D, E, F). TO: techo óptico. TG:tegmentum. TA :tálamo. PT:Pretectum. H:hipotálamo. AP: área pre-óptica. Barra de escala = 50 μ m

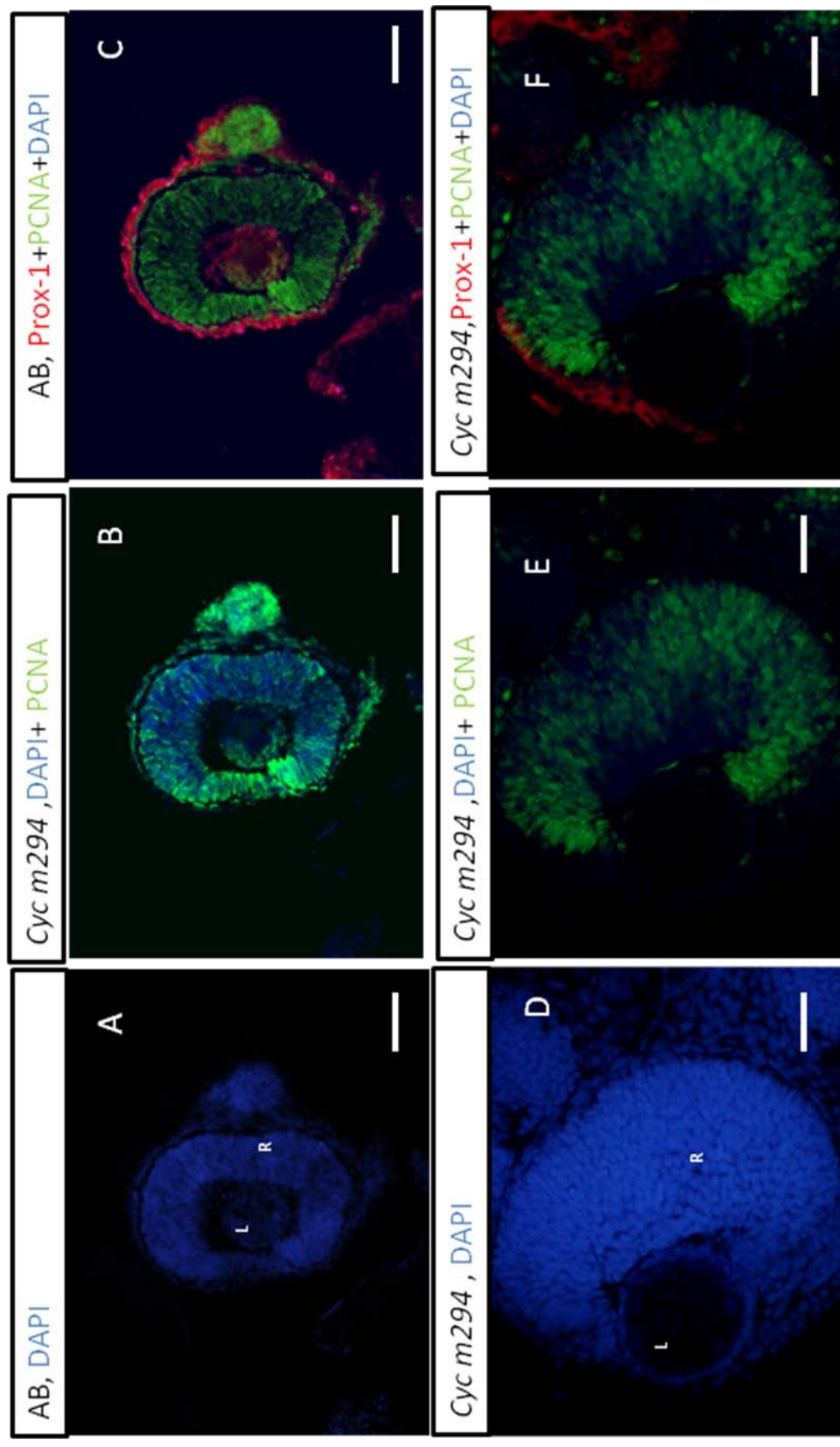


Figura 6 : Imágenes de cortes sagitales del globo óptico de pez cebra de 2 dpf controles de la estirpe AB (fotos A, B, C) y de mutantes *cycm294*(fotos D,E,F). L: Cristalino, R:Retina. Barra de escala = 50 μ m.

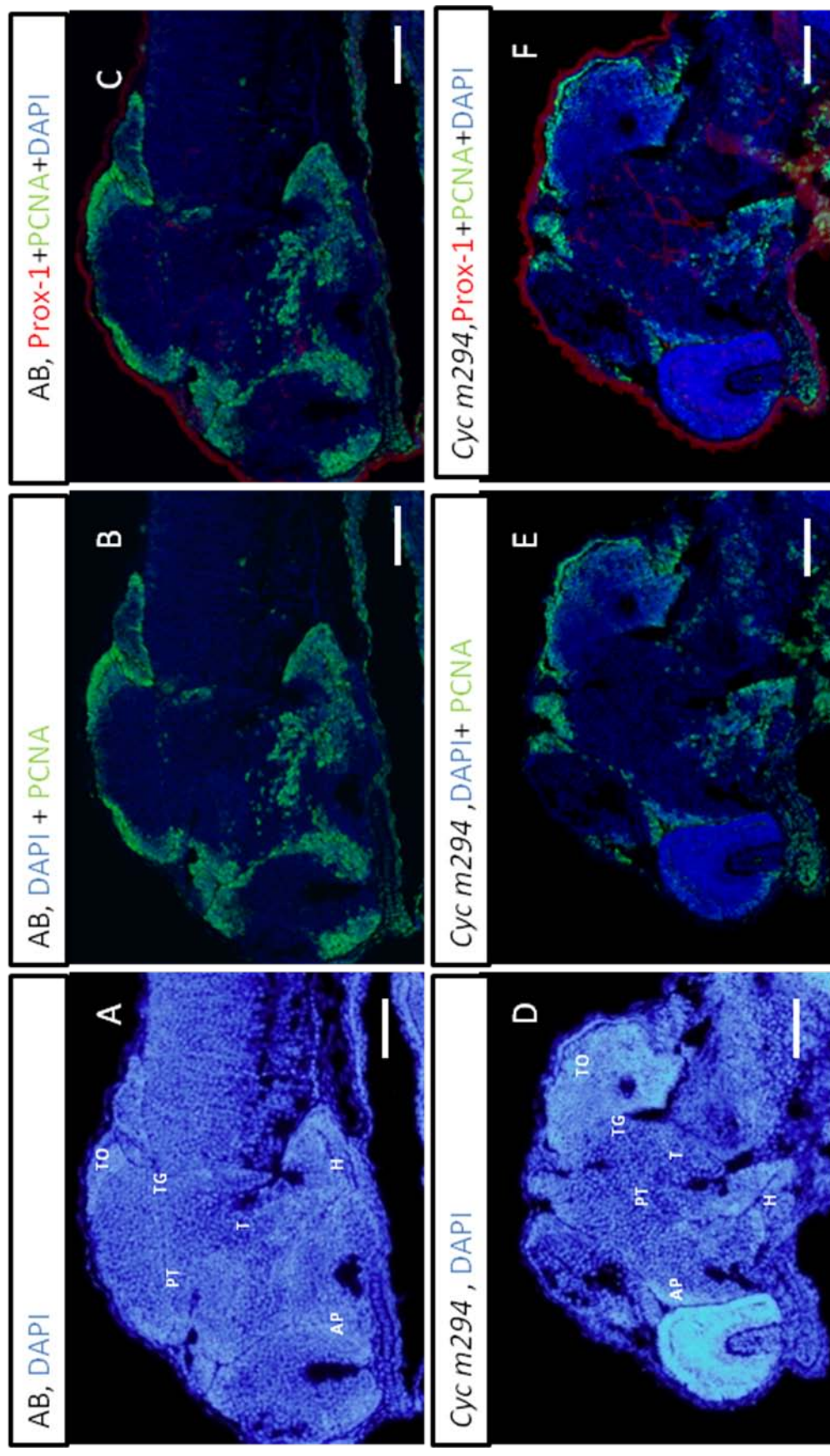


Figura 7 : Imágenes de cortes sagitales del encéfalo de pez cebra de 3 dpf controles de la estirpe AB (fotos A, B, C) y mutantes *cyc m294* (fotos D,E,F). TO: techo óptico. TG: tegmentum. T :tálamo. PT: Pretectum. H:hipotálamo. AP: área pre-óptica Barra de escala = 50µm.

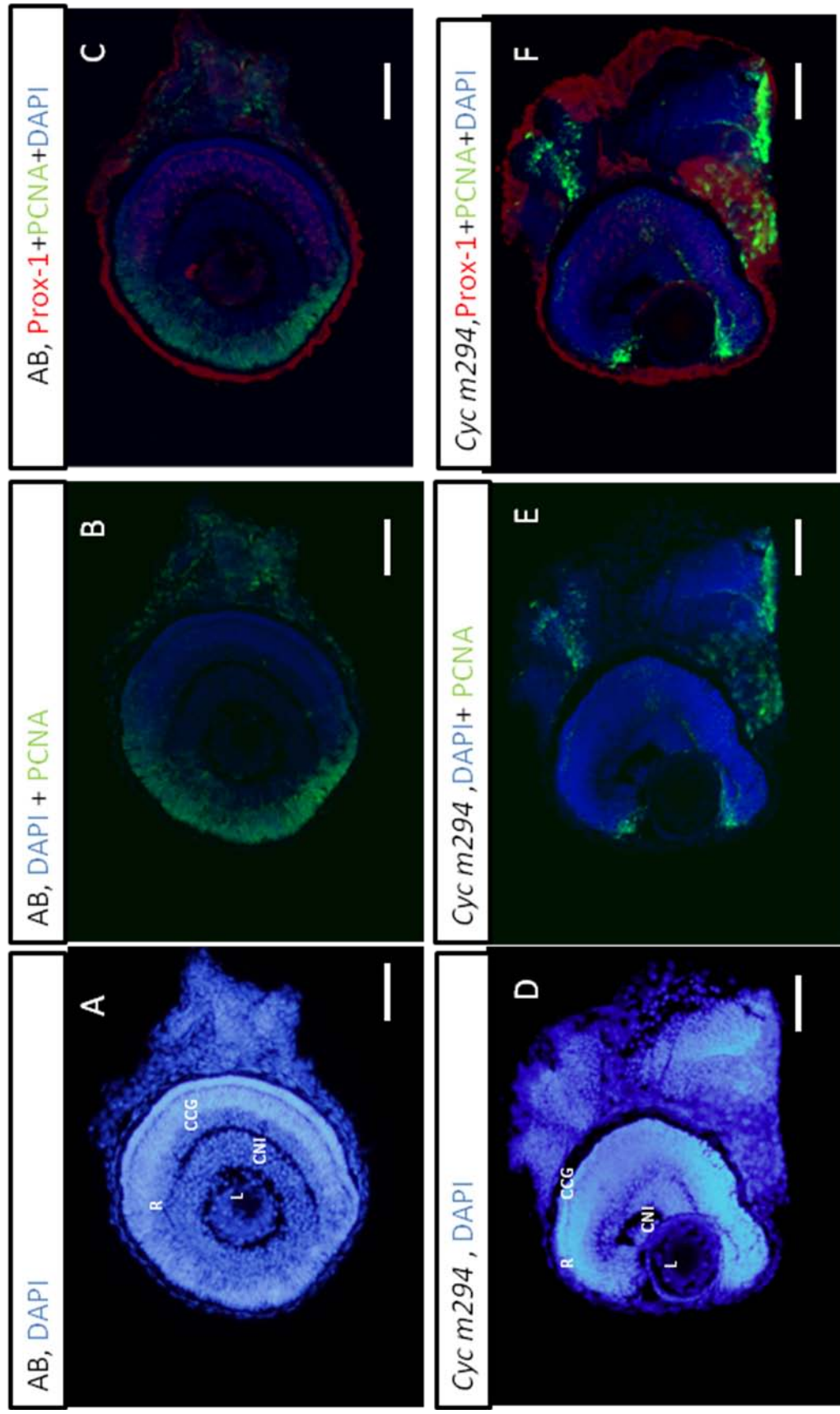


Figura 8 : Imágenes de cortes sagitales del globo óptico de pez cebra de 3 dpf controles de la estirpe AB (fotos A, B, C) y mutantes *cyc m294* (fotos D, E, F). R:Retina, L: Cristalino, CNI: Capa nuclear interna, CCG: Capa de células ganglionares. Barra de escala = 50 μ m .

CONCLUSIONES

Como conclusiones principales de nuestro trabajo podemos señalar las siguientes:

1. Existe un retraso en el desarrollo del embrión mutante *cyc m294* con respecto al control, podría deberse a que los procesos de división celular en el mutante se encuentran ralentizados.
2. A igual edad hay menor diferenciación morfológica y celular en el mutante *cyc m294*. Así, la diferenciación celular en estos animales está disminuida, lo que ocasiona que las estructuras encefálicas relacionadas con la visión no se desarrollen correctamente.
3. Debido a la correspondencia del gen *nodal* de humanos con el gen *ndr-2* del pez cebra, que se encuentra alterado en los ejemplares utilizados en este trabajo y teniendo en cuenta las dos conclusiones anteriores sobre las alteraciones en la proliferación y diferenciación que ocasionan las modificaciones en el gen *ndr-2* en el pez cebra. Podemos inferir que, en la holoprosencefalia se producirá una ralentización en la división celular y una disminución en la diferenciación de las células de las áreas visuales de los individuos que presenten alteraciones en el gen *nodal*.

BIBLIOGRAFÍA

Appel B. Zebrafish neural induction and patterning. *Dev Dyn.* 2000. Oct;219(2):155-68. Review.

Adler R, Canto-Soler MV. Molecular mechanisms of optic vesicle development: complexities, ambiguities and controversies. *Dev Biol.* 2007 May 1;305(1):1-13. Epub 2007 Feb 7. Review.

Butler AB, Saidel WM. Retinal projections in the freshwater butterfly fish, *Pantodon buchholzi* (Osteoglossoidei). I. Cytoarchitectonic analysis and primary visual pathways. *Brain Behav Evol.* 1991;38(2-3):127-53.

Cepko CL, Austin CP, Yang X, Alexiades M, Ezzeddine D. Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Jan 23;93(2):589-95.

Cohen MM Jr, Sulik KK. Perspectives on holoprosencephaly: Part II. Central nervous system, craniofacial anatomy, syndrome commentary, diagnostic approach, and experimental studies. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1992 Oct-Dec;12(4):196-244. Review.

Culverwell J, Karlstrom RO. Making the connection: retinal axon guidance in the zebrafish. *Semin Cell Dev Biol.* 2002 Dec;13(6):497-506. Review.

Dougan ST, Warga RM, Kane DA, Schier AF, Talbot WS. The role of the zebrafish nodal-related genes *squint* and *cyclops* in patterning of mesendoderm. *Development.* 2003 May;130(9):1837-51

Dubourg C, Bendavid C, Pasquier L, Henry C, Odent S, David V. Holoprosencephaly. *Orphanet J Rare D Duke-Elder S. System of ophthalmology. The eye in evolution (I).* 1958, Londres: Henry Kimpton publishers.is. 2007 Feb 2;2:8. Review.

Easter SS Jr, Stuermer CA. An evaluation of the hypothesis of shifting terminals in goldfish optic tectum. *J Neurosci.* 1984 Apr;4(4):1052-63.

Fadool JM, Dowling JE. Zebrafish: a model system for the study of eye genetics. *Prog Retin Eye Res.* 2008 Jan;27(1):89-110. Epub 2007 Sep 7. Review.

Fan X, Hagos EG, Xu B, Sias C, Kawakami K, Burdine RD, Dougan ST. Nodal signals mediate interactions between the extra-embryonic and embryonic tissues in zebrafish. *Dev Biol.* 2007 Oct 15;310(2):363-78. Epub 2007 Aug 10.

Feldman B, Gates MA, Egan ES, Dougan ST, Rennebeck G, Sirotkin HI, Schier AF, Talbot WS. Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals. *Nature.* 1998 Sep 10;395 (6698):181-5.

Fadool JM, Dowling JE. Zebrafish: a model system for the study of eye genetics. *Prog Retin Eye Res.* 2008 Jan;27(1):89-110. Epub 2007 Sep 7. Review.

Fulwiler C, Gilbert W. Zebrafish embryology and neural development. *Curr Opin Cell Biol.* 1991 Dec;3(6):988-91. Review.

Glasgow E, Tomarev SI. Restricted expression of the homeobox gene *prox 1* in developing zebrafish. *Mech Dev.* 1998 Aug;76(1-2):175-8.

Johnston MC, Bronsky PT. Prenatal craniofacial development: new insights on normal and abnormal mechanisms. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1995;6(1):25-79. Review.

Maga G, Hubscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci.* 2003 Aug 1;116(Pt 15):3051-60. Review.

Meyer DL, Lara J, Malz CR, Graf W. Diencephalic projections to the retinae in two species of flatfishes (*Scophthalmus maximus* and *Pleuronectes platessa*). *Brain Res.* 1993 Jan 22;601(1-2):308-12.

Meader R.G. The optic system of the teleost, *Holocentrus*. I. The primary optic pathways and the corpus geniculatus complex. *J. Comp Neurol* 60:361-407.

Müller F, Albert S, Blader P, Fischer N, Hallonet M, Strähle U. Direct action of the nodal-related signal cyclops in induction of sonic hedgehog in the ventral midline of the CNS. *Development*. 2000 Sep;127(18):3889-97.

Rebagliati MR, Toyama R, Haffter P, Dawid IB. cyclops encodes a nodal-related factor involved in midline signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Aug 18;95(17):9932-7.

Ramón y Cajal S. La rétine des vertébrés. *Cellule* 1892; 9:121-225.

Ramón y Cajal S. Sistema visual, órgano receptor de la excitación visual o retina. 1889. En : "Textura del sistema nervioso del hombre y los vertebrados" . Madrid: Moya N.

Sampath K, Rubinstein AL, Cheng AM, Liang JO, Fekany K, Solnica-Krezel L, Korzh V, Halpern ME, Wright CV. Induction of the zebrafish ventral brain and floorplate requires cyclops/nodal signalling. *Nature*. 1998 Sep 10;395(6698):185-9.

Schier AF. Axis formation and patterning in zebrafish. *Curr Opin Genet Dev*. 2001 Aug;11(4):393-404. Review.

Schier AF, Neuhauss SC, Harvey M, Malicki J, Solnica-Krezel L, Stainier DY, Zwartkruis F, Abdelilah S, Stemple DL, Rangini Z, Yang H, Driever W. Mutations affecting the development of the embryonic zebrafish brain. *Development*. 1996. Dec;123:165-78.

Schier AF, Neuhauss SC, Helde KA, Talbot WS, Driever W. The one-eyed pinhead gene functions in mesoderm and endoderm formation in zebrafish and interacts with no tail. *Development*. 1997 Jan;124(2):327-42.

Springer AD, Gaffney JS. Retinal projections in the goldfish: a study using cobaltous-lysine. *J Comp Neurol*. 1981 Dec 10;203(3):401-24.

Strähle U, Blader P, Henrique D, Ingham PW. Axial, a zebrafish gene expressed along the developing body axis, shows altered expression in cyclops mutant embryos. *Genes Dev.* 1993 Jul;7(7B):1436-46

Talbot WS, Egan ES, Gates MA, Walker C, Ullmann B, Neuhauss SC, Kimmel CB, Postlethwait JH. Genetic analysis of chromosomal rearrangements in the cyclops region of the zebrafish genome. *Genetics.* 1998 Jan;148(1):373-80.

Tian J, Andrée B, Jones CM, Sampath K. The pro-domain of the zebrafish Nodal-related protein Cyclops regulates its signaling activities. *Development.* 2008 Aug;135(15):2649-58

Vanegas H, Ito H. Morphological aspects of the teleostean visual system: a review. *Brain Res.* 1983 Oct;287(2):117-37.

Wagner HJ. Retinal structure of fishes. En: Douglas RH, Djamgoz MBA (eds.): "The Visual System of Fish". 1990. Londres Chapman y Hall.,pp.109-157.

Wilkinson DG, Bhatt S, Cook M, Boncinelli E, Krumlauf R. Segmental expression of Hox-2 homoeobox-containing genes in the developing mouse hindbrain. *Nature* 1989 Oct 5;341(6241):405-9.

Wullmann MF, Knipp S. Proliferation pattern changes in the zebrafish brain from embryonic through early postembryonic stages. *Anat Embryol (Berl).* 2000. Nov;202(5):385-400.

Wullmann MF, Rink E. The teleostean forebrain: a comparative and developmental view based on early proliferation, Pax6 activity and catecholaminergic organization. *Brain Res Bull.* 2002 Feb-Mar 1;57(3-4):363-70. Review.