



Máster de Neurociencias. Instituto de
Neurociencias de Castilla y León (INCyL).
Universidad de Salamanca.

Trabajo tutelado fin de Máster.

**Efectos del ácido retinoico en el desarrollo
temprano del pez cebra *Danio rerio*.**

Junio de 2009

Alumno: Héctor Carreño Gutiérrez.

Tutora: Prof. Dra. Rosario Arévalo Arévalo.

ÍNDICE.

Introducción.

El pez cebra como modelo para el estudio del desarrollo del Sistema Nervioso Central de vertebrados.....	3
Desarrollo temprano del Sistema Nervioso Central.....	3
El ácido retinoico como morfógeno y/o teratógeno durante el desarrollo.....	4
Factores implicados en el desarrollo de la retina.....	7
Calretinina.	
<i>Notch1a</i> .	

Justificación y objetivos.....	8
---------------------------------------	----------

Material y métodos.

Animales.....	11
Obtención de los embriones.....	11
Tratamiento de los embriones con ácido retinoico.....	12
Análisis de supervivencia de los embriones a los tratamientos.....	13
Técnica inmunohistoquímica <i>in toto</i>	13
Técnica de hibridación <i>in situ in toto</i>	16
Fotografiado de los resultados.....	18

Resultados.

Supervivencia de los embriones a los tratamientos.....	20
Alteraciones observadas en el desarrollo embrionario a las 48 horas postfecundación debidas a los tratamientos.....	20
Patrón de distribución espacial de Calretinina en los embriones de 48 horas postfecundación.....	21
Patrón de expresión espacial de <i>notch1a</i> en embriones de 48 horas postfecundación.....	22

Discusión.

Supervivencia de los embriones tratados.....	29
Alteraciones generales del desarrollo embrionario.....	29
Cambios en la distribución espacial de Calretinina.....	30
Cambios en la expresión de <i>notch1a</i>	31

Conclusiones.....	32
--------------------------	-----------

Bibliografía.....	34
--------------------------	-----------

Introducción

El pez cebra como modelo de desarrollo del Sistema Nervioso Central de vertebrados.

El pez cebra *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822) es un modelo ideal para estudios de neurobiología del desarrollo, así como de otros campos de la biomedicina. Posee unas características que ofrecen ventajas: su pequeño tamaño (no más de 5cm. en estado adulto) hace posible tener varios ejemplares en una sola pecera, con costes de mantenimiento bajos; las hembras ponen un número muy elevado de huevos; los embriones se desarrollan rápidamente y son semitransparentes hasta las 24 horas postfecundación (hpf); y además su genoma está casi totalmente secuenciado.

Desarrollo temprano del SNC.

Tras la fertilización del huevo se desencadenan una serie de divisiones, movimientos y reorganizaciones celulares que resultan en la formación de las tres hojas embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo. El Sistema Nervioso Central (SNC) se origina exclusivamente a partir del ectodermo, que es la hoja más externa de la gástrula. La notocorda (mesodermo axial) envía señales al ectodermo suprayacente que hacen que éste se diferencie a tejido nervioso (Spemann, 1938). Así, un grupo de células ectodérmicas no forman tejido epidérmico sino que se diferencian a tejido neural (Piccolo *et al.*, 1996). Este tejido neural sufrirá un proceso denominado neurulación, que dará origen al tubo neural. En él aparecerán los llamados centros organizadores, que son una serie de grupos restringidos de células que liberan señales que dirigen el desarrollo de los tejidos adyacentes (Raible y Brand, 2004). En los vertebrados hay varios centros organizadores: la cresta neural anterior (ANR; del inglés *Anterior Neural Ridge*) (Shimamura y Rubenstein, 1997), el surco cortical (Ikeya *et al.*, 1997), el MHB (del inglés *Midbrain-Hindbrain Boundary*) (Rhinn y Brand, 2001; Olander *et al.*, 2006), el rombómero r4 (Maves *et al.*, 2002), los límites entre los rombómeros (Riley *et al.*, 2004), y el mesodermo paraxial adyacente al cerebro posterior (Begemann *et al.*, 2004).

Las señales que liberan los centros organizadores se denominan morfógenos. Los llamados morfógenos clásicos son proteínas secretadas capaces de dirigir el comportamiento de las células adyacentes por medio del control transcripcional de

genes que intervienen en la diferenciación. A este grupo pertenecen los miembros de las familias Hh, Wng (Wnt), TGF- β y FGF (Bovolenta, 2005). Sin embargo, cada vez se descubren más morfógenos no proteicos, entre los que se encuentra el ácido retinoico (AR), que es un lípido del grupo de los retinoides. Desde el mesodermo paraxial adyacente al cerebro posterior se genera un gradiente caudorrostral de AR en el tubo neural, que regula la expresión diferencial de los genes homeóticos u homeogenes, responsables de la polarización rostrocaudal (Wilkinson, 1989). En el establecimiento de la polaridad dorso-ventral intervienen Shh y TGF- β (Kuhlenbeck, 1973). A las 48 hpf el tubo neural se ha dividido y regionalizado en las diferentes partes del SNC: telencéfalo, diencéfalo, mesencéfalo, rombencéfalo y médula espinal.

El ácido retinoico como morfógeno y/o teratógeno durante el desarrollo.

Los animales no sintetizan el AR *de novo*, sino a partir del retinol (vitamina A) que toman en la dieta. Los embriones de pez no se alimentan del medio externo sino del vitelo del huevo, que contiene retinol, retinal y AR (Costaridis *et al.*; 1996). La síntesis del AR a partir del retinol se lleva a cabo en dos pasos oxidativos: primero el retinol es oxidado a retinal por una alcohol deshidrogenasa (ADH), y después el retinal se oxida a AR por las aldehído deshidrogenasas (Aldh) (Ross *et al.*, 2000). Estas enzimas se encuentran en las células del mesodermo adyacente al tubo neural. Por otra parte, la degradación del AR es llevada a cabo por citocromos p450 específicos (Cyp26s), que lo oxidan a metabolitos inactivos (Ross *et al.*, 2000 y Niederreither *et al.*, 2002). Como la reacción catalizada por la ADH es reversible, la homeostasis del AR resulta de la regulación entre la tasa de su degradación y la de síntesis de retinal (Fig. 1).

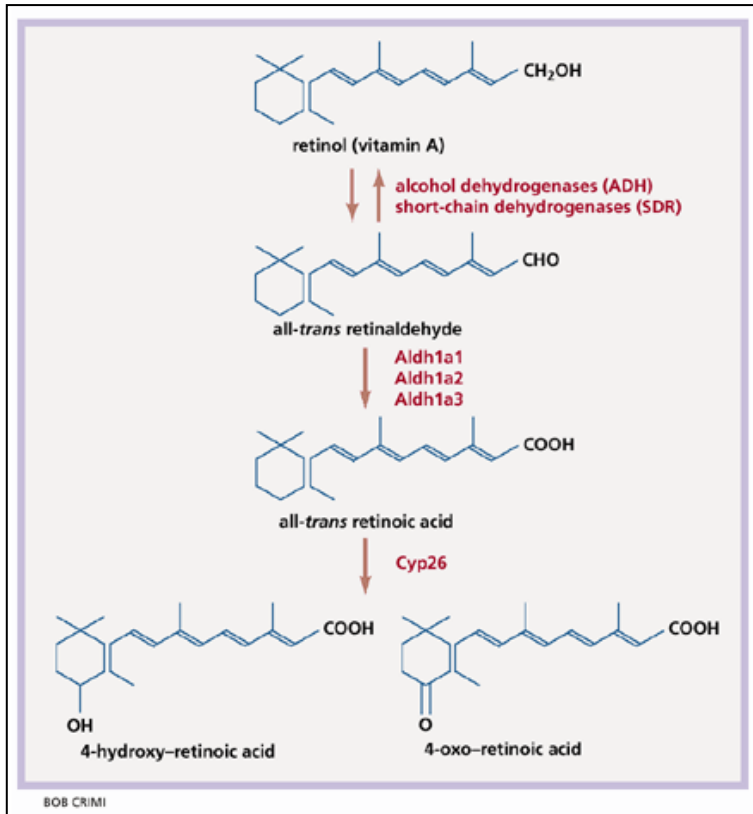


Figura 1. Esquema de la ruta de síntesis y degradación del AR. Imagen tomada de *Nature Genetics* 31, 7-8 (2002) (Perlmann, 2002)

Para llevar a cabo su función, el AR debe entrar en las células y llegar hasta el núcleo. Allí se une y activa receptores nucleares que funcionan como factores de transcripción que modifican la expresión de una amplia gama de genes (Chambon, 1996;

McCaffery and Drager, 2000; Balmer and Blomhoff, 2002). El receptor del AR y su correceptor se unen a los elementos de respuesta a AR (RAREs; del inglés *Retinoic Acid Response Elements*), situados en las regiones reguladoras de los genes diana (Niederreither *et al.*, 1999; Begemann *et al.*, 2001; Gavalas, 2002).

Diversos experimentos han sugerido que hay tres señales que posteriorizan el neuroectodermo: la del AR (Durston *et al.*, 1989; Sive *et al.*, 1990; Conlon, 1995; Blumberg *et al.*, 1997), la de los Fgfs (Kengaku and Okamoto, 1993; Cox and Hemmati-Brivanlou, 1995; Kengaku and Okamoto, 1995; Lamb and Harland, 1995; Koshida *et al.*, 1998), y la de los Wnts (Kelly *et al.*, 1995; McGrew *et al.*, 1995; Fekany-Lee *et al.*, 2000; Kazanskaya *et al.*, 2000; Kiecker and Niehrs, 2001; Yamaguchi, 2001). De entre ellas, el AR es el que controla la identidad de los rombómeros al regular la expresión de los genes homeóticos *hox* y la organización del eje anteroposterior del tubo neural. Además, el AR ha sido implicado en la regulación del establecimiento del prosencéfalo (Schneider *et al.*, 2001; Halilagic *et al.*, 2003; Ribes *et al.*, 2006) y en la especificación de regiones intermedias del telencéfalo y los ojos (Marklund *et al.*, 2004; Lupo *et al.*, 2005), y en zonas mediales del tubo neural puede especificar dominios neuronales de la médula espinal (Pierani *et al.*, 1999). Más aún, experimentos realizados en

pez cebra demuestran que el AR establece la polaridad dorso-ventral del ojo, y que es necesario y suficiente para el desarrollo de las estructuras oculares ventrales (Marsh-Armstrong et al., 1994). El AR también interviene en el desarrollo de las células fotorreceptoras de la retina (Prabhudesai et al., 2002), y fuera del SNC, en la formación de diversos órganos.

Los teratógenos son agentes físicos o químicos que provocan malformaciones durante el desarrollo del embrión. Diferentes experimentos ponen de manifiesto que el AR es un agente teratógeno. El tratamiento de embriones de rata (Morriss, 1972), *Xenopus* (Durston et al., 1989; Sive et al., 1990; Papalopulu et al., 1991; Lopez and Corrasco, 1992), pez cebra (Holder and Hill, 1991; Hill et al., 1995) y ratón (Wood et al., 1994; Leonard et al., 1995) con AR, en los estadios de gastrulación y neurulación, provoca el desarrollo anormal del cerebro y demás estructuras de la cabeza. El exceso de AR en los embriones de vertebrados posterioriza la placa neural anterior al cambiar la identidad de los rombómeros (r3 y r4 pasan a ser r4 y r5) y producir la expansión del cerebro posterior a expensas del futuro cerebro anterior (Marshall et al., 1992; Kudoh et al., 2002).

En pez cebra se ha visto que en los embriones tratados con AR 1µM durante la evaginación de las vesículas ópticas se produce la duplicación de la retina, de manera que se originan dos campos de células ganglionares que proyectan al techo óptico (TO) (Hyatt et al., 1992). También se ha visto que el exceso de vitamina A causa severas malformaciones oculares en ratas y humanos (Giroud and Martinet, 1961; Giroud et al., 1962).

La privación de AR o vitamina A, así como el bloqueo de la señal del AR, también provoca malformaciones en los embriones. El ojo en desarrollo es uno de los órganos más vulnerables a la falta de retinoides. Se ha observado que la privación parcial de vitamina A en cerdos y ratas gestantes causa la disminución del tamaño de los ojos (microftalmia) o ausencia de los mismos (anoftalmia) (Hale, 1937; Warkany and Schraffenberger, 1946). Los embriones con la señal de AR bloqueada muestran defectos en el sistema circulatorio, los miembros, el tronco, y el sistema hematopoyético (Maden, 2002). Se ha comprobado que la inhibición de la síntesis endógena de AR durante la separación de las vesículas ópticas del pez cebra resulta en la formación de sólo la mitad dorsal de cada ojo. Lo mismo se ha observado en embriones de codorniz privados de

vitamina A, lo que indica que el AR tiene algún papel en la especificación de la región ventral del ojo (Maden *et al.*, 2007).

Factores implicados en el desarrollo de la retina.

Calretinina.

La Calretinina (CR) es la proteína ligante de calcio de expresión más temprana en el SNC de vertebrados (Andressen *et al.*, 1993; Porteros *et al.*, 1997; Guglielmo y Corvetti, 2000). Ha sido localizada en el SNC, principalmente en retina y en neuronas de otras vías sensoriales (Pasteels *et al.*, 1990; Résivois y Rogers., 1992; Rogers y Résivois., 1992). La CR se expresa, entre otros tipos celulares, en las células ganglionares de la retina de teleosteos desde etapas tempranas del desarrollo (Doldan *et al.*, 1999; Arenzana, 2002), y permite observar el patrón espacio-temporal de colonización del techo óptico (TO) por parte de las proyecciones retinianas (Arenzana, 2002). Se ha sugerido que podría intervenir directamente en la transmisión de la información visual desde la retina al TO, así como desempeñar algún efecto adicional por su presencia en células del circuito tectal (Arévalo *et al.*, 1995).

Notch 1a.

El gen *notch* codifica una proteína que pertenece a una familia de receptores transmembrana que funcionan como factores de transcripción y que están muy conservados en la evolución. En vertebrados se han descrito cuatro tipos de receptores Notch: Notch1, Notch2, Notch3 y Notch4. Estos receptores tienen un dominio extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular (Brou *et al.*, 2000). Se activan cuando se unen a ligandos transmembrana (Delta y Serrata) de células vecinas. Tras la unión y la consiguiente activación del receptor Notch, se produce la proteólisis del mismo, de modo que el dominio intracelular se libera y transloca al núcleo celular, donde actúa como factor de transcripción (Yaron *et al.*, 2006). En la neurogénesis de vertebrados se ha descrito que Notch1, y su ligando Delta1, están implicados en el mantenimiento de precursores neuronales indiferenciados (Chitnis *et al.*, 1995; Henrique *et al.*, 1995, 1997; Perron y Harris, 2000). Sin embargo, también se ha visto que la activación de Notch1 puede favorecer la diferenciación de determinados tipos celulares.

Justificación y objetivos

La realización del presente Trabajo de fin de Máster se ha llevado a cabo durante el curso 2008-2009 bajo la tutela de la Dra. Rosario Arévalo Arévalo, en el laboratorio de Neurobiología Comparada del Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCYL), en Salamanca; y recoge los primeros experimentos de lo que en un futuro aspira a convertirse en una tesis doctoral. En dicho laboratorio llevan varios años trabajando en el desarrollo embrionario del sistema visual del pez cebra (Arenzana, 2002) y en las posibles alteraciones producidas por teratógenos (Arenzana, 2006; Santos Ledo, 2007). Estudiando estas alteraciones podemos comprender cómo son los mecanismos celulares y moleculares que controlan la bilateralización y separación de las vesículas ópticas. Anteriormente, se ha observado que el tratamiento con AR produce la duplicación de la retina del pez cebra (Hyatt *et al.*, 1992), pero se conoce muy poco sobre las alteraciones neuroquímicas y los efectos de este retinoide en el desarrollo del sistema visual de vertebrados.

Por tanto, los objetivos del presente trabajo han sido:

1. Tratar a los embriones de pez cebra con diferentes concentraciones de AR y analizar su supervivencia hasta las 48 hpf.
2. Estudiar los efectos del exceso de AR en el desarrollo de los embriones hasta las 48 hpf.
3. Hacer una caracterización neuroquímica de la retina de los animales tratados.

El tratamiento lo realizamos entre los estadios de 3 y 8 somitos, cuando las vesículas ópticas se separan lateralmente a partir del campo morfogénico común que origina los ojos, situado en el centro de la placa neural anterior (Li *et al.*, 1997). En estos estadios, el tratamiento con AR afectará de una manera importante a la morfogénesis del sistema visual.

La primera hipótesis de partida fue que los embriones no sobrevivirían al tratamiento con AR hasta las 48 hpf. La segunda hipótesis fue que habría diferencias en la distribución de proteínas y en la expresión de genes en el SNC, dado el efecto morfogénico y teratogénico de este lípido administrado en exceso.

Material y métodos

Animales.

El animal de experimentación utilizado para la realización de este Trabajo fue el pez cebra *Danio rerio*. Su ciclo de vida se esquematiza en la Figura 2. Los ejemplares adultos utilizados como individuos reproductores pertenecían a la estirpe AB, una de

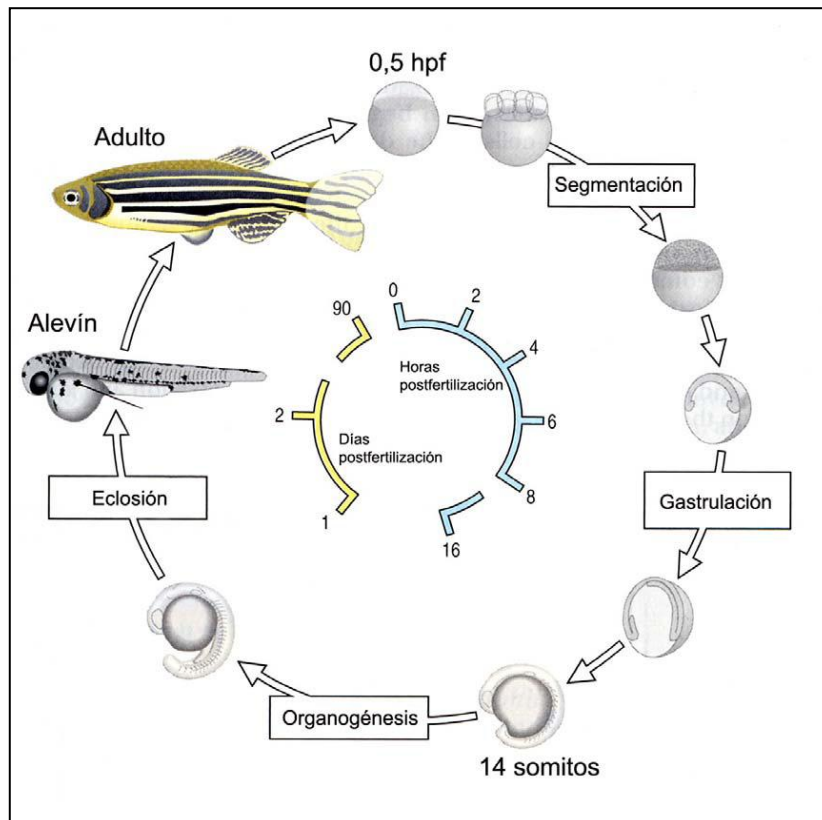


Figura 2. Ciclo de vida del pez cebra. Imagen modificada de *Principles of Development* (Wolpert *et al.*, 1998).

las que dispone el Departamento de Biología Celular y Patología de la Universidad de Salamanca. Los peces fueron mantenidos a 28,5 °C, con un ciclo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad

como ha sido descrito previamente (Westerfield, 1995).

Los animales fueron manipulados siguiendo las directivas de la Comunidad Europea (86/609/EEC y 2003/65/EC) y la legislación española (RD 1201/2005, BOE 252/34367-91, 2005).

Obtención de los embriones.

La tarde anterior al día de la puesta, los ejemplares reproductores (2 hembras y 1 macho) eran trasladados a peceras de cría, que contenían agua destilada con sales *Instant Ocean*® (*Aquarium Systems*, Mentor, Ohio; EE.UU.) a una concentración de 0,3

g/l, y que eran mantenidas a 28.5 °C. El primer estímulo luminoso tras el ciclo de oscuridad desencadena la liberación de los huevos y del espermatozoides. Los huevos que se obtenían eran dispuestos en placas de petri 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 habían añadido dos gotas de azul de metileno fenicado por litro para evitar el crecimiento fúngico. Las placas se mantenían en una estufa a 28.5 °C. A las dos horas de la recogida de los huevos se observaban con una lupa binocular Leica zoom 2000; los no fertilizados y los que estuvieran en mal estado se desechaban.

Tratamiento de los embriones con AR.

El AR puro se solubilizó en H₂O con el detergente dimetilsulfóxido (DMSO) y se mantuvo en alícuotas de concentración 0.1 M a -20 °C. Las concentraciones de AR utilizadas para hacer los tratamientos fueron 0.1 µM, 1 µM, 10 µM, y 100 µM, obtenidas a partir de las alícuotas de AR 0.1 M y preparadas en medio E3. De esta forma se establecieron cuatro grupos experimentales, cada uno de los cuales sería tratado con una concentración. Los animales empleados como controles se desarrollaban en el medio E3. Cada grupo experimental se componía de 10-20 embriones. Los tratamientos de los diferentes grupos de embriones con las distintas concentraciones de AR se realizaron entre los estadios de 3 somitos (11 hpf) y 8 somitos (13 hpf). Los somitos son una serie de bloques pares en los que se divide el mesodermo paraxial de los embriones de vertebrados durante el desarrollo temprano (Fig. 3), y que originan la columna vertebral, los músculos axiales y la dermis dorsal. La identificación de los somitos se llevó a cabo mediante observación con lupa binocular. Tras el tratamiento se lavaban los embriones con medio E3, en el que se dejaban a 28°C. Entre las 24 y las 48 hpf se mantenían en feniltiourea (PTU), disuelta en medio E3 a 28°C. La PTU se usaba para inhibir la pigmentación. A las 48 hpf se descorionaban los embriones para después fijarlos en paraformaldehído al 4% durante 24h. a 4°C. Tras la fijación se eliminaba el paraformaldehído con varios lavados en PBS a pH 7,4; después se les daba otro lavado con 50% de PBS y 50% de metanol y se almacenaban en metanol 100% a -20°C.

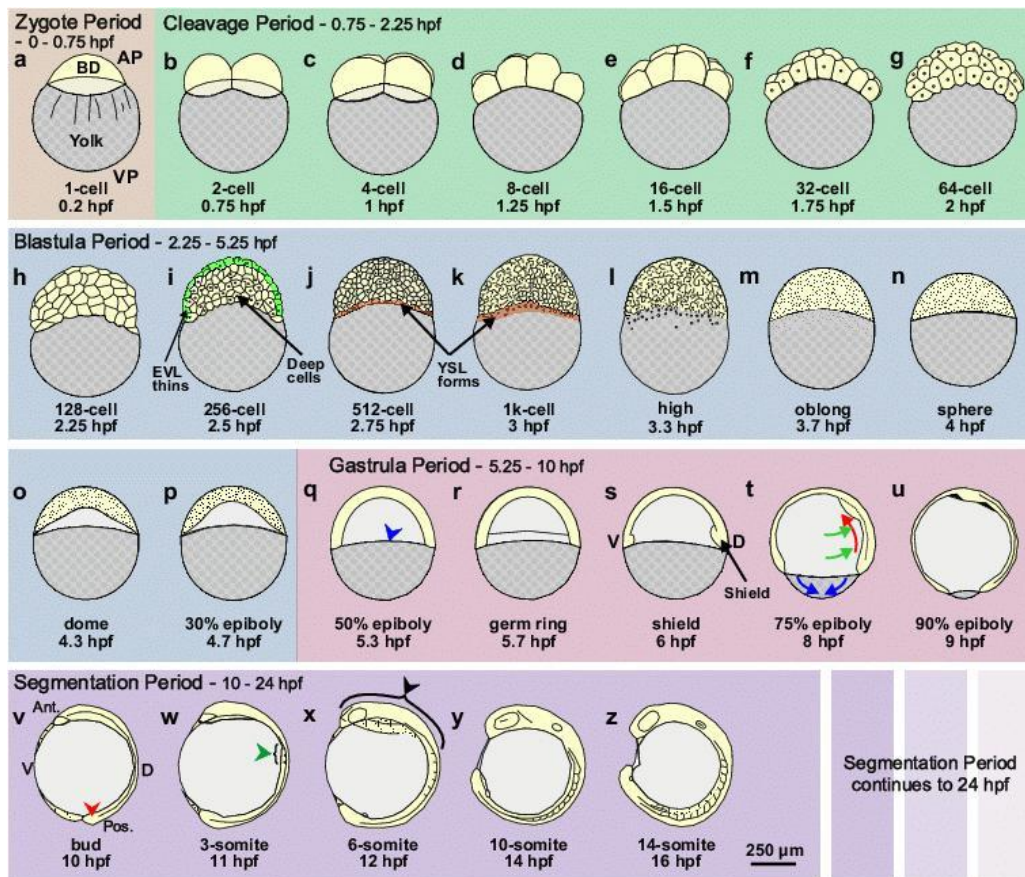


Figura 3. Imagen tomada de Webb and Miller, 2007.

Análisis de supervivencia de los embriones a los tratamientos.

El análisis de la supervivencia de los embriones de los diferentes grupos experimentales se hizo a los 24 y 48 hpf, observando cada embrión bajo la lupa binocular. Los criterios para saber si estaban vivos fueron el movimiento y el latido del corazón.

Técnica inmunohistoquímica *in toto*.

Esta técnica permite observar en el embrión entero el patrón de distribución espacial de las proteínas a estudiar. Se basa en la utilización de anticuerpos específicos para detectar las proteínas de interés (anticuerpos primarios). A estos se unen anticuerpos biotinilados (anticuerpos secundarios), que a su vez se unen a complejos de avidina-biotina-peroxidasa (ABC). Las peroxidasa hacen que la diaminobencidina

(DAB) usada para el revelado se oxide y forme un precipitado marrón en las células en las que se encuentra la proteína a la que se une el anticuerpo primario. Para el inmunomarcaje de Calretinina se utilizó un anticuerpo primario policlonal hecho en conejo a una concentración de 1/10.000. El secundario fue el anticuerpo anti-conejo biotinilado hecho en cabra y usado a concentración 1/250.

El protocolo empleado para la realización de la técnica inmunohistoquímica *in toto* fue el siguiente:

1^{er} día.

Los embriones se rehidratan para eliminar los restos del metanol en el que deben llevar almacenados a -20 °C al menos dos días. Para ello, primero se les da un lavado de cinco minutos en 50% metanol-50% PBST 0,8% (PBS con detergente triton x-100 al 0,8% en agua destilada) más otros cuatro sucesivos de igual duración en PBST 0,8 %.

Ahora se tratan con proteinasa K durante 30 minutos. La proteinasa K se almacena a -20 °C y se prepara a una concentración 1/1000 en PBST 0,8%; sirve para permeabilizar las membranas celulares.

Se les da 2 lavados de 5 minutos en PBST 0,8%.

Se les postfija en paraformaldehído al 4% durante 20 minutos.

Para lavar el paraformaldehído se les da un aclarado en PBST 0,8%; después se les da varios lavados durante al menos 1 h.

Se prepara el medio de preincubación del anticuerpo primario, que consiste en suero al 10% del animal donde esté hecho el anticuerpo secundario, y detergente DMSO al 1%, en PBST 0,8%. La preincubación dura al menos una hora a temperatura ambiente.

Se prepara el anticuerpo primario a la concentración que corresponda en el mismo medio de preincubación. La incubación de los embriones con el anticuerpo dura una noche a 4°C.

2^o día.

Para eliminar el exceso de anticuerpo se dan lavados de 30 minutos en PBST 0,8% durante cinco horas.

Se prepara el anticuerpo secundario en el mismo medio de preincubación a la concentración debida. La incubación dura una noche a 4°C.

3^{er} día.

Para eliminar el exceso de anticuerpo secundario se dan lavados de 30 minutos en PBST 0,8% durante cinco horas.

Se prepara el complejo *Avidina-biotina-complex* (ABC) al menos 30 minutos antes de utilizarlo y se guarda a 4°C. El ABC amplificará el marcaje. Los componentes A y B del ABC se preparan a una concentración de 1/500 en PBST 0,8%. La incubación de los embriones con ABC dura una noche a 4°C.

4^o día.

Para eliminar el exceso de ABC se dan lavados de 30 minutos en PBST 0,8% durante cinco horas; los dos últimos lavados se dan en tampón Tris-HCl 0,2 M con pH 7,4.

Se prepara el medio de revelado, que se compone de DAB al 0,02% y H₂O₂ al 0,0003% en Tris-HCl 0,2 M con pH 7,4. Los embriones se colocan en pocillos de placas de plástico con este medio.

La reacción de revelado, por la cual la DAB va formando un precipitado marrón en las células inmunoreactivas, se para con PBS. Tras varios lavados en PBS, los embriones se guardan en paraformaldehído al 4% una noche a 4°C.

5^o día.

Se elimina el paraformaldehído con 5 lavados de 10 minutos en PBS.

Para guardar los embriones, éstos son deshidratados en una batería de glicerol de concentración creciente: 30%, 50%, 70% y 100% en PBS. Deben pasar al menos dos horas en cada uno. Tras el último pase se guardan en glicerol 100% a 4°C.

Técnica de hibridación *in situ in toto*.

Con esta técnica podemos observar en el embrión entero el patrón de expresión espacial de los genes a estudiar. Está basada en el empleo de ribosondas, que se unen a determinadas regiones de los mRNA cuya expresión queremos detectar. Las ribosondas utilizadas están marcadas con digoxigenina, a la cual se unen anticuerpos específicos conjugados con fosfatasa alcalina (anti-digoxigenin-AP, Fab fragments). En el revelado, el NBT es reducido por acción de esta enzima, que toma los electrones del BCIP, y forma un precipitado morado en las células que expresan el mRNA al cual la sonda se une. Para la detección del mRNA de *Notch1a* se utilizó una ribosonda cedida amablemente por el Prof. Dr. Stephen Wilson.

El protocolo empleado para la realización de la técnica inmunohistoquímica *in toto* fue el siguiente:

1^{er} día.

Los embriones se rehidratan para eliminar los restos del metanol en el que deben llevar almacenados a -20 °C al menos dos días. Para ello, primero se les da un lavado de cinco minutos en 50% metanol-50% PBST 0,1% (PBS con detergente triton x-100 al 0,1% en agua destilada), más otros cuatro sucesivos de igual duración en PBST 0,8 %.

Ahora se tratan con proteinasa K durante 30 minutos. La proteinasa K se almacena a -20 °C y se prepara a una concentración 1/1000 en PBST 0,1%; sirve para permeabilizar las membranas celulares.

Se les da 2 lavados de 5 minutos en PBST 0,1%.

Se les postfija en paraformaldehído al 4% durante 20 minutos.

Para eliminar el paraformaldehído se les da un aclarado, y después 6 lavados de 10 minutos en PBST 0,1%.

Se incuban los embriones en una mezcla al 50% de solución de hibridación Hyb(+) (solución de formamida, RNA de levadura y sales en agua destilada) y PBST 0,1% durante 5 minutos.

Ahora se incuban en medio de hibridación durante 1h. a 68°C en termobloque.

Se cambia el medio Hyb(+) por la ribosonda, que está guardada a -20°C. La ribosonda lleva unida digoxigenina. La hibridación dura una noche a 68°C.

2º día.

Se retira la sonda, que se guarda de nuevo en el congelador para reutilizarla, y se dan 4 lavados en medio de hibridación Hyb(-) (solución de formamida y sales en agua destilada) a 68°C.

Se da un aclarado en medio SSC 2x (solución de sales), y después 2 lavados de 30 minutos en SSC 0,2x a 68°C.

Se dan lavados en PBST 0,1% durante al menos 1 h. a temperatura ambiente.

A continuación se incuban los embriones en medio MAB durante al menos 2h. a temperatura ambiente. Este es el medio de preincubación del anticuerpo antidigoxigenina que reconocerá la sonda hibridada.

Se incuban los embriones durante una noche con el anticuerpo antidigoxigenina, que se usa a concentración 1/6000, a 4°C.

3er día.

Se dan lavados durante al menos 2 h. en PBST 0,1% para eliminar el exceso de anticuerpo.

Después se prepara el medio de revelado Xpho (10% de Tris-HCl de pH 9,5; 5% de MgCl 1M; 2,5% de NaCl 4M; y 1% de Triton X100 al 10% en H₂O destilada). En este medio se dan lavados durante al menos 1h.

Para revelar se prepara en el medio Xpho el sustrato coloreado NBT a una concentración 1/1000 y el donador de electrones BCIP a una concentración de 3,5/1000 (1/285). Según la reacción avanza se va formando un precipitado morado en las células que expresen RNAm con el cual la ribosonda ha hibridado. La reacción se para con PBS

Tras varios lavados en PBS 0,2M con pH 7,4, los embriones se guardan en paraformaldehído al 4% una noche a 4°C.

4º día.

Se elimina el paraformaldehído con cinco lavados de 10 minutos en PBS.

Para guardar los embriones, estos son deshidratados en una batería de glicerol de concentración creciente: 30%, 50%, 70% y 100% en PBS. Deben pasar al menos dos horas en cada uno. Tras el último pase se guardan en glicerol 100% a 4°C.

Fotografiado de los resultados.

Previamente a la observación con microscopio y al fotografiado con cámara digital, los embriones deben ser montados en portaobjetos de cristal, para lo cual se emplea glicerol 100%, que por su viscosidad facilita la orientación de los mismos. Para observar los resultados de las técnicas de inmunohistoquímica e hibridación *in situ in toto* se empleó la microscopía óptica de campo claro, con un microscopio Provis Olympus AX70. Las imágenes de los resultados se obtuvieron mediante una cámara digital DP Olympus acoplada al microscopio.

Resultados

Supervivencia de los embriones al tratamiento con AR.

Tratamos embriones de pez cebra con diferentes concentraciones de AR (0.1 μM , 1 μM , 10 μM , y 100 μM) y analizamos su supervivencia a las 24 y 48 hpf. El tratamiento de cada uno de los diferentes grupos experimentales se repitió 8 veces para asegurar la fiabilidad de los resultados. Todos los embriones sobrevivieron al tratamiento hasta las 48 hpf. Los controles también sobrevivieron. El número total de embriones tratados con cada concentración, y que sobrevivieron al tratamiento, además del número de controles empleados, se recoge en la tabla 1.

	Embriones de partida	Vivos a las 24 hpf	Vivos a las 48 hpf
Controles	100	100	100
AR 0.1 μM	143	143	143
AR 1 μM	108	108	108
AR 10 μM	96	96	96
AR 100 μM	95	95	95

Tabla 1. Resultados del análisis de supervivencia de los embriones tratados con AR a las 24 y 48 hpf. Todos los tratados sobrevivieron, así como los controles.

Alteraciones observadas en el desarrollo embrionario a las 48 hpf debidas al tratamiento con AR.

Las alteraciones del desarrollo que se pudieron observar a las 48 hpf fueron homogéneas dentro de los grupos, y se repitieron en todos los tratamientos. En general, los embriones tratados con AR 0.1 μM (Fig. 4b) presentaban el extremo de la cola torcido y edema pericárdico; sin embargo les latía el corazón y presentaban movimientos espasmódicos como los controles (Fig. 4a). Los tratados con AR 1 μM (Fig. 4c) presentaban la cola torcida, edemas pericárdicos mayores y acortamiento del eje antero-posterior; no tenían corazón pero se movían. El tamaño de la cabeza era algo menor que el de los controles. Los tratados con AR 10 μM (Fig. 4d) presentaban graves alteraciones de su morfología: el eje antero-posterior muy acortado, edema por todo el

cuerpo, cabeza y ojos poco desarrollados y escaso movimiento. Los tratados con AR 100 μM (Fig. 4e) estaban más alterados aún, sin cabeza ni ojos reconocibles. Su cuerpo presentaba numerosos abultamientos con masas celulares desorganizadas y edemas que deformaban el embrión. Además, los embriones tratados con AR 1, 10 y 100 μM presentan el eje axial de su cuerpo torcido, de manera que exhiben una curvatura en sentido ventral.

La disminución del tamaño de la cabeza de los embriones tratados es mayor al aumentar la concentración de AR: a mayor concentración, menor tamaño y menor diferenciación del encéfalo, sobre todo del prosencéfalo y el mesencéfalo. El rombencéfalo se extiende rostralmente pero como la cabeza es menor se mantiene del mismo tamaño relativo en todos los grupos.

Patrón de distribución espacial de Calretinina en los embriones de 48 horas postfecundación.

Además del estudio morfológico y anatómico, el análisis de la distribución de distintos marcadores moleculares permite la identificación de diferentes poblaciones y subpoblaciones celulares. Por otro lado, la distribución de determinados marcadores moleculares en los grupos experimentales y su comparación con el grupo control puede aportar datos acerca de qué procesos morfogenéticos pueden ser afectados por el tratamiento con AR.

En los animales control (Fig. 5a, 6a) no observamos inmunomarcaje claro para Calretinina (CR) en la retina. Sin embargo, en los bulbos olfatorios se observa un marcaje muy intenso en células fusiformes. En el tálamo dorsal encontramos marcaje para CR en células de morfología esférica. A lo largo del rombencéfalo hay células positivas para CR, así como en toda la médula espinal, donde están perfectamente alineadas. Son células piriformes o fusiformes y pueden observarse algunas prolongaciones marcadas de las mismas.

En los embriones tratados con AR 0.1 μM (Fig. 5b, 6b) no hay diferencias en cuanto al inmunomarcaje de CR respecto a los controles. En los tratados con AR 1 μM (Fig. 4c, 5c) el patrón de marcaje es similar, pero los bulbos olfatorios se localizan en

posición más dorsal respecto a los controles. En el rombencéfalo puede observarse una disminución del número de células inmunomarcadas. En el grupo tratado con AR 10 μM (Fig. 5d, 6d) los bulbos olfatorios se encuentran en posición ligeramente más dorsal que en los tratados con AR 1 μM . En el rombencéfalo las células inmunomarcadas para CR están más desordenadas a lo largo del eje longitudinal que las del grupo control. En los embriones tratados con AR 100 μM (Fig. 5e, 6e) es llamativo el intenso marcaje en los bulbos olfatorios (que están en posición totalmente dorsal) en los que se distinguen numerosas células e incluso algunas fibras nerviosas inmunorreactivas para CR. En la médula espinal también se mantiene el marcaje; sin embargo, en el resto del encéfalo apenas se distingue alguna célula débilmente marcada.

Patrón de expresión espacial de *notch1a* en embriones de 48 horas postfecundación.

En los animales control (Fig. 7a) se observa un marcaje homogéneo en la mayor parte de la retina, aunque en la región central no lo hay. Tanto en el área preóptica como en el mesencéfalo y el rombencéfalo hay marcaje muy intenso, sobre todo en las zonas rostrales y ventrales adyacentes al istmo rombencefálico, que es la fisura que separa anatómicamente el mesencéfalo del rombencéfalo. En este último se ven marcados para *notch1a* todos los rombómeros, sobre todo el r0, que dará lugar al cerebelo.

En los animales tratados con AR 0.1 μM y 1 μM (Fig. 7b) el patrón del marcaje para *notch1a* es similar al de los controles. En el grupo tratado con AR 10 μM sigue habiendo marcaje en la retina, aunque los ojos no están tan formados como en los controles. También siguen marcándose el mesencéfalo y el rombencéfalo, pero de una forma más débil. En los animales tratados con AR 100 μM permanece un ligero marcaje para *notch1a* en el esbozo de la retina tienen, así como en los territorios adyacentes al istmo rombencefálico. A la vista de los resultados en todos los grupos encontramos que el marcaje de *notch1a* en el encéfalo disminuye según aumenta la concentración de AR en el medio.

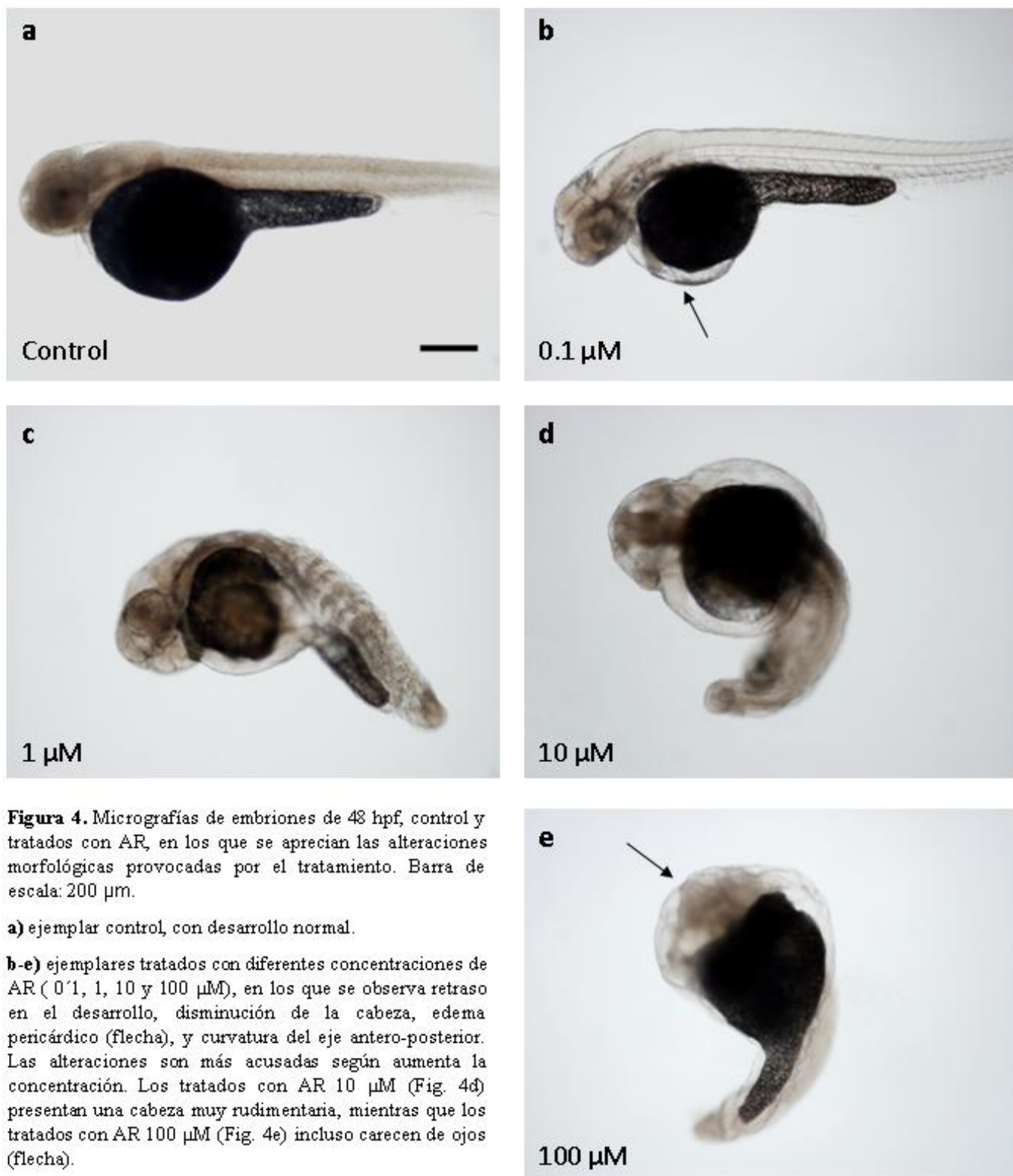


Figura 4. Micrografías de embriones de 48 hpf, control y tratados con AR, en los que se aprecian las alteraciones morfológicas provocadas por el tratamiento. Barra de escala: 200 μm .

a) ejemplar control, con desarrollo normal.

b-e) ejemplares tratados con diferentes concentraciones de AR (0.1, 1, 10 y 100 μM), en los que se observa retraso en el desarrollo, disminución de la cabeza, edema pericárdico (flecha), y curvatura del eje antero-posterior. Las alteraciones son más acusadas según aumenta la concentración. Los tratados con AR 10 μM (Fig. 4d) presentan una cabeza muy rudimentaria, mientras que los tratados con AR 100 μM (Fig. 4e) incluso carecen de ojos (flecha).

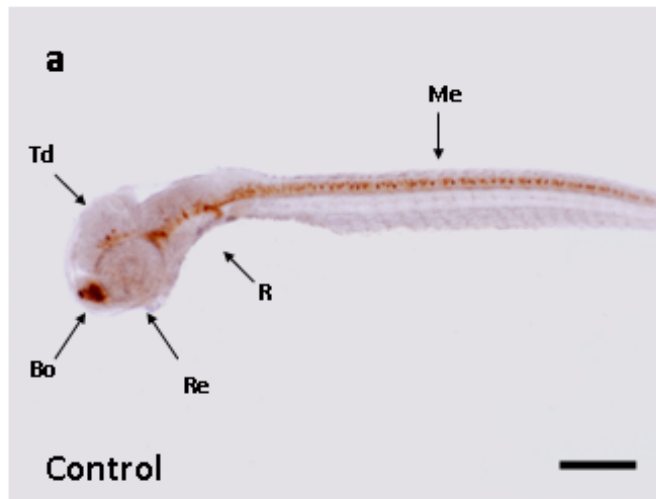


Figura 5. Micrografías de embriones de 48 hpf, control y tratados con AR, donde se muestra el patrón espacial de distribución de la proteína CR mediante una técnica inmunohistoquímica. Barra de escala: 200 μ m.

a) ejemplar control, en el que se observa marcaje en los bulbos olfatorios (Bo), el tálamo dorsal (Td), el rombencéfalo (R), y la médula espinal (Me). En la retina (Re) no aparece marcaje.

b-e) ejemplares tratados con diferentes concentraciones de AR (0'1, 1, 10 y 100 μ M). Puede apreciarse como, a medida que aumenta la concentración de AR, el marcaje para CR va desapareciendo en el tálamo dorsal y el rombencéfalo, mientras que se mantiene en los bulbos olfatorios y la médula espinal. Nótese que la posición de los bulbos olfatorios se hace más dorsal a medida que aumenta la concentración AR.

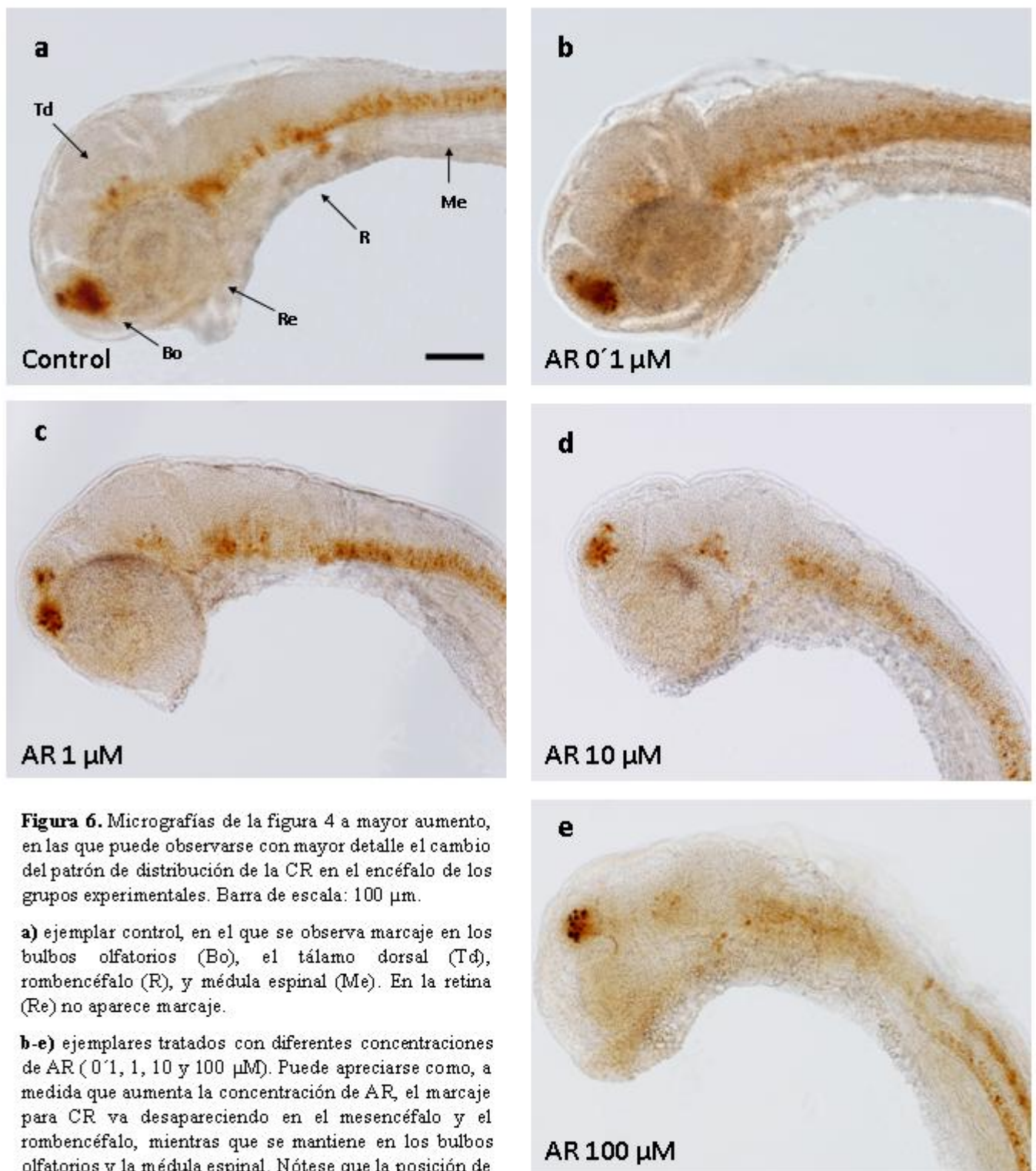


Figura 6. Micrografías de la figura 4 a mayor aumento, en las que puede observarse con mayor detalle el cambio del patrón de distribución de la CR en el encéfalo de los grupos experimentales. Barra de escala: 100 μm .

a) ejemplar control, en el que se observa marcaje en los bulbos olfatorios (Bo), el tálamo dorsal (Td), rombencéfalo (R), y médula espinal (Me). En la retina (Re) no aparece marcaje.

b-e) ejemplares tratados con diferentes concentraciones de AR (0.1, 1, 10 y 100 μM). Puede apreciarse como, a medida que aumenta la concentración de AR, el marcaje para CR va desapareciendo en el mesencéfalo y el rombencéfalo, mientras que se mantiene en los bulbos olfatorios y la médula espinal. Nótese que la posición de los bulbos olfatorios se hace más dorsal a medida que aumenta la concentración.

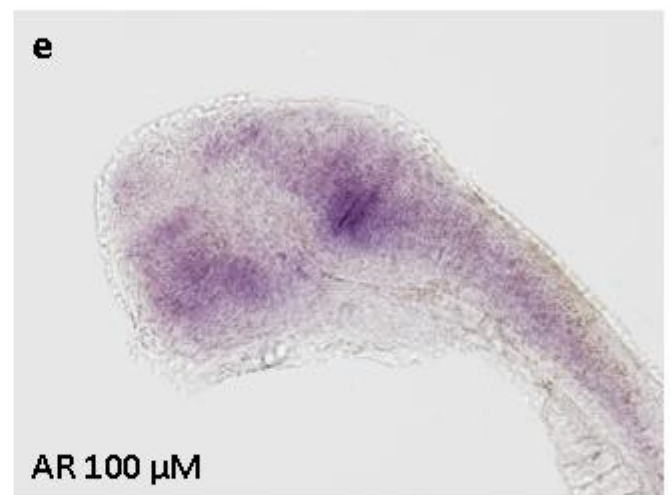
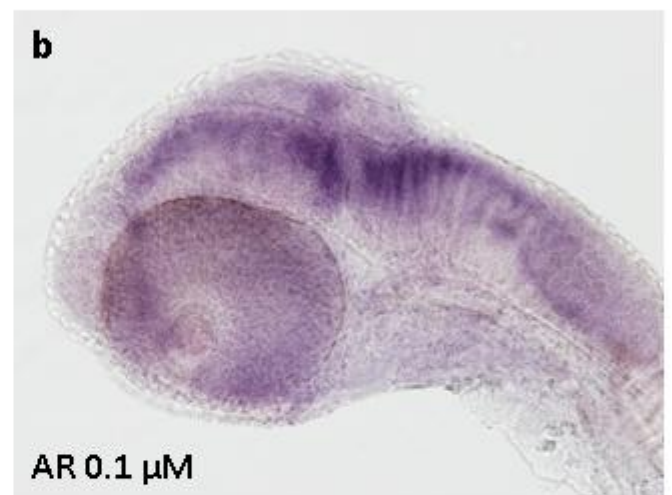
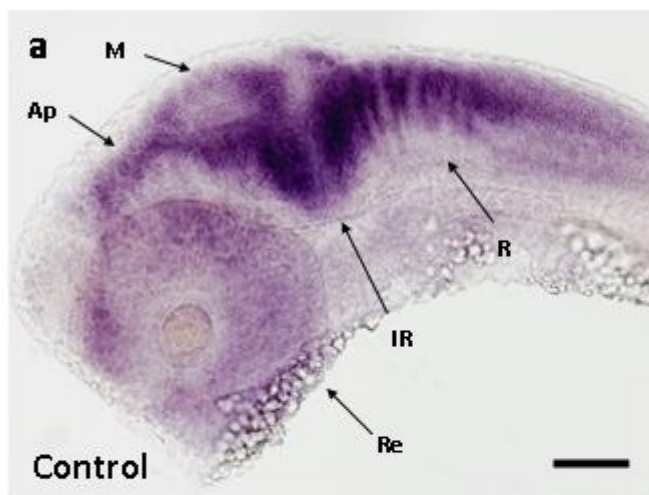


Figura 7. Micrografías de embriones de 48 hpf, control y tratados con AR, en las que se muestra el patrón de expresión espacial del gen *notch1a* mediante hibridación *in situ*. Barra de escala: 100 μ m.

a) ejemplar control, en el que se observa marcaje en la retina (Re), el área preóptica (Ap), el mesencéfalo (M) y el rombencéfalo (R).

b-e) ejemplares tratados con diferentes concentraciones de AR (0.1, 1, 10 y 100 μ M). Puede apreciarse como se mantiene el mismo patrón de marcaje para el mRNA de *notch1a* en todos los grupos, tanto en la retina como en ambos lados del istmo rombencéfálico (en a), IR, si bien la intensidad y extensión del marcaje disminuyen según aumenta la concentración de AR.

Discusión

Supervivencia de los embriones al tratamiento con AR.

En contra de lo que pensamos inicialmente, los embriones tratados sobreviven hasta las 48 hpf, porque resulta que las malformaciones producidas por el AR a esa edad no son mortales. Además, sólo tratamos los embriones que al llegar al estadio de 3 somitos estaban en buen estado; los que presentaran algún tipo de anomalía antes de hacer el tratamiento, así como los no fecundados, eran desechados. Por otra parte, el hecho de que sobrevivan concuerda con los resultados de anteriores experimentos realizados en pez cebra, en los que el tratamiento de los embriones con concentraciones de AR 0.1 y 1 μM permitió la supervivencia hasta los 7 días de edad (Hyatt *et al.*, 1992). Habrá que estudiar cómo afecta a la supervivencia el tratamiento hasta el final del periodo larvario (5 días postfecundación (dpf)), estadio en el que finaliza la maduración anatómica (Burrill y Easter, 1994) y fisiológica (Li, 2001) del sistema visual.

Al no haber muchas diferencias en cuanto a la morfología corporal entre los ejemplares tratados con AR 10 μM y los tratados con AR 100 μM , cabe pensar que en los primeros el efecto del AR está saturado, es decir, que no se producen mayores alteraciones aunque la concentración que utilizemos aumente.

Alteraciones generales del desarrollo embrionario.

No parece que se produzca duplicación de la retina con el tratamiento, aunque para comprobarlo tendríamos que recurrir al estudio de cortes semifinos. Anteriores estudios han demostrado que los embriones de pez cebra tratados con AR 1 μM durante el final de la gastrulación (9,5 hpf) y el estadio de 5-6 somitos (11,5 hpf) presentaban dos pequeñas retinas unidas en vez de una por cada ojo; si el tratamiento se hacía en estadios anteriores no se formaba la cabeza, y si se hacía después no había duplicación de la retina (Hyatt *et al.*, 1992; 1996). Nuestros resultados coinciden con los de estos estudios, ya que el tratamiento lo hicimos después de ese intervalo, entre las 11 y las 13 hpf. En los embriones tratados con altas concentraciones de AR el rombencéfalo es grande respecto al resto encéfalo, si bien la cabeza es de menor tamaño que la de los controles. Los embriones presentan una pérdida de las estructuras anteriores de la cabeza que depende de la concentración de AR; así, nuestros resultados coinciden con

que el exceso de AR posterioriza los embriones (Marshall *et al.*, 1992; Kudoh *et al.*, 2002; Joshua *et al.* 2009). El cambio en la posición de los bulbos olfatorios, que se sitúan más dorsales según aumenta la concentración, puede ser debido a la curvatura general del embrión y a que no se produce la correcta flexura del encéfalo durante el desarrollo.

Cambios en la distribución espacial de Calretinina.

Se ha sugerido que durante el desarrollo de la retina es necesario un mínimo grado de diferenciación tisular y celular para que se detecte la expresión de CR (Ellis *et al.*, 1991; Doldan *et al.*, 1999). Nosotros hemos estudiado si el tratamiento con AR modifica la distribución de esta proteína para ver cómo se afecta la diferenciación en los embriones tratados.

El hecho de no haber inmunomarcaje para CR en la retina ni el mesencéfalo de los animales control aparentemente no coincide con los resultados anteriores obtenidos en pez cebra (Arenzana, 2006). No obstante, seguramente esto sea debido a que las técnicas inmunohistoquímicas empleadas fueron diferentes, pues los trabajos anteriores estaban hechos sobre secciones del embrión, no *in toto* como los nuestros. En nuestro caso, para evitar marcaje de fondo en el encéfalo, debimos de parar la reacción de revelado posiblemente antes de que se empezaran a marcar las células de la retina.

Por otra parte, en los animales tratados observamos cómo el marcaje de CR disminuye en todo el encéfalo según aumenta la concentración de AR con la que son tratados, excepto en los bulbos olfatorios, lo cual resulta sorprendente. El tratamiento con AR provoca que las estructuras anteriores de la cabeza no se desarrollen correctamente, dando lugar a encéfalos menos desarrollados que los de los controles a las 48 hpf. Esto podría explicar porqué el marcaje en esas zonas no desarrolladas disminuye. Sin embargo, los bulbos olfatorios pertenecen al prosencéfalo (son las regiones más rostrales del telencéfalo), y en ellos el marcaje es igual de intenso tanto en los tratados con AR 100 μM como en los controles. Son un territorio que no se ve afectado. Este hecho podría deberse a que el AR no ejerza ningún efecto directo sobre el telencéfalo más anterior, bien porque allí sea degradado activamente por las enzimas Cyp26, o bien porque esta zona no responda al AR. El mismo planteamiento es válido para explicar el marcaje en la médula espinal. Parece ser que el prosencéfalo, a

excepción de los bulbos olfatorios, es la zona del SNC más sensibles al exceso de AR. No obstante, a pesar de la extensión del rombencéfalo en los animales tratados, el marcaje es menor, lo que indica que la diferenciación es menor también.

La disminución del número de células que expresan CR que se produce únicamente en las zonas del encéfalo comprendidas entre los bulbos olfatorios y la médula espinal en los animales tratados está en concordancia con la falta de desarrollo que presentan dichos animales, pero aún desconocemos porqué se produce en dichas zonas.

Cambios en la expresión de *notch1a*.

Experimentos realizados en *Xenopus* han demostrado que el exceso de AR produce la inhibición de la señal Notch en el páncreas dorsal embrionario (Chen et al, 2004). Nosotros hemos utilizado como marcador el gen *notch1a* (que hemos visto que se expresa en mesencéfalo y rombencéfalo) porque está implicado en neurogénesis y queríamos estudiar como afectaba el tratamiento con AR a este proceso en el sistema visual en desarrollo. Como en nuestro laboratorio no disponemos de anticuerpos para marcar la proteína Notch1a, hemos recurrido a la hibridación *in situ*, que nos permite detectar la distribución del mRNA del gen *notch1a*, es decir, la expresión cualitativa de *notch1a* en el SNC. El hecho de que el patrón de expresión de *notch1a* sea similar tanto en los controles como en los grupos tratados con AR 0.1 y 1 μM puede ser debido a que los encéfalos de estos tres grupos son parecidos en cuanto a su desarrollo y morfología. Aunque la técnica de hibridación *in situ* no permite cuantificar la cantidad de mRNA, sí podemos decir que parece haber mayor expresión en las zonas rostrales y ventrales adyacentes al istmo rombencefálico, puesto que allí el marcaje es más intenso. Los animales tratados con AR 10 y 100 μM presentan encéfalos menos desarrollados a las 48 hpf que los demás grupos; el tamaño del prosencéfalo y el mesencéfalo es notablemente menor en aquellos que en estos últimos.

Así pues, vemos como según aumenta la concentración de AR, disminuye el marcaje de *notch1a* en el encéfalo respecto a los controles, lo que coincide con los resultados obtenidos en el páncreas de *Xenopus* (Chen et al, 2004). Estos resultados,

concordantes con los de CR, indican que el pez cebra es un buen modelo para estudiar el efecto del AR sobre el desarrollo de SNC.

Conclusiones

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, y de acuerdo a los objetivos planteados, podemos concluir que:

1. El tratamiento con AR entre los estadios de 3 y 8 somitos no provoca la muerte de los embriones de pez cebra (a ninguna de las concentraciones utilizadas) durante las primeras 48 hpf.

2. Las alteraciones que presentan los embriones tratados dependen de la concentración de AR: a mayor concentración de AR se producen alteraciones más graves.

3. El tratamiento con AR provoca una disminución de la diferenciación y neurogénesis del SNC del pez cebra, a la vista de los resultados obtenidos con los marcajes de CR y *notch1a* respectivamente.

Bibliografía

- Andressen C, Blümcke I, Celio MR. 1993.** Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell tissue Res* 271:181-208.
- Arenzana FJ. 2002.** Desarrollo de la vía visual de teleósteos: estudio inmunocitoquímico. Universidad de Salamanca. Trabajo de Grado.
- Arenzana FJ. 2006.** Caracterización neuroquímica de las áreas visuales primarias del pez cebra en condiciones normales y en ciclopia inducida por etanol. Universidad de Salamanca. Tesis Doctoral.
- Arenzana FJ, Carvan MJ, III, Aijon J, Sanchez-Gonzalez R, Arévalo R, and Porteros A. 2006.** Teratogenic effects of ethanol exposure on zebrafish visual system development. *Neurotoxicol Teratol* 28:342-348.
- Arévalo R, Alonso JR, Porteros A, Briñon JG, Lara J, Aijón J. 1995.** Calretinin-like immunoreactivity in the optic tectum of the tench (*Tinca tinca* L.). *Brain Res* 671: 112-8.
- Begemann G, Marx M, Mebus K, Meyer A, and Bastmeyer M. 2004.** Beyond the neckless phenotype: influence of reduced retinoic acid signaling on motor neuron development in the zebrafish hindbrain. *Dev Biol* 271:119-129.
- Bovolenta P. 2005.** Morphogen signaling at the vertebrate growth cone: a few cases or a general strategy? *J Neurobiol* 64:405-416.
- Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, and Israel A. 2000.** A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell* 5:207-216.
- Burrill JD and Easter SS. 1994.** Development of the retinofugal projections in the embryonic and larval zebrafish (*Brachydanio rerio*). *J Comp Neurol* 346: 583-600.
- Chen Y, Pan FC, Brandes N, Afelik S, Sölter M, Pieler T. 2004.** Retinoic acid signaling is essential for pancreas development and promotes endocrine at the expense of exocrine cell differentiation in *Xenopus*. *Dev Biol* 271:144-60.
- Chitnis A, Henrique D, Lewis J, Ish-Horowicz D, y Kintner C. 1995.** Primary neurogenesis in *Xenopus* embryos regulated by a homologue of the *Drosophila* neurogenic gene Delta. *Nature* 375, 761-766.
- Doldan MJ, Prego B, de Miguel V. 1999.** Immunohistochemical localization of calretinin in the retina of the turbot (*Psetta maxima*) during development. *J Comp Neurol* 406: 425-32.
- George A. Hyatt, Ellen A. Schmitt, Nicholas R. Marsh-Armstrong, and John E. Dowling. 1992.** Retinoic acid-induced duplication of the zebrafish retina. *Neurobiology* Vol 89:8293-8297.
- George A Hyatt, Ellen A Schmitt, Nicholas R Marsh-Armstrong, P McCaffery UC Dräger and JE Dowling. 1996.** Retinoic acid establishes ventral retinal characteristics. *Development* 122:195-204.
- Guglielmo R, Corvetto G. 2000.** First appearance and distribution of calretinin-

immunoreactive neurons in the early development of the chick central nervous system. *Cell Tissue Res* 300:21-8.

Henrique D, Adam J, Myat A, Chitnis A, Lewis J, and Ish-Horowicz D. 1995. Expression of a Delta homologue in prospective neurons in chick. *Nature* 375:787-790.

Henrique D, Hirsinger E, Adam J, Le R, I Pourquie O, Ish-Horowicz D, y Lewis J. 1997. Maintenance of neuroepithelial progenitor cells by Delta-Notch signaling in the embryonic chick retina. *Curr Biol* 7, 661-670.

Houart C, Caneparo L, Heisenberg C, Barth K, Take-Uchi M, and Wilson S. 2002. Establishment of the telencephalon during gastrulation by local antagonism of Wnt signaling. *Neuron* 35:255-265.

Ikeya M, Lee SM, Johnson JE, McMahon AP, and Takada S. 1997. Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors. *Nature* 389:966-970.

Joshua SW and Deborah Yelon. 2009. Increased hox activity mimics the teratogenic effects of excess retinoic acid signaling. *Developmental Dynamics* 238:1207–1213.

Kuhlenbeck H. 1973. The central Nervous System of Vertebrates (III). Basilea: S. Karger.

Li H, Tierney C, Wen L, Wu JY, 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 L. 2001. Zebrafish mutants: behavioral genetic studies of visual system defects. *Dev Dyn* 221:365-72.

Giuseppe Lupo, Ying Liu, Rong Qiu, Roshantha AS Chandraratna, Giuseppina Barsacchi, Rong-Qiao He and William A Harris. 2005. Dorsoventral patterning of the *Xenopus* eye: a collaboration of retinoid, hedgehog and FGF receptor signaling. *Development* 132, 1737–1748.

Matthew Marklund, My Sjödal, Blake C Beehler, Thomas M Jessell, Thomas Edlund and Lena Gunhaga. 2004. Retinoic acid signalling specifies intermediate character in the developing telencephalon. *Development* 131:4323–4332.

Marsh-Armstrong N, McCaffery P, Gilbert W, Dowling JE and Drager UC. 1994. Retinoic acid is necessary for development of the ventral retina in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 7286-90.

Maves L and Kimmel CB. 2005. Dynamic and sequential patterning of the zebrafish posterior hindbrain by retinoic acid. *Dev Biol* 285:593-605.

Maves L, Jackman W, and Kimmel CB. 2002. FGF3 and FGF8 mediate a rhombomere 4 signaling activity in the zebrafish hindbrain. *Development* 129:3825-3837.

Niederreither K, Abu-Abed S, Schuhbauer B, Petkovich M, Chambon P and Dolle P. 2002. Genetic evidence that oxidative derivatives of retinoic acid are not involved in retinoid

signaling during mouse development. *Nat Genet* 31:84–88.

Olander S, Nordstrom U, Patthey C, and Edlund T. 2006. Convergent Wnt and FGF signaling at the gastrula stage induce the formation of the isthmus organizer. *Mech Dev* 123:166- 176.

P. Costaridis, C. Horton, J. Zeitlinger, N. Holder, and M. Maden. 1996. Endogenous Retinoids in the Zebrafish Embryo and Adult. *Developmental dynamics* 205:4141

Pasteels B, Rogers J, Blachier F and Pochet R. 1990. Calbindin and calretinin in retina from different species. *Vis Neurosci* 5:1-16.

Perron M, and Harris WA. 2000. Determination of vertebrate retinal progenitor cell fate by the Notch pathway and basic helix-loop-helix transcription factors. *Cell Mol Life Sci* 57:215-223.

Piccolo S, Sasai Y, Lu B, and DeRobertis EM. 1996. Dorsoventral patterning in *Xenopus*: Inhibition of ventral signals by direct binding of Chordin to BMP-4. *Cell* 86:589-598.

Pierani A, Brenner-Morton S, Chiang C and Jessell TM. 1999. A sonic hedgehog-independent, retinoid-activated pathway of neurogenesis in the ventral spinal cord. *Cell* 97(7):903–915.

Porteros A, Arévalo R, Weruaga E, Crespo C, Briñon JG, Alonso JR, Aijón J. 1997. Calretinin immunoreactivity in the developing olfactory system of the rainbow trout. *Brain Res Dev Brain Res* 100:102-9.

Raible F and Brand M. 2004. Divide et impera--the midbrain-hindbrain boundary and its organizer. *Trends Neurosci* 27:727-734.

Résivois A and Rogers JH. 1992. Calretinin in rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroscience* 46:101-34.

Rhinn M and Brand M. 2001. The midbrain-hindbrain boundary organizer. *Curr Opin Neurobiol* 11:34-42.

Riley BB, Chiang MY, Storch EM, Heck R, Buckles GR, and Lekven AC. 2004. Rhombomere boundaries are Wnt signaling centers that regulate metameric patterning in the zebrafish hindbrain. *Dev Dyn* 231:278-291.

Rogers JH, Résivois A. 1992. Calretinin and calbindin-D28K in rat brain: patterns of partial co-localization. *Neuroscience* 51: 843-65.

Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC, De Luca LM. 2000. Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev* 80:1021-1054.

Santos-Ledo A. 2007. Expresión de *wnt-1* durante el desarrollo del sistema nervioso central del pez cebra en condiciones normales y en ciclopia inducida por etanol. Trabajo de Grado.

Shimamura K and Rubenstein JL. 1997. Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development* 124:2709-2718.

Spemann H. 1938. Embryonic Development and induction. Nueva Haven: Yale University Press.

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

Wilkinson DG. 1989. Homeobox genes and development of the vertebrate CNS. *Bioessays* 10:82-85.

Wolpert L, Beddington R, Brockes J, Jessell T, Lawrence P and Meyerowitz E. 1998. Principles of development. Oxford University Press.

Yaron O, Farhy C, Marquardt T, Applebury M and Ashery-Padan R. 2006. Notch1 functions to suppress cone-photoreceptor fate specification in the developing mouse retina. *Development* 133:1367-1378.