

VNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA  
CELULAR Y PATOLOGÍA



INSTITUTO DE  
NEUROCIENCIAS  
CASTILLA Y LEÓN

Desarrollo y diferenciación de las  
vesículas ópticas en condiciones normales  
y en modelos de ciclopia

-Tesis Doctoral-

Adrián Santos Ledo

Salamanca, 2011



VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA

DPTO. BIOLOGÍA  
CELULAR Y PATOLOGÍA



INSTITUTO DE  
NEUROCIENCIAS  
CASTILLA Y LEÓN

LAB. NEUROBIOLOGÍA  
COMPARADA

TESIS DOCTORAL

Desarrollo y diferenciación de las vesículas ópticas en  
condiciones normales y en modelos de ciclopia

Adrián Santos Ledo

2011

VNiVERSiTAS  
STVDII  
SALAMANTIINI  




VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA

DPTO. BIOLOGÍA  
CELULAR Y PATOLOGÍA



INSTITUTO DE  
NEUROCIENCIAS  
CASTILLA Y LEÓN

LAB. NEUROBIOLOGÍA  
COMPARADA

## Desarrollo y diferenciación de las vesículas ópticas en condiciones normales y en modelos de ciclopi

Memoria presentada por Adrián Santos Ledo  
para optar al Título de Doctor Europeo

Adrián Santos Ledo

Salamanca, 2011



VNIVERSIDAD  
D SALAMANCA

DPTO. BIOLOGÍA  
CELULAR Y PATOLOGÍA



INSTITUTO DE  
NEUROCIENCIAS  
CASTILLA Y LEÓN

LAB. NEUROBIOLOGÍA  
COMPARADA

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

HACEN CONSTAR:

Que el presente trabajo titulado “*Desarrollo y diferenciación de las vesículas ópticas en condiciones normales y en modelos de ciclopia*”, ha sido realizado por el licenciado en Biología D. Adrián Santos Ledo en el Departamento de Biología Celular y Patología de la Universidad de Salamanca y en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León.

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

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

Para que así conste, expedimos el presente certificado.

El Director

La Directora

J. Aijón Noguera

M. R. Arévalo Arévalo

*Gedanken ohne Inhalt sind leer,  
Anschauungen ohne Begriffe sind blind*

*(Conceptos sin intuiciones son vacíos,  
intuiciones sin conceptos son ciegas)*

de Immanuel Kant en “Crítica de la  
Razón Pura, La lógica Trascendental”

**A mis padres y  
mi hermano**

---

# Agradecimientos

Es difícil resumir en unas pocas líneas toda la ayuda que he recibido en estos años, sin la cual hubiera sido complicado realizar este trabajo. A todas las personas que me ofrecieron su ayuda, muchas gracias, esta Tesis es suya también.

A mis directores de tesis. Al Prof. Dr. J. Aijón, por las oportunidades que me ha dado en su grupo, por su paciencia y por su interés en mi formación. A la Profa. Dra. R. Arévalo, por haber confiado siempre en mi trabajo y por haber hecho un gran esfuerzo para que fuese lo mejor posible.

A los profesores de Biología Celular. Al Prof. Dr. J. Lara por las discusiones sobre la forma de las células y por sus conocimientos sobre cosas que nadie más sabe. Al Prof. Dr. A. Porteros por las charlas que tanto me han servido. A la Profa. Dra. A. Velasco por haber contado conmigo cuando había que manejar embriones. A la Dra. C. Lillo por el tiempo que ha invertido en ayudarme en el análisis de la citoarquitectura. A los Profes. Dres. E. Weruaga y J. Alonso por echarme una mano siempre que lo necesité.

A Maite porque sin ella buena parte de esta Tesis hubiera sido imposible, por las muchas horas mirando cosas que no sabíamos lo que eran. A mis compañeros de los laboratorios 3, 7 y 10, tanto a los que están como a los que se han ido. En especial a Miguel por haberme ayudado cuando que lo necesité, a Marta por sus consejos de microscopía y a David por haber batallado junto a mí contra el enemigo del becario: la burocracia.

A la Profa. Dra. R. Rodríguez por abrirme las puertas de su laboratorio como si fuera uno más y por su amistad. A Roger y Katy porque siempre dejaban lo que estaban haciendo para ayudarme. A la Dra. V. González por sus buenos consejos y las discusiones sobre desarrollo. A Fátima por ser la voz de la cordura y por tantos cafés horribles.

Al Prof. Dr. S. Wilson por haberme acogido tres años seguidos en su laboratorio, por sus consejos y su ayuda. A todo su laboratorio porque me hicieron sentir como en un segundo hogar. De todos ellos, un agradecimiento muy especial a la Dra. F. Cavodeassi porque algunas de las ideas de esta Tesis son suyas, por el tiempo que ha invertido en mí recibiendo a cambio más preguntas y por su gran

## *Agradecimientos*

---

trabajo con el resumen en inglés. A Diz por preocuparse tanto de mí y haberme solucionado tantos problemas. Al Prof. Dr. M. Tada por la paciencia que ha tenido y su confianza en un proyecto tan complicado como el de las GTPasas y el etanol.

A mis amigos, por su apoyo y por las risas. A los tres calaveras: Meri, David y Jaime, por muchos días que aquí no se pueden contar (algunos entre neblinas). A Alfredito por ser como es: el único de nosotros capaz de mantener la compostura (excepto al hablar de Harry Potter). Al Alija, por las consultas *in extremis*. A Clara, por todas las películas malas y las cervezas buenas. A Diego, porque aún en los momentos difíciles me ofreció un hombro en el que apoyarme. A Vero, por tener siempre tiempo para mí y por saber cómo arrancarme una sonrisa. Al Dr. Arenzana por haberme ayudado tanto, incluso en la distancia. A Ros, por tantas cosas.

A mi familia, por las discusiones, por las comidas y por su cariño constante. A la Pepa por preocuparse siempre por mí sin saber exactamente lo que hago. A mi padre por apoyarme sin fisuras en todas las decisiones. A mi madre por ser el aliento y la fuerza que muchas veces he necesitado y por las recomendaciones literarias que tantas horas de hastío han llenado. A mi hermano, el único Dr. Santos, porque siempre ha sabido qué decir para ayudarme y por haber sido un buen oído para mis quejas (¡Ah, y por los ectos!).

A todos ellos gracias por lo que nos queda por compartir.

Este Trabajo de Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la financiación por parte de proyectos del MICINN (BFU2009-11179) y de la Junta de Castilla y León (Grupo de Excelencia GR-183) y de la beca predoctoral de Formación de Personal Universitario del MICINN.



# Índice

---

<b>Abreviaturas</b>	7
<b>Introducción</b>	11
1.1 Desarrollo temprano	13
1.2 Gastrulación	13
1.2.1 Definición y desarrollo normal	13
1.2.2 La placa precordial	15
1.2.3 El campo morfogénético visual durante la gastrulación	18
1.3 Evaginación de las vesículas ópticas	20
1.3.1 Modelos de evaginación	20
1.3.2 Señalización celular	23
<i>Familia Rx</i>	23
<i>Otx2</i>	24
<i>Pax6</i>	25
<i>Six3</i>	25
<i>Zic2</i>	26
1.3.3 Cambios morfológicos a nivel celular	27
1.3.4 Modelos ciclópeos	28
1.4 Formación de la copa óptica	30
1.5 Áreas visuales: la retina y el techo óptico	32
1.5.1 Estructura de la retina	32
1.5.2 Diferenciación de la retina	34
1.5.3 El techo óptico	35
1.6 Teratogenia etílica	36
1.6.1 Generalidades	36
1.6.2 Etanol y señalización celular	37
<b>Hipótesis y objetivos</b>	41
<b>Material y Métodos</b>	47
3.1 El pez cebra	49
3.2 Mantenimiento y cría de pez cebra	50
3.3 Exposición de los embriones a etanol	51
3.3.1 Efecto del etanol en la migración de la placa precordial	51
3.3.2 Efecto del etanol en la evaginación de las vesículas ópticas	51
3.3.3 Efecto del etanol a largo plazo	52

3.4 Microinyección de RNA y morfolinós	54
3.5 Procesamiento histológico	55
3.5.1 Fijación	55
3.5.2 Seccionamiento en criostato	56
3.5.3 Obtención y tinción de cortes semifinos	56
3.5.4 Obtención de secciones para microscopía electrónica	57
3.6 PCR cuantitativa a tiempo real	57
3.6.1 Homogeneización de embriones y extracción de RNA	57
3.6.2 Obtención de DNAc: retrotranscripción	58
3.6.3 Diseño de cebadores	59
3.6.4 Diseño de la recta patrón	60
3.6.5 QRT-PCR	62
3.7 Hibridación <i>in situ</i>	62
3.7.1 Obtención de ribosondas	63
3.7.2 Protocolo de hibridación <i>in situ</i>	65
3.8 Incorporación de BrdU	67
3.9 Inmunohistoquímica	67
3.9.1 Inmunohistoquímica fluorescente en secciones	67
3.9.2 Inmunohistoquímica <i>in toto</i>	69
3.10 Análisis de imagen	69
3.10.1 Microscopía de campo claro y epifluorescencia	69
3.10.2 Microscopía electrónica	70
3.10.3 Lupa	70
3.10.4 Microscopía confocal	70
3.10.5 Modificación final de las imágenes	70
3.11 Toma de medidas y conteos	71
3.11.1 Medición de la distancia entre núcleos	71
3.11.2 Medición de la migración de la placa precordial	71
3.11.3 Conteo de células	71
3.12 Análisis estadístico	72
<b>Resultados</b>	<b>73</b>
4.1 Efectos del etanol durante la gastrulación	75
4.1.1 Alteración de la migración de la placa precordial	75
4.1.2 Patrón de expresión de <i>snail1a</i>	77
4.1.3 Análisis de la expresión de las GTPasas	79

4.1.4 Modificación de la expresión de las GTPasas	81
4.1.5 Análisis de la unión entre células	83
4.1.6 Resumen	85
<b>4.2 Efectos del etanol sobre la evaginación de las vesículas ópticas</b>	<b>85</b>
4.2.1 Estudio de los patrones de expresión de genes	87
<i>otx2</i>	87
<i>zic2</i>	88
<i>pax6</i>	90
<i>rx3/rx1</i>	92
<i>Six3a</i>	96
4.2.2 Análisis de la citoarquitectura	100
4.2.3 Alteración de la polaridad celular por parte del etanol	109
4.2.4 Resumen	114
<b>4.3 Efectos del etanol a largo plazo</b>	<b>115</b>
4.3.1 Organización inicial de la retina de embriones ciclópeos	115
4.3.2 Nervio óptico	118
4.3.3 Tamaño de la retina y del techo óptico	120
4.3.4 Diferenciación de la retina	121
<i>Zpr1</i>	121
<i>Zpr3</i>	122
<i>TH</i>	122
<i>GS</i>	123
<i>CR</i>	124
<i>Pax6</i>	125
<i>Prox1</i>	126
<i>BrdU</i>	127
4.3.5 Diferenciación del techo óptico	129
<i>TH</i>	129
<i>GS</i>	129
<i>CR</i>	130
<i>Pax6</i>	131
<i>Prox1</i>	132
<i>BrdU</i>	133
4.3.6 Resumen	134
<b>Discusión</b>	<b>137</b>
<b>5.1 Efectos del etanol durante la gastrulación</b>	<b>139</b>

## *Índice*

---

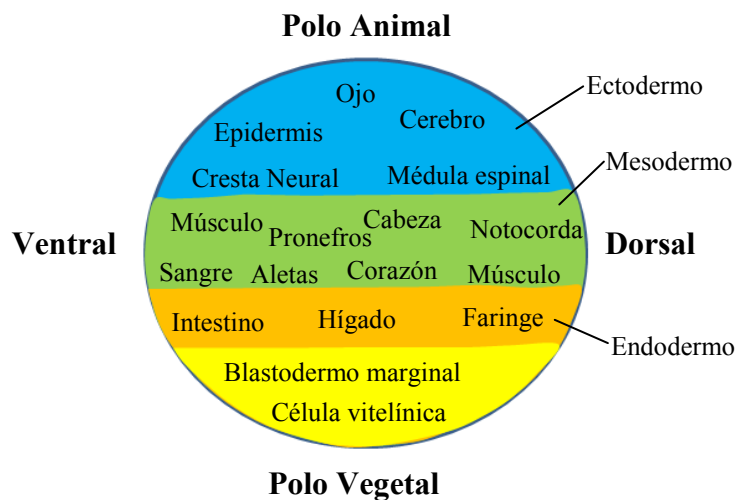
5.2 Alteración de la separación de las vesículas ópticas	147
5.2.1 El etanol altera el patrón de expresión de algunos genes	148
5.2.2 El etanol altera la citoarquitectura del campo visual	153
5.3 Efectos del etanol a largo plazo	158
5.3.1 El etanol altera la formación del nervio óptico	158
5.3.2 Tipos celulares retinianos y etanol	160
5.3.3 Alteraciones en el techo óptico de los ejemplares ciclópeos	163
5.3.4 La proliferación no está alterada en los animales ciclópeos	165
5.3.5 Los embriones ciclópeos se recuperan parcialmente	166
<b>Conclusiones</b>	169
<b>Abstract</b>	173
<b>Bibliografía</b>	205

# Introducción

## 1.1 DESARROLLO TEMPRANO

El desarrollo temprano de un embrión de pez cebra incluye los procesos que van desde la fecundación (hora 0) hasta el estadio de esfera (4 hpf).

Los huevos del pez cebra son telolecíticos, su mayor parte está compuesta por vitelo. Los cigotos sufren una segmentación meroblástica discoidal, sólo la parte de la célula que no tiene vitelo (blastodisco) se divide. Al principio todas las células resultantes mantienen contactos directos entre ellas y con el vitelo, característica que se aprovecha para la inyección de diversas sustancias como morfolinós y RNA. Tras la décima división celular se constituye la blástula (Kane y Kimmel, 1993).



**Fig. 1:** Esquema de un embrión de pez cebra en el estadio de blástula tardía, donde se especifican los destinos celulares (no todos están marcados). (Modificado de Gilbert, 2007).

Después del estadio de blástula tardía y justo antes de que comience la gastrulación, el destino de las células ya está parcialmente fijado (Fig. 1). Con esta información se han trazado mapas en los que se recoge el destino celular (Kimmel *et al.*, 1990).

## 1.2 GASTRULACIÓN

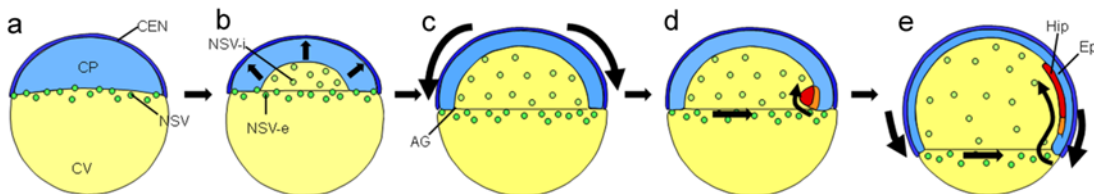
### 1.2.1 Definición y desarrollo normal

La gastrulación es el proceso por el cual las células situadas en el polo animal de la blástula, denominadas en conjunto blastodermo, originan las tres hojas embrionarias y se establecen los ejes del nuevo organismo. En el caso del pez cebra (y en la mayoría de los peces), este proceso comienza con la epibolia, que consiste en la migración descendente de las células alrededor del vitelo (revisado en Betchaku y Trinkaus, 1978). La epibolia se divide en dos partes (Fig. 2) (revisado en Lepage y Bruce, 2010): el primer paso es la transición desde el estadio

## Introducción

de esfera al de cúpula, por un aplanamiento de la capa de células más externa denominada capa de la envoltura (Fig. 2a, b). Este proceso está regulado principalmente por factores maternos y no por la transcripción génica propia del embrión (Kane *et al.*, 1996).

El segundo momento es la progresión de la epibolia (Fig. 2c-e) durante el cual la capa sincitial vitelínica se expande hacia el vitelo, arrastrando en el proceso a la capa de la envoltura debido a que ambas se encuentran unidas por medio de uniones estrechas (*tight junctions*). Ello conlleva la formación de un espacio que se llena por las células del blastodermo (Warga y Kimmel, 1990). Este proceso no parece ser simplemente un acto pasivo sino que las células generan extensiones y se mueven activamente. Durante la epibolia los embriones de pez cebra se catalogan dependiendo del porcentaje de vitelo que ha sido cubierto por el blastodermo (Kimmel *et al.*, 1990). Además, un lado del blastodermo se vuelve sensiblemente más grueso que el otro, esta región es la que va a constituir el dominio dorsal del embrión.



**Fig. 2:** Imágenes esquemáticas de la iniciación (a, b) y la progresión (c-e) de la epibolia. a) En el estadio de esfera se han formado las CEN y las NSV, estando las CP entre ellas. b) Al iniciarse la epibolia tiene lugar la formación de la cúpula y las CP se mueven radialmente. c) Durante la progresión, el blastodermo se expande y se hace más fino envolviendo la CVi. d) Al llegar a 50% epibolia se produce la involución de las células que sufrirán los movimientos de convergencia y extensión. e) La epibolia continúa y el Hip migra anteriormente por debajo del Ep. La placa precordial está pintada de rojo y la notocorda en naranja. AG: anillo germinal; CEN: células de la envoltura; CP: células profundas; CVi: célula del vitelo; Ep: epiblasto; Hip: hipoblasto; NSV: núcleos sincitiales del vitelo; NSV-e: núcleos sincitiales del vitelo externos; NSV-i: núcleos sincitiales del vitelo internos. (Modificado de Lepage y Bruce, 2010).

Al llegar aproximadamente al estadio de 50% epibolia tiene lugar un engrosamiento a lo largo del margen de la capa de la envoltura, que se denomina anillo germinal. En la región dorsal de este anillo se produce un proceso de involución celular dando origen al escudo embrionario. Esta región es funcionalmente equivalente al labio dorsal del organizador de Spemann de anfibios o al nódulo de Hensen de aves y mamíferos.

En la región del escudo embrionario algunas células involucionan individualmente hacia el interior del embrión y constituyen el hipoblasto y las células



que no lo hacen constituyen el epiblasto (Blanco *et al.*, 2007). Las células del hipoblasto convergen hacia la línea media intercalándose unas con otras y, a la vez, se extienden anteriormente, siempre por debajo del epiblasto. Como veremos más adelante, el efecto fundamental del etanol durante la gastrulación es la alteración de estos movimientos que suceden durante la misma.

Las primeras células del hipoblasto en involucrar forman el mesodermo precordial que es el precursor de la placa precordial; las siguientes en involucrar formarán el cordamesodermo, precursor de la notocorda. Las células adyacentes al cordamesodermo constituyen el mesodermo paraxial, responsable de la liberación de ácido retinoico que es el inductor de la polaridad antero-posterior del Sistema Nervioso Central (SNC).

Durante todo el proceso tienen vital importancia el citoesqueleto del vitelo y la regulación de su estabilidad. La polimerización y despolimerización de los microtúbulos mediante los niveles intracelulares de calcio es importante en la iniciación de la epibolia (Ebert *et al.*, 2008) y también en su progresión. Por su parte, los filamentos de actina juegan un papel predominante en la progresión de la epibolia (Cheng *et al.*, 2004).

### 1.2.2 La placa precordial

Durante la gastrulación las células de la placa precordial migran tanto individualmente como en grupo hacia el polo animal de la gástrula, utilizando el epiblasto como sustrato. La placa precordial es un potente inductor neural, implicado en la formación del prosencéfalo mediante la liberación de morfógenos como Shh, Nodal y BMPs (revisado en Kiecker y Niehrs, 2001). Posteriormente se diferenciará dando lugar al endomesodermo orofaríngeo, al mesénquima de la cabeza, a los músculos de la cabeza y los ojos, y a la glándula de eclosión.

En la formación de la placa precordial están implicadas varias vías de señalización celular, entre las que cabe destacar un gradiente de Nodal (Gritsman *et al.*, 2000) y las señales dependientes de la Catenina- $\beta$  materna (revisado en Harland y Gerhart, 1997). Sin embargo, en etapas posteriores para que se mantenga el mesodermo precordial, la señalización Nodal es inhibida por Cerberus (Piccolo *et al.*, 1999). Una vez constituida la placa precordial, ésta se caracteriza por

## Introducción

---

la expresión de *goosoid* (en toda su extensión), *hgg1* (placa precordal anterior) y *hlx1* (placa precordal posterior) (Kai *et al.*, 2008).

La cohesión de las células de la placa precordal es muy importante para que tenga lugar la migración, y está regulada, entre otros factores, por la proteína de adhesión Cadherina-E (revisado en Lepage y Bruce, 2010), la que a su vez está controlada por Wnt11 (Ulrich *et al.*, 2005) y por los genes *snail* (Blanco *et al.*, 2007). Otras moléculas importantes en la migración de la placa precordal, y en general en la gastrulación, son la familia de pequeñas GTPasas Rho, que se describen más adelante.

De todos los procesos que tienen lugar durante la gastrulación, uno de los más importantes son los movimientos de convergencia y extensión. Estos movimientos fueron descritos en *Xenopus* (Keller *et al.*, 1985) y se producen cuando un conjunto de células convergen latero-medialmente (convergencia) y simultáneamente se extienden en el eje antero-posterior (extensión). Este fenómeno está regulado por la ruta de Polaridad Celular Planar (PCP) y por la ruta no canónica de la familia Wnt (revisado en Tada y Kai, 2009). Estas dos rutas actúan de manera simultánea en aquellos procesos en los que se requiere una coordinación conjunta de la polaridad y la cohesión celular, como por ejemplo los movimientos de convergencia y extensión, el cierre del tubo neural, la ciliogénesis y la migración de las neuronas del rombencéfalo.

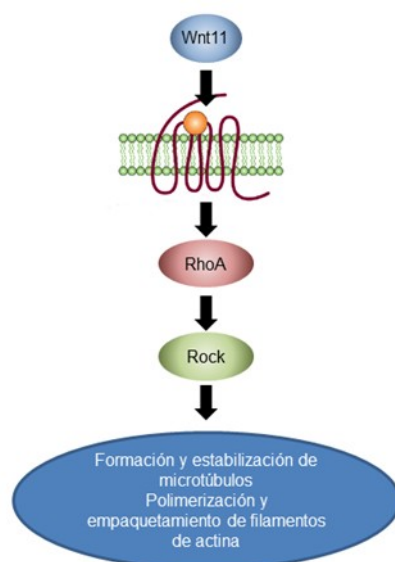
Dentro de la vía de señalización Wnt/PCP hay multitud de efectores, reguladores y activadores, de los cuales sólo unos pocos son comunes a varias especies, mientras que los demás son específicos de cada una. Sin embargo, el fundamento de esta vía está ampliamente conservado. Uno de los reguladores común para todas las especies es Disheveled (Dsh) que es el factor clave en todo el proceso (Axelrod *et al.*, 1998). Dentro de la familia Wnt, los dos reguladores más importantes son Wnt5a/b y Wnt11, cuya función es redundante pero la realizan a través de distintas cascadas de señalización intracelular. Así, Wnt5a/b actúa a través de la Quinasa Jun N-terminal (Yamanaka *et al.*, 2002), mientras que Wnt11 lo hace por medio de RhoA/Rok (Marlow *et al.*, 2002).

En el pez cebra, la alteración de la señalización de la placa precordal como por ejemplo en los mutantes *one-eye pinhead*, *cyclops* o *squint* conduce a fallos en

la especificación del SNC, entre los que se incluye la ciclopia (Gritsman *et al.*, 1999). Esto no sólo sucede en pez cebra sino que la eliminación total de la placa precordial induce fenotipos ciclópeos en pollo y *Xenopus* (Li *et al.*, 1997). Sin embargo, no se conoce muy bien cómo está relacionada la placa precordial con la evaginación de las vesículas ópticas.

En la presente Tesis Doctoral estudiaremos el papel de las pequeñas GTPasas RhoA y Rnd1/like y los factores de transcripción Snail, por lo que los describiremos con más detalle.

RhoA y Rnd1/like son pequeñas GTPasas Rho que pertenecen a la superfamilia Ras, las cuales son enzimas capaces de hidrolizar una molécula de GTP a GDP. En general estas enzimas son pequeñas (190-250 aminoácidos) e incluyen un dominio GTPasa tipo Rho y se encuentran activas cuando están unidas a GTP e inactivas cuando lo están a GDP. En la regulación de la actividad enzimática tienen especial importancia activadores, inhibidores e intercambiadores de nucleótidos de guanina (revisado en Wennerberg y Der, 2004), así como la localización celular y el control transcripcional.



**Fig. 3:** Vía de señalización celular de RhoA.

La actividad de RhoA es inducida por la ruta Wnt/PCP (Fig. 3) (Zhu *et al.*, 2006). RhoA está implicada en la inducción de la formación de adhesiones focales y el ensamblaje de fibras de estrés (Ridley y Hall, 1992), lo que implica controlar en gran medida la polaridad, motilidad, adhesión y migración celular, así como la regulación transcripcional y la división celular (Etienne-Manneville y Hall, 2002). Durante la gastrulación del pez cebra, RhoA regula los movimientos de la placa precordial por medio de la proteína ROCK y el homólogo de *Diaphanus* (Dia) (Matsui *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2006).

La inyección del morfolino de RhoA en embriones de pez cebra provoca alteraciones en los movimientos de la placa precordial parecidas a las que suceden tras la exposición a etanol (Zhu *et al.*, 2006). Aunque la ausencia de RhoA no llega

## Introducción

---

a inducir la formación de organismos ciclópeos, su inyección es capaz de rescatar los fenotipos ciclópeos inducidos por la ausencia de Wnt11 (Zhu *et al.*, 2006).

Rnd1 y Rnd1like pertenecen al subgrupo de Rnd. Se considera que son deficientes en su actividad GTPasa y no son estables unidas a GDP, por lo que siempre están unidas a GTP y, por tanto, siempre activas (revisado en Wennerberg y Der, 2004). Por ello, el control transcripcional y las modificaciones postraduccionales son, si cabe, más importantes en estas enzimas que en las demás de la familia (revisado en Riou *et al.*, 2010). Se las considera antagonistas de RhoA y disminuyen la polimerización de filamentos de actina e inhiben la formación de adhesiones focales. Ello conduce, finalmente, a la pérdida de adhesión a la matriz extracelular y la despolarización de las células (Nobes *et al.*, 1998; Wünnenberg-Stapleton *et al.*, 1999). Se sabe que Rnd1 interviene directamente en la formación y estabilización de dendritas de mamíferos (Yoshihara *et al.*, 2009) y en *Xenopus* regula la somitogénesis (Goda *et al.*, 2009).

Las proteínas Snail son factores de transcripción con dominios en dedos de Zn que están implicados en procesos que requieren grandes movimientos. Estas proteínas juegan un papel fundamental en el proceso de transición de célula epitelial a célula mesenquimal (TEM), que también está implicado en procesos tumorales (revisado en Nieto, 2002). Durante la gastrulación Snail1a y Snail1b dirigen de forma no redundante la migración del mesodermo axial (Blanco *et al.*, 2007). Así, *snail1a* se expresa en el anillo germinal durante la epibolia y en las células adaxiales que están a ambos lados de la notocorda (Blanco *et al.*, 2007). Para la correcta migración de la placa precordial Snail1 contrarresta la función de Cdh1 (Montero *et al.*, 2005). De hecho, en los embriones inyectados con el morfolino de *snail1a* la placa precordial se forma en una posición anómala y se dificulta en gran medida su migración (Yamashita *et al.*, 2004; Blanco *et al.*, 2007). Snail1a no interviene en la formación de la placa precordial, pero es un inductor del movimiento de las células situadas en la región más anterior a ésta (revisado en Barrallo-Gimeno y Nieto, 2005; Blanco *et al.*, 2007).

### 1.2.3 El campo morfogénico visual durante la gastrulación

Como ya vimos anteriormente, antes de la gastrulación están definidos la

mayoría de los campos morfogénéticos del embrión; y los mecanismos moleculares sobre su establecimiento están siendo estudiados ampliamente en la actualidad. El campo visual se encuentra situado en la placa neural anterior que también dará lugar al telencéfalo, el diencefalo y el hipotálamo. La placa neural anterior se origina cuando al progresar la epibolia, el anillo germinal, fuente de factores caudalizantes (como Wnts y ácido retinoico), va quedando alejado de la región dorsal (revisado en Wilson y Houart, 2004). Además, al migrar anteriormente la placa precordal libera antagonistas de los factores caudalizantes (como Shh). Hay que tener en cuenta que en un primer momento todas las células de la placa neural anterior están mezcladas y se necesita un reordenamiento de las mismas. Este posicionamiento, al menos en *Xenopus*, parece estar mediado por la interacción de las proteínas FGF y las Efrinas (Moore *et al.*, 2004).

Durante la especificación temprana del campo visual también es importante el antagonismo entre las rutas canónica y no canónica de Wnt (de Longh *et al.*, 2006). La ruta canónica (activación del receptor Fz8 por Wnt8) regula la formación del diencefalo, mientras que la no canónica (activación del receptor Fz5 por Wnt11) promueve la formación del campo visual inhibiendo la ruta canónica (Cavodeassi *et al.*, 2005). Sin embargo, el proceso es más complejo ya que los patrones de expresión de los genes mencionados, así como de los agonistas y antagonistas que modulan la actividad del receptor, se superponen parcialmente, lo que dificulta la asignación de papeles concretos en el proceso global de especificación del campo visual. Mutantes de pez cebra para los genes de la familia Wnt, como los *headless* (Kim *et al.*, 2000) y los *masterblind* (Heisenberg *et al.*, 2001), carecen de ojos o, incluso, de cabeza. También en pez cebra se han descrito otros genes muy importantes para la formación del campo visual como *six3* y la familia Rx. Defectos en la expresión de estos genes conducen a alteraciones en la formación de los ojos o incluso a la ausencia de los mismos (Tucker *et al.*, 2001; Lagutin *et al.*, 2003).

Para la adquisición de cierta competencia por parte de las células del campo visual, y que se diferencien del resto del telencéfalo, en teleósteos es necesaria la expresión diferencial de una serie de factores de transcripción como Pax6, Otx2 y la familia Rx (Kenyon *et al.*, 2001). Estos factores están presentes durante mucho tiempo en el campo visual y también intervienen de alguna manera en la

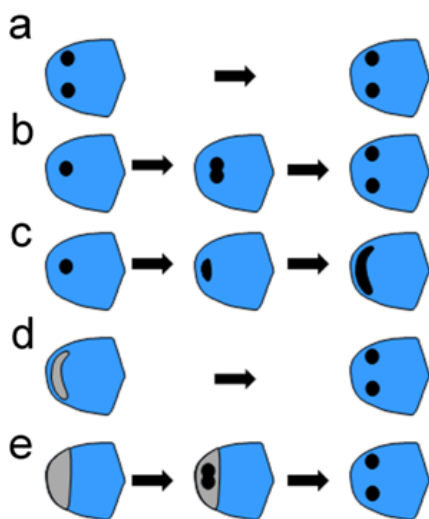
evaginación de las vesículas ópticas y en la diferenciación de las células retinianas, como veremos más adelante.

### 1.3 EVAGINACIÓN DE LAS VESÍCULAS ÓPTICAS

#### 1.3.1 Modelos de evaginación

La evaginación de las vesículas ópticas es el proceso por el cual un único campo morfogénico da lugar a dos dominios simétricos; es decir, el fenómeno por el cual este campo origina los dos primordios ópticos. Este proceso se ha estudiado en diversas especies durante mucho tiempo pero todavía no se conoce en profundidad. De hecho, hasta los años 90 no se pudo demostrar con claridad que, durante el desarrollo, un único campo visual se divide en dos, ya que se pensaba que cada vesícula se formaba de un campo independiente (Li *et al.*, 1997).

Para el estudio de la evaginación de las vesículas ópticas se han utilizado modelos ciclópeos que, en cierta medida, han contribuido a aumentar la controversia. De hecho, en el siglo XIX se propuso que la ciclopia era consecuencia de la fusión de dos campos visuales y sólo algunos autores defendían que se debía a la ausencia de la separación del mismo (revisado en Adelman, 1936).



**Fig.4:** Esquema de los modelos de formación de las vesículas ópticas. Los modelos fueron propuestos en distintos momentos por Spemann (a), Stockard (b), Le Plat (c), Adelman (d) y Nieuwkoop (e). (Modificado de Li *et al.*, 1997).

De todas las teorías que se propusieron destacan las siguientes que hemos resumido en la Fig.4: Spemann defendía que había dos primordios de vesículas ópticas en la placa neural (Spemann, 1938); Stockard postulaba la existencia de un único campo que se dividía en dos (Stockard, 1914); el modelo de Le Plat era similar al anterior pero dicho dominio también incluía el quiasma óptico y no sólo las vesículas (Le Plat, 1919); Adelman proponía un modelo similar a los anteriores aunque suponía que tanto las regiones centrales como las laterales del campo visual podían originar las vesículas ópticas (Adelman, 1929). Estudios posteriores

demonstraron que explantes de telencéfalo daban lugar a vesículas ópticas, aunque en este último modelo también se incluyó el movimiento celular como parte del proceso (revisado en Nieuwkoop *et al.*, 1985).

La evaginación de las vesículas ópticas es un proceso muy difícil de estudiar ya que sucede muy rápido y a la vez que la neurulación, lo que dificulta la extrapolación de los datos exclusivos del campo visual. La evaginación de las vesículas ópticas comienza, aproximadamente, en el estadio de 3 somitos, cuando el dominio del campo visual adquiere forma bilobulada. El campo visual se encuentra limitado posteriormente por el primordio del hipotálamo y el pedúnculo óptico, anteriormente por el telencéfalo y también por células del pedúnculo óptico, y en la periferia por células del diencefalo (England *et al.*, 2006). Esta disposición es muy importante ya que, en etapas posteriores se invertirá parcialmente y el hipotálamo acabará situado entre las vesículas ópticas y un poco anterior a ellas.

En un primer momento se pensó que el desplazamiento anterior del hipotálamo dividía el campo visual en dos (Varga *et al.*, 1999). Sin embargo, esto no parece plausible, ya que justo antes de la neurulación, se produce una contracción de la parte posterior de la placa neural anterior, justo en el límite anterior del primordio del hipotálamo, que va a dar lugar a la formación de una quilla (England *et al.*, 2006) (Fig. 5). Por tanto, el hipotálamo no divide el campo visual en dos, sino que se desplaza por debajo del mismo para finalmente emerger en posición anterior al telencéfalo. Lo que sí se consigue durante este proceso es arrastrar a las células más posteriores del campo visual que comienza a plegarse. Simultáneamente, el telencéfalo y las células más anteriores del campo visual se pliegan hacia la línea media, lo que hace que se sitúen dorsalmente a las células más posteriores del campo visual. Todos estos procesos generan las fuerzas necesarias para que comience la evaginación.

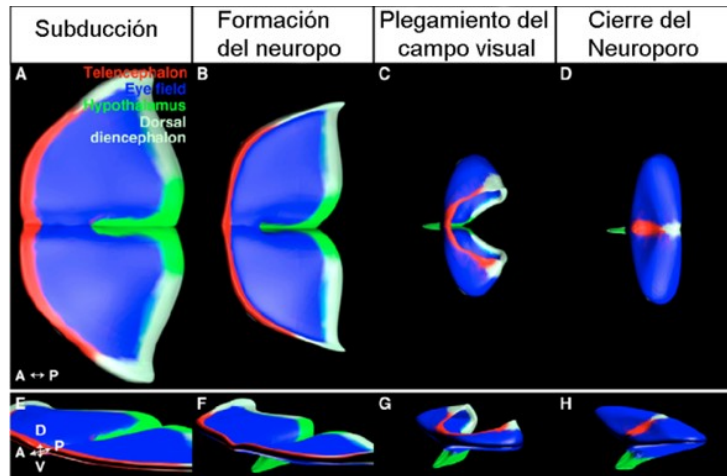
Según England *et al.*, (2006), la evaginación se produce por dos movimientos:

1. El diencefalo dorsal se introduce hacia adelante empujando el campo visual y el pedúnculo óptico.
2. Las células del telencéfalo se dirigen al neuroporo anterior para sellarlo y

## Introducción

las células de la línea media del campo visual se dirigen hacia las regiones laterales para ocupar el espacio libre.

**Fig. 5: Modelo de evaginación de las vesículas ópticas.** (A-D) Vista dorsal. (E-H) Vista oblicua. A, E). El hipotálamo se desplaza anteriormente por debajo del campo visual. B, F) los laterales de la placa neural se pliegan formando el neuroporo. C, G) La evaginación de las vesículas comienza al converger el diencefalo hacia la quilla neural y desplazarse anteriormente. D, H) La unión de las dos mitades del telencefalo completa el pliegue del campo visual y cierra el neuroporo. (Extraído de England *et al.*, 2006).

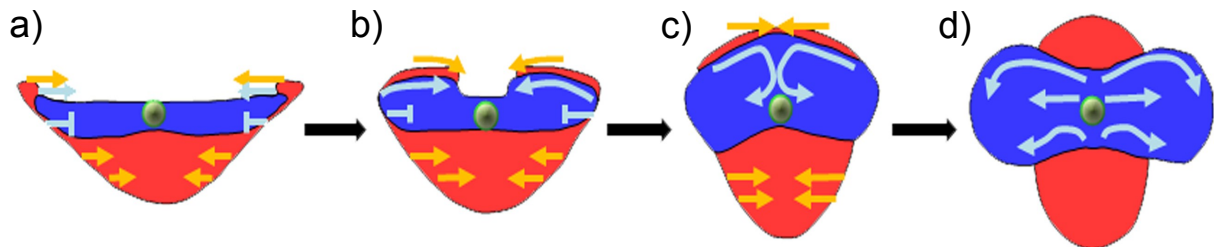


Quizás el dato más importante que se puede extraer del trabajo de England *et al.* (2006) y de sus experimentos con mutantes *cyclops*, es la exclusión de un posible mecanismo intrínseco al campo visual como podría ser la capacidad motora de las células que lo componen. Según estos autores, la evaginación se debe a fuerzas generadas por otros dominios, que acaban arrastrando a las células del campo visual a sus posiciones laterales finales. Sin embargo, no todos los autores apoyan esta teoría.

Rembold *et al.* (2006) postularon que la evaginación de las vesículas ópticas es consecuencia directa de la migración activa de los progenitores retinianos, proceso regulado por los genes de la familia Rx (Fig. 6) y que comienza antes de que se forme la quilla neural como se ha descrito que ocurre en roedores (Morse y McCann, 1984; Svoboda y O'Shea, 1987). Según estos autores los progenitores ventro-mediales permanecen inmóviles al principio del proceso, mientras que los progenitores situados en la región central convergen hacia la línea media. Este proceso lo realizan en dos movimientos, primero se hunden ventralmente y luego se dirigen hacia las regiones laterales de las vesículas ópticas. Durante este movimiento los progenitores retinianos extienden filopodios y lamelipodios, elongándose y retrayéndose, lo cual, según Rembold *et al.* (2006), demuestra la migración activa de estas células, tanto durante la convergencia hacia la línea media como durante la evaginación y separación final de las vesículas ópticas. Según este modelo una señal procedente del neuroectodermo regularía la



convergencia de las células Rx3 positivas hacia la línea media y esta misma señal u otra regularían la evaginación tal y como ocurre en otros procesos, como por ejemplo durante la gastrulación en *Xenopus* (Elul y Keller, 2000; Ezin *et al.*, 2006).



**Fig. 6: Modelo de evaginación de las vesículas ópticas.** Los movimientos contrapuestos del telencéfalo y de las células del campo visual (las ventromediales no se mueven pero sí las más laterales) producen su agrandamiento (a). Las células laterales del campo visual convergen hacia la línea media y se empiezan a formar las vesículas ópticas (b, c). Por último todas las células mediales se desplazan hacia las regiones laterales produciendo la evaginación (d). Una o varias señales hipotéticas (círculo verde) controlarían el proceso. En azul se representa el campo visual y en rojo el telencéfalo y el diencefalo. (Modificado de Rembold *et al.*, 2006).

### 1.3.2 Señalización celular

Las redes de señalización celular que regulan el proceso de evaginación del campo visual han sido poco estudiadas. Se conocen los genes implicados en la especificación del campo visual y que estos genes continúan expresándose durante la evaginación y están mutados en casos en los que ésta falla, por tanto se entiende que también juegan un papel en dicho proceso (Fig. 7). Además, todos ellos se han descrito como parte de una mezcla de factores de transcripción capaz de producir la aparición de ojos ectópicos (Zuber *et al.*, 2003)

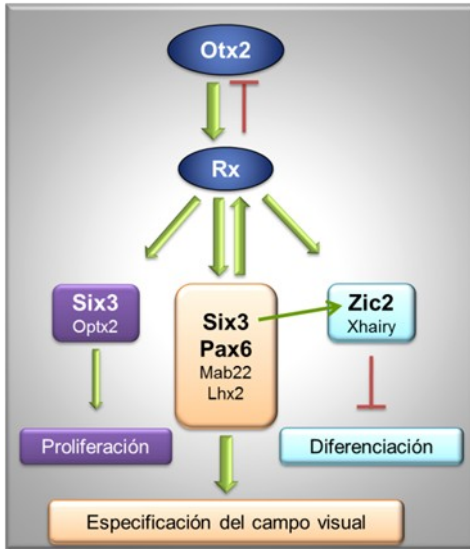
#### Familia Rx

Los factores de transcripción Rx fueron identificados en librerías de DNAC de *Xenopus* (Jamrich *et al.*, 1989). En pez cebra, se han identificado tres genes de esta familia: *rx1*, *rx2* y *rx3* (Mathers *et al.*, 1997).

*rx3* es el primero en expresarse y lo hace en la región anterior de la placa neural, dominio que incluye el campo visual y el diencefalo ventral (Chuang *et al.*, 1999). *rx3* se expresa desde el estadio de blástula hasta el de 10 somitos. A partir de este estadio su expresión decae en el interior del campo visual, aunque se conserva en el hipotálamo. La expresión de *rx3* en las vesículas ópticas es sustituida por *rx1/2* (Chuang *et al.*, 1999). *rx3* vuelve a expresarse en la capa nuclear interna (CNI) de la retina, y se ha descrito que modula la diferenciación de

## Introducción

las células bipolares (Chuang *et al.*, 1999).



**Fig. 7:** Posible red de transducción de *rx*. (Datos extraídos de Bailey *et al.*, 2004; Gestri *et al.*, 2005).

En ratón sólo se ha descrito un gen *rx* y su mutación conduce a casos graves de anoftalmia y sinoftalmia (Mathers *et al.*, 1997), incluso los ratones hipomórficos para *rx* desarrollan sinoftalmia y problemas en los ritmos circadianos (Tucker *et al.*, 2001). En pez cebra y medaka hay dos mutantes de *rx3*: mutantes *chokh* (*chk*) y *eyeless* (*eyl*), respectivamente (Winkler *et al.*, 2000; Kennedy *et al.*, 2004). En ambos casos ni siquiera comienza la evaginación de las vesículas ópticas y estas no se forman, por lo que se entiende que *Rx3* juega un papel fundamental en la morfogénesis visual.

En estos mutantes, las células del campo visual se acumulan en las paredes laterales del prosencéfalo, donde se observa gran cantidad de células apoptóticas (Winkler *et al.*, 2000). Sin embargo, no está claro si es esta muerte celular la responsable de la ausencia de vesículas ópticas o es que las células se diferencian a diencefalo o telencefalo.

La sobreexpresión de *rx1* y *rx2* induce la transformación del telencefalo en retina, por lo que termina apareciendo un tercer ojo (Chuang y Raymond, 2001). Se ha propuesto también que estos genes intervienen en los movimientos celulares responsables de la evaginación de las vesículas ópticas, aunque mediante un mecanismo desconocido (Chuang y Raymond, 2001). En etapas posteriores juegan un papel algo distinto ya que *Rx1* mantiene el estado pluripotencial de las células retinianas y, sin embargo, *Rx2* estimula su diferenciación por medio del aumento de la expresión de *pax6* (Nelson *et al.*, 2009). Además, los dos son los primeros marcadores específicos de conos (Chuang *et al.*, 1999).

### Otx2

El estudio de *otx2* es especialmente difícil ya que la eliminación de su expresión mediante morfolinós induce la desaparición del cerebro anterior y medio (Acampora *et al.*, 1995). En condiciones normales este gen se expresa desde el

estadio de gástrula en la parte anterior del embrión, pero durante la evaginación de las vesículas ópticas es reprimido por la sobreexpresión de *rx* y *pax6* (Mori *et al.*, 1994; Andreazzoli *et al.*, 1999). Su expresión se mantiene en los límites del campo visual, región que dará lugar al epitelio pigmentario (Martínez-Morales *et al.*, 2003).

Otx2, junto con Pax6 y Rx, regula la diferenciación de los neuroblastos indiferenciados de la placa neural hasta progenitores retinianos, incluyendo los movimientos celulares de estos últimos que sólo se realizan cuando pueden responder a estímulos neuronales (Kenyon *et al.*, 2001).

### Pax6

Pax6 es un factor de transcripción estrechamente ligado a la formación del sistema visual, desde el desarrollo más temprano hasta la retina adulta. Se han propuesto algunas teorías según las cuales Pax6 no sólo actuaría como factor de transcripción sino también como morfógeno, siendo necesaria su liberación para regular la diferenciación de células adyacentes (Lesaffre *et al.*, 2007). Además, se le ha relacionado con multitud de enfermedades visuales como aniridia, microftalmia, anoftalmia, cataratas o incluso con otras como autismo y retraso mental (revisado en Hever *et al.*, 2006).

Pax6 está más implicado en la regulación de la proliferación celular y en la inducción de la expresión de genes de diferenciación en los tipos celulares retinianos que en el proceso de división del campo visual *per se* (Zaghloul y Moody, 2007) y tiene un papel fundamental en la formación del pedúnculo óptico. Se ha descrito que tras la evaginación, una hipotética señal procedente de la línea media reduciría la expresión de *pax6* y aumentaría la de *pax2*, lo que induciría la formación del pedúnculo óptico. En los mutantes *cyclops* dicha señal no está presente y por lo tanto el tejido de los pedúnculos ópticos no aparece y las vesículas ópticas permanecen fusionadas (Macdonald *et al.*, 1995).

### Six3

*six3* es otro de los genes que se expresan durante gran parte del desarrollo y diferenciación de la retina. Aunque su papel exacto en la morfogénesis del campo visual no se conoce, se sabe que regula el tamaño de las vesículas ópticas (López-Ríos *et al.*, 2003) mediante la activación del ciclo celular (Gestri *et al.*, 2005). *six3*

## *Introducción*

---

se expresa en la placa neural anterior y mantiene su expresión en las vesículas ópticas durante la evaginación de las mismas (Bovolenta *et al.*, 1998). La actividad represora de Six3 sobre los genes *wnt* es fundamental para la formación del cerebro anterior (Lagutin *et al.*, 2003).

Mutaciones en el gen *six3* están directamente relacionadas con alteraciones en el desarrollo de las vesículas ópticas. En humanos, por ejemplo, se ha relacionado a este gen con la aparición de casos de holoprosencefalia, incluyendo fenotipos ciclópeos (Wallis *et al.*, 1999; Pasquier *et al.*, 2000). Hay que tener en cuenta que holoprosencefalia es la fusión de los dos hemisferios cerebrales y puede ir o no acompañada de ciclopia. El mecanismo a través del cual Six3 produce estas alteraciones se desconoce; sin embargo se sabe que regula la expresión de *shh*, morfógeno importante en la determinación de la línea media (Geng *et al.*, 2008). La ausencia de Shh (que es producido por la placa precordial) también está relacionada con la aparición de holoprosencefalia y ciclopia en ratones y humanos (Gripp *et al.*, 2000). Sin embargo, en el pez cebra esta relación no es tan clara (Blader y Strähle, 1998; Schauerte *et al.*, 1998).

### *Zic2*

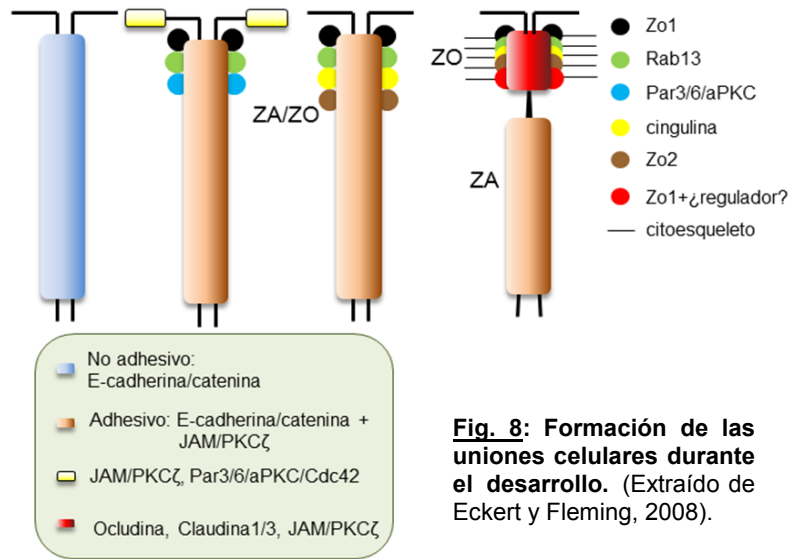
Zic2 pertenece a una familia de factores de transcripción que presentan dedos de Zn como dominio de unión al DNA. Al final de la epibolia se expresa en el ectodermo dorsolateral y, tras el cierre del tubo neural, en varios dominios de la región dorsal del embrión incluyendo el prosencéfalo y la separación entre mesencéfalo y rombencéfalo (Toyama *et al.*, 2004). La expresión de *zic2* está fuertemente regulada por Six3 (Gestri *et al.*, 2005). Zic2 es un potenciador de la proliferación celular y un inhibidor de la diferenciación, manteniendo la pluripotencialidad celular (Dodou *et al.*, 2004; Brown y Brown, 2009). Interviene en el establecimiento del eje antero-posterior del cerebro y también del eje dorso-ventral del organismo (Nagai *et al.*, 1997), con una función claramente dorsalizante (Dodou *et al.*, 2004). Además, regula la localización apical de Actina-F, la activación de Miosina II y la integridad de las uniones celulares (Nyholm *et al.*, 2009).

Al igual que *six3*, mutaciones en *zic2* en humanos están relacionadas con holoprosencefalia (Brown *et al.*, 1998) y también con defectos en el cierre del tubo neural como espina bífida y anencefalia (Nagai *et al.*, 1997).

### 1.3.3 Cambios morfológicos a nivel celular

La forma de las células no es un factor constante a lo largo del tiempo, sino que cambia dependiendo de multitud de factores. Son bien conocidas las diferenciaciones celulares tales como filopodios o lamelipodios, importantes no sólo para que una célula se desplace sino también para la formación del cono de crecimiento. La formación de diferenciaciones celulares y los cambios de forma celular que se producen durante el desarrollo, necesitan una compleja red de proteínas que transmita la información desde el exterior de la célula hasta el núcleo. Entre ellas se encuentran las proteínas Zo, pertenecientes a la familia de las guanilato ciclasas asociadas a membrana (MAGUK) (revisado en Bauer *et al.*, 2010). En un primer momento se describió a las proteínas Zo como parte del andamiaje de las uniones celulares de tipo zónulas ocluyentes (Anderson *et al.*, 1988), pero posteriormente también se encontraron en las zónulas adherentes (Howarth *et al.*, 1992) y en las uniones GAP (Kausalya *et al.*, 2001; revisado en Steed *et al.*, 2010).

Las proteínas Zo presentan una función dual ya que no sólo forman parte del entramado de las uniones celulares sino que son mensajeros intracelulares que regulan la actividad de numerosas proteínas, como por ejemplo las Rho GTPasas (Anastasiadis y Reynolds, 2001). Además, las proteínas Zo tienen dominios de exportación e importación al núcleo, lo que les permite modular directamente la transcripción génica (Gottardi *et al.*, 1996). La formación de las uniones celulares coincide con la polarización de las células, fenómeno requerido en multitud de procesos durante el desarrollo, como por ejemplo la gastrulación y, posiblemente, la división del campo visual. Se ha estudiado intensamente cómo se forman las primeras uniones celulares y parece que son las proteínas Par las que inician todo el proceso de reclutamiento de las diversas proteínas que las componen (Fig. 8; revisado en Eckert y Fleming, 2008). Tras el ensamblaje de Par3 se unen muchas más proteínas entre las que se incluye Zo1, sin cuya unión no se pueden formar las zónulas ocluyentes (Umeda *et al.*, 2006). Por otra parte se ha comprobado que la ausencia de Zo1 conlleva la muerte prematura de embriones de ratón (Katsuno *et al.*, 2008).



## 1.3.4 Modelos ciclópeos

En pez cebra hay varios mutantes que desarrollan ciclopia y que han sido utilizados para analizar no sólo la evaginación de las vesículas ópticas sino también la gastrulación, la diferenciación de la retina y el establecimiento del eje anterior del organismo. Hay que tener en cuenta que la ausencia de *rx3* en pez cebra y medaka o de *rx* en ratón (Mathers *et al.*, 1997; Winkler *et al.*, 2000; Kennedy *et al.*, 2004) no conduce a ciclopia sino a una falta total de la evaginación y de la separación de las vesículas ópticas. En consecuencia, el campo visual desaparece y surgen fenotipos anoftálmicos.

A continuación exponemos los modelos ciclópeos más utilizados exceptuando los inducidos por etanol, de los cuales hablamos más tarde. En todos ellos se inicia la evaginación de las vesículas ópticas pero éstas no terminan separándose por diversas causas. Por ello, estos modelos son más similares a los obtenidos por exposición a etanol donde, en la mayoría de los embriones la evaginación también comienza, aunque al final sólo se observa una única vesícula óptica.

- Mutantes *Cyclops* (*cyc*): El gen *cyclops* codifica para un gen nodal llamado *nrd2* que se engloba dentro de la familia TGFβ (Sampath *et al.*, 1998). Este gen está implicado en la regionalización próximo-distal del embrión (Rebaglianti *et al.*, 1998). De todos los mutantes, quizás este ha sido el

más utilizado. En estos mutantes, el campo visual está correctamente especificado pero no se induce el tejido hipotalámico (England *et al.*, 2006). Esta deficiencia en la inducción, produce una alteración en los movimientos normales del telencéfalo y el diencéfalo. En consecuencia, las fuerzas generadas inician la evaginación pero no se culmina la separación de las vesículas ópticas. El tejido que permanece entre las dos vesículas no recibe las señales adecuadas para transformarse en pedúnculo óptico (MacDonald *et al.*, 1995) y se diferencia a retina, presentando gran cantidad de fotorreceptores formando estructuras en roseta (Fulwiler *et al.*, 1997).

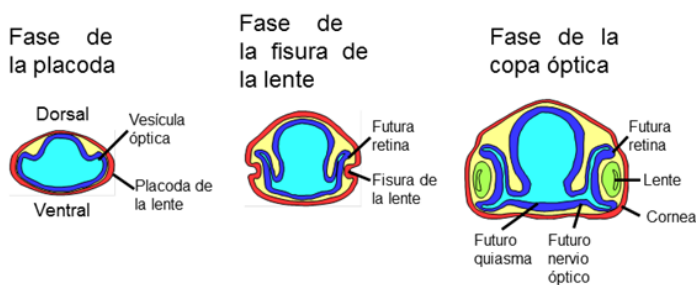
- Mutantes *squint (squ)*: Squint es otra proteína relacionada con nodal y perteneciente a la superfamilia TGF $\beta$  (Feldman *et al.*, 1998). Por tanto, el origen de la ciclopia en estos mutantes podría ser parecido al de los mutantes *cyc*, aunque no se conoce con detalle.
- Mutantes *one-eye pinhead (oep)*: La proteína Oep presenta herencia materna y se encuentra presente en el cigoto antes de que se inicie la transcripción del genoma del embrión. Es muy importante durante la gastrulación (Hammerschmidt *et al.*, 1996) y en su ausencia las células marginales no se internalizan correctamente (Carmany-Rampey y Schier, 2001). No se conoce bien cómo la ausencia de Oep induce ciclopia, aunque los problemas ocasionados durante la gastrulación son similares a los de mutantes *cyc*. Se ha descrito que actúa como cofactor de la señalización TGF $\beta$ /nodal (Gritsman *et al.*, 1999). Por otro lado, de manera independiente a la señalización antes mencionada, reprime la actividad de algunas GTPasas (Pézeron *et al.*, 2008) y también regula la motilidad y adhesión celular (Warga y Kane, 2003).
- Mutantes *silberblick (sbl)*: *sbl* codifica para la proteína Wnt11 (Heisenberg *et al.*, 2000). Estos mutantes presentan defectos en los movimientos de convergencia y extensión, que conducen a un prosencéfalo más ancho y corto (Heisenber *et al.*, 1996). En este caso el movimiento anterior de la quilla neural está muy reducido y, por tanto, el campo visual y el hipotálamo permanecen debajo de ella y éste último nunca llega a emerger

anteriormente al campo visual. En consecuencia, las células posteriores y mediales del campo visual, las que originan el pedúnculo óptico, quedan en una posición medial (England *et al.*, 2006). De esta manera, la ciclopia de los mutantes *cyc* y *sbl* se origina de dos maneras totalmente distintas. Los mutantes *sbl* no presentan una ciclopia total como los *cyc* o los *oep*, sino que presentan las vesículas parcialmente fusionadas, fenotipo que en ocasiones se denomina sinoftalmia (Heisenberg *et al.*, 1996).

- Mutantes *trilobite (tlb)*: Este gen se corresponde con *vang-like 2* y es un regulador importante de los movimientos de convergencia y extensión que suceden durante la gastrulación (Hammerschmidt *et al.*, 1996; Marlow *et al.*, 1998). Estos animales presentan varias mutaciones que originan distintos grados de ciclopia, que van desde una reducción del espacio que queda entre las vesículas ópticas hasta una ciclopia total, pasando por distintos grados de sinoftalmia (Marlow *et al.*, 1998). El origen de la ciclopia de estos mutantes se ha atribuido a una incorrecta posición de las células que liberan Shh, posiblemente debido a fallos durante la gastrulación (Marlow *et al.*, 1998).

## 1.4 FORMACIÓN DE LA COPA ÓPTICA

Una vez que se ha producido la división del campo visual se forman los primordios ópticos, que quedan en contacto con el ectodermo superficial (Fig. 9). Dicho contacto va a transformar los primordios en copas ópticas biestratificadas.



**Fig. 9:** Esquema de la formación de la copa óptica. (Modificado de Graw, 2010).

Durante la formación de las copas es necesario que el tejido retiniano se doble según el eje antero-posterior y también según el eje dorso-ventral (Schmitt y Dowling, 1994). El mecanismo por el cual sucede esto no se conoce

en detalle pero estudios en medaka han demostrado que es necesaria una constricción de la lámina basal donde se apoyan los progenitores retinianos,



proceso regulado por la formación de adhesiones focales (Martínez-Morales et al., 2009). Simultáneamente se formará la lente y se establecerá el patrón dorso-ventral y latero-medial de la retina (revisado en Graw, 2010).

Las enzimas retinoaldehído deshidrogenasas (Raldh) son muy importantes para la correcta formación de las vesículas ópticas. Son enzimas encargadas de la síntesis de ácido retinoico y de regular gran parte del desarrollo del sistema visual (revisado en Lupo *et al.*, 2005). *raldh3* se expresa en el ectodermo superficial antes de la formación de la copa óptica y, posteriormente, en la región ventral de la retina (Li *et al.*, 2000), mientras que *raldh1* lo hace en la región media y dorsal de la retina. De esta manera, las enzimas encargadas de la síntesis de ácido retinoico presentan una distribución claramente diferencial, y se ha descrito que esto podría regular los factores de transcripción que, en última instancia, controlan el patrón dorso-ventral de la retina (Hyatt *et al.*, 1996; Halilagic *et al.*, 2007). Dichos factores de transcripción son Pax5, Bmp4 y Tbx5, que intervienen en la dorsalización de los primordios (Bäumer *et al.*, 2002), y Shh, ácido retinoico y distintos FGFs que regulan la ventralización (Lupo *et al.*, 2005). La determinación del eje naso-temporal está controlada por Pax6 (Bäumer *et al.*, 2002) y por diferentes miembros de la familia de las Efrinas (Connor *et al.*, 1998).

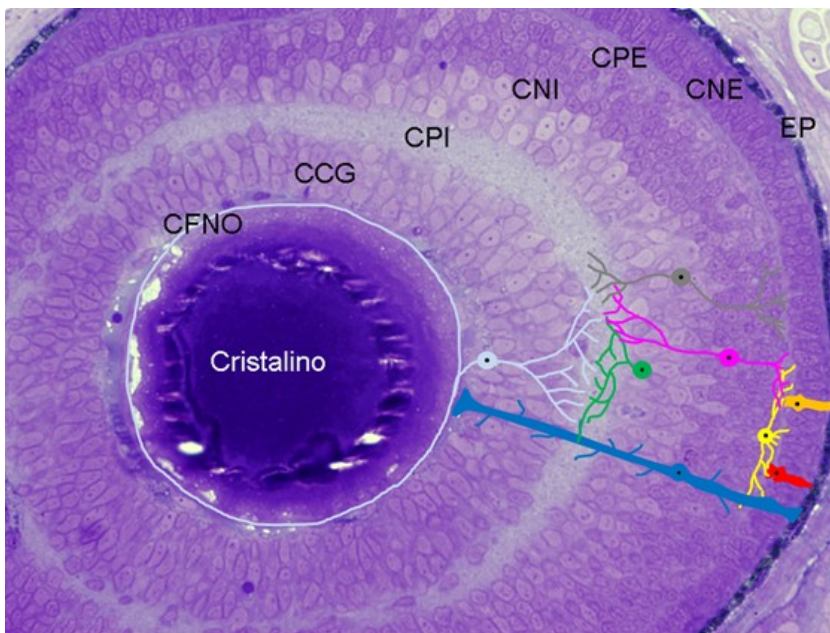
Al mismo tiempo también se está induciendo la formación de los pedúnculos ópticos gracias a una serie de moléculas como por ejemplo Pax2 (MacDonald *et al.*, 1995) y Shh (Dakubo *et al.*, 2003). También se produce una rotación de todo el conjunto en el eje antero-posterior, de manera que la superficie superior se dirige hacia el exterior y la inferior hacia el encéfalo (Schmitt y Dowling, 1994). Es en este momento cuando se forma la copa óptica, y la conexión entre ésta y el resto del prosencéfalo se reduce a una estrecha abertura llamada fisura coroidea que se dirige hacia el saco vitelino. A continuación, sucede otra rotación, por lo que la fisura coroidea queda orientada hacia el corazón (Schmitt y Dowling, 1994). Finalmente los pedúnculos ópticos darán lugar a los nervios ópticos.

# 1.5 ÁREAS VISUALES: LA RETINA Y EL TECHO ÓPTICO

## 1.5.1 Estructura de la retina

La retina es un órgano multiestratificado que presenta alternancia de capas de células y neuropilo y su citoarquitectura está muy conservada en todos los vertebrados. La luz entra por la región más vitreal y, tras atravesar todas las capas, incide sobre los fotorreceptores que transforman dicha señal en impulsos eléctricos que se transmiten hasta las células ganglionares. El axón de estas neuronas constituye el nervio óptico que sale de la retina y proyecta al techo óptico.

La retina está formada por las siguientes capas y tipos celulares (Ramón y Cajal, 1889; 1892) (Fig. 10):



**Fig. 10:** Imagen de una sección semifina de una retina de pez cebra a los 5 dpf. Se muestra la organización de las capas así como la disposición de los principales tipos celulares: células ganglionares (azul claro), amacrinas (verde), interplexiformes (gris), bipolares (rosa), de Müller (azul oscuro), horizontales (amarilla), conos (rojo) y bastones (naranja). CCG: capa de las células ganglionares; CFNO: capa de las fibras del nervio óptico; CNI: capa nuclear interna; CNE: capa nuclear externa; CPI: capa plexiforme interna; CPE: capa plexiforme externa; EP: epitelio pigmentario.

- Capa del epitelio pigmentario (EP): Es la capa más externa y está constituida por células epiteliales estrechamente unidas y con gran cantidad de pigmento en su interior. En su cara apical presentan interdigitaciones que se entremezclan con los segmentos externos de los fotorreceptores. Estas células intervienen en el transporte de sustancias hacia el resto de la retina y en la protección de los fotorreceptores frente a

radicales libres y el exceso de luz (Dayhaw-Barker, 2001).

- Capa nuclear externa (CNE): En esta capa se encuentran los somas de los fotorreceptores: los conos que se encargan de la visión fotópica y los bastones que se encargan de la visión escotópica. En el caso del pez cebra hay marcadores específicos para los fotorreceptores, *Zpr1* (*zebrafish photorreceptor 1*) para los conos y *Zpr3* (*zebrafish photorreceptor 3*) para los bastones. Estos marcadores se encuentran localizados no sólo en el soma sino también en los segmentos de los fotorreceptores.
- Capa plexiforme externa (CPE): En esta capa se producen las sinapsis entre las células fotosensibles y las interneuronas (células bipolares, horizontales e interplexiformes).
- Capa nuclear interna (CNI): Aquí encontramos los somas de las interneuronas y de las células de Müller [positivas para glutamina sintetasa (GS) y *Prox1*]. Los somas de las células horizontales y bipolares son positivos para *Prox1* y otros somas presentes en esta capa son positivos para calretinina (CR). También hay células inmunorreactivas para tirosina hidroxilasa (TH). Además, el neuropilo de esta región es positivo a *Pax6* y a CR.
- Capa plexiforme interna (CPI): Contiene los axones de las células bipolares y las dendritas de las células amacrinas, interplexiformes y ganglionares. Esta capa supone un nuevo relevo en la transmisión de la información visual.
- Capa de las células ganglionares (CCG): Compuesta por los somas de las células ganglionares y de las células amacrinas desplazadas. En esta capa encontramos elementos positivos para *Pax6* y también para CR que colocalizan con *Prox1*.
- Capa de las fibras del nervio óptico (CFNO): Formada por el conjunto de los axones de las células ganglionares. Tanto los somas de las células ganglionares como los axones de nueva generación son positivos para un marcador de pez cebra denominado *Zn8*, que es el análogo de la neurolina (Trevarrow et al., 1990).

## Introducción

---

Los axones de las células ganglionares constituyen el nervio óptico, que sale de la retina a través de una región llamada cabeza del nervio óptico, vestigio de la fisura coroidea. Las células positivas para Pax2 de esta región en teleósteos, no sólo son importantes en el empaquetamiento de los axones durante el desarrollo (MacDonald *et al.*, 1995), sino también en procesos regenerativos (Parrilla *et al.*, 2009).

### 1.5.2 Diferenciación de la retina

En un primer momento la potencialidad de las células de las vesículas ópticas es casi total y muchas de ellas expresan marcadores de células altamente indiferenciadas (*rx1*, *otx2*, *pax6* y *six3*) (Zuber *et al.*, 2003). El proceso de neurogénesis en la retina del pez cebra comienza alrededor de las 24 horas post-fecundación (hpf) (Schmitt y Dowling, 1994). Las primeras células post-mitóticas, las células ganglionares, se diferencian entre las 28 y 32 hpf y expresan un factor de transcripción llamado Athonal5 (Ath5) que constituye el primer marcador de diferenciación de la retina. Aproximadamente a partir de las 48 hpf se produce la diferenciación de las células amacrinas, bipolares, de Müller y horizontales. Por último, algo más tarde, se diferencian los fotorreceptores. A los 3 días post-fecundación (dpf) se distinguen la mayoría de los tipos celulares y todas las capas de la retina, habiéndose organizado la zona proliferativa denominada margen ciliar (MC). Además de esta secuencia temporal en la diferenciación de los tipos celulares de la retina también hay una secuencia espacial ya que la primera zona en diferenciarse es la ventro-nasal y se extiende hacia la ventro-temporal (revisado en Morris y Fadool, 2005).

La teoría más aceptada actualmente propone que la señal responsable de propagar la diferenciación en la retina es Shh, pero la señal que la inicia es desconocida aunque podría proceder del pedúnculo óptico (Masai *et al.*, 2000). Shh se libera en oleadas desde distintos lugares para desencadenar la salida del ciclo celular de las células en división y su transformación en los distintos tipos celulares. En un primer momento Shh es generado por el epitelio pigmentario (Stenkamp *et al.*, 2000), además esta oleada también es importante para el posterior reclutamiento y diferenciación de fotorreceptores. A continuación una segunda

oleada de Shh se libera desde las células ganglionares modulando la diferenciación de las regiones vitreales y organizando el MC, es decir el remanente de células proliferativas que quedan en la retina adulta de teleósteos (Shkumatava *et al.*, 2004). Esta segunda oleada de Shh es la más controvertida ya que en ausencia de las células ganglionares se desarrollan todos los demás tipos celulares, aunque en exceso (Kay *et al.*, 2001). Por último, una tercera oleada libera Shh desde las células amacrinas. En este caso, Shh es el responsable de la laminación y si esta oleada no se produce, no se forma el patrón típico de alternancia de capas nucleares y plexiformes (Shkumatava *et al.*, 2004).

La diferenciación cronológica y secuencial de los distintos tipos celulares se conoce bastante bien, así como los factores que regulan la diferenciación a un tipo celular u otro. Sin embargo, cómo una célula del MC deja de proliferar para diferenciarse no es bien conocido. Algunos autores, basándose en modelos mutantes que presentan exceso o déficit de diferenciación, postulan que el ambiente generado por varios factores de transcripción en el MC induce proliferación y el ambiente existente en la zona central de la retina y que está alejado del MC induce diferenciación (Cervený *et al.*, 2010).

### 1.5.3 El techo óptico

El techo óptico (TO) es una estructura mesencefálica bilobulada que actúa de centro integrador de toda la información visual, a él llegan los axones de las células ganglionares. En los ejemplares adultos está compuesto por 6 capas de somas y neuropilo (Vanegas *et al.*, 1984; Meek y Nieuwenhuys, 1998), pero a las edades a las que nosotros vamos a trabajar, 5 dpf como máximo, sólo hay tres: la zona gris periventricular (ZGPV) donde se encuentran la mayor parte de los somas, la zona blanca superficial (ZBS) que incluye las prolongaciones de los somas de la ZGPV y de otras regiones del encéfalo y el estrato marginal (EM) que consiste en una monocapa celular en la región más exterior del TO.

En el pez cebra, cada lóbulo recibe la mayoría de aferencias de la retina contralateral y muy pocas de la ipsilateral (Springer y Gaffney, 1981). Dentro del TO y organizadas en los diversos estratos se encuentran diferentes tipos de interneuronas: esféricas, piramidales, fusiformes y piriformes, células que son

## ***Introducción***

---

positivas para Pax6, CR y Prox1. La retina proyecta, principalmente, a los estratos más superficiales, a neuronas de tipo horizontal, piramidal, bipolar pequeña, fusiforme y piriforme grande (Laufer y Vanegas, 1974). Sin embargo, el EM sólo recibe aferencias de la región del tectum (Lara *et al.*, 1995). Se ha descrito que algunas proyecciones que se encuentran dentro del TO, tanto aferencias como eferencias, son positivas para marcadores como CR y la glía es positiva a GS (Arenzana, 2006).

El TO, al igual que la retina y otras regiones del cerebro de teleósteos, mantiene una población de células proliferativas hasta la edad adulta (Zupanc *et al.*, 2005; Ito *et al.*, 2010). Hasta las 24 hpf, el TO permanece indiferenciado y con una elevada actividad proliferativa. A partir de ese momento comienza la diferenciación y las células proliferativas con características de células troncales van quedando restringidas a los márgenes medial, lateral y caudal de la ZGPV (Zupanc *et al.*, 2005).

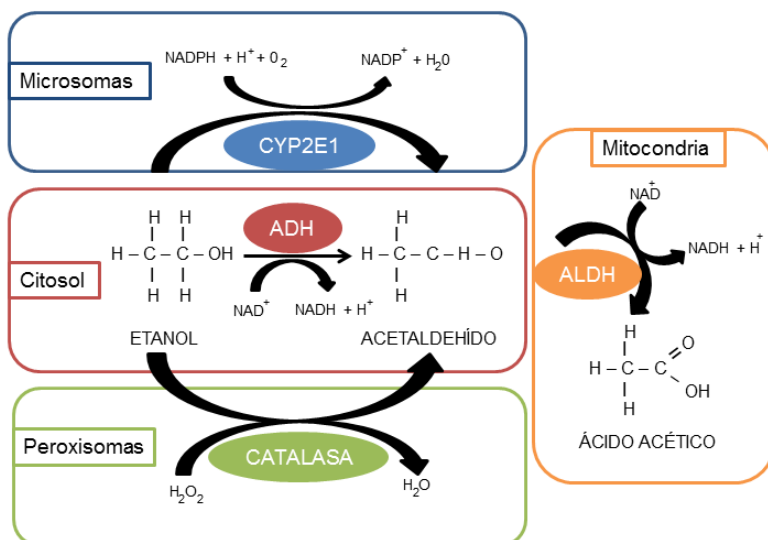
En teleósteos, las proyecciones retinotectales están ordenadas topográficamente, la ubicación final de cada axón retiniano en el TO refleja la posición de su cuerpo celular en la retina (revisado en Culverwell y Karlstrom, 2002). Estas relaciones topográficas se mantienen después de procesos de degeneración y regeneración, aunque debido al continuo aporte de nuevas células tanto en la retina como el TO, sufren un continuo reordenamiento (Easter y Stuermer, 1984). El refinamiento del mapa retinotópico depende de la actividad retiniana (Thompson y Holt, 1989). Sin embargo, la diferenciación inicial del TO es independiente de la llegada del nervio óptico ya que en mutantes que carecen de ojos (mutantes *chk*), ésta es prácticamente normal, al menos durante los primeros momentos del desarrollo.

## **1.6 TERATOGENIA ETÍLICA**

### **1.6.1 Generalidades**

El etanol (comúnmente conocido como alcohol) es, junto con el tabaco, la droga de abuso que goza de mayor aceptación social. Según la Organización

Mundial de la Salud (OMS), 1,8 millones de personas mueren al año en el mundo como consecuencia directa de la ingesta de etanol. Al ser una molécula pequeña y sin carga eléctrica, es capaz de atravesar barreras como la placenta o la barrera hematoencefálica, llegando al embrión en desarrollo y al cerebro. En el caso de los embriones, el etanol induce un espectro de síntomas que, en conjunto, se denominan Síndrome Alcohólico Fetal (SAF). El SAF afecta a 0,5-1,5/1000 nacimientos dependiendo el sistema de muestreo (revisado en Ismail *et al.*, 2010). Este síndrome se caracteriza por malformaciones craneofaciales que van desde alteraciones leves como reducción de la barbilla o fisuras palpebrales pequeñas, hasta casos graves de holoprosencefalia y ciclopia. Además, suele ir acompañado de problemas cognitivos y retraso mental.



**Fig. 11:** esquema de la vía metabólica del etanol. (Modificado de Manzo-Avalos y Saavedra-Molina, 2010).

Una vez dentro del organismo, el etanol se absorbe en el estómago y en el intestino y, ya dentro de las células, se metaboliza en varios productos y en distintos compartimentos (Fig. 11). Aunque, en teoría, el acetaldehído es el más tóxico para el organismo, estudios en pez cebra han demostrado que el etanol

presenta niveles de teratogenicidad mayores que el acetaldehído y que es el responsable de las alteraciones inducidas durante el desarrollo (Reimers *et al.*, 2004).

### 1.6.2 Etanol y señalización celular

Por razones obvias, el estudio del efecto que produce el etanol sobre embriones humanos es sumamente complicado. Incluso en recién nacidos es difícil analizarlo debido al amplio espectro de efectos producidos. Por ello,

## *Introducción*

---

tradicionalmente se han utilizado embriones de rata y ratón para su estudio. Estos modelos presentan ventajas tales como la presencia de placenta. Sin embargo, también presentan serias desventajas como por ejemplo que el etanol debe ser suministrado a la madre por lo que no se conoce cuánto llega al embrión y una misma concentración de etanol es capaz de inducir varios efectos (revisado en Polifka y Friedman, 2002). Actualmente, la facilidad para generar mutantes, y la sencillez en el tratamiento, han colocado a los embriones de pez cebra en un puesto preferente para los estudios de neurotoxicología (revisado en Peterson *et al.*, 2008).

Se ha descrito que el etanol aumenta la muerte celular por apoptosis, disminuye la proliferación celular, altera la migración celular y la síntesis y función de distintas proteínas (revisado en Polifka y Friedman, 2002). Estudios previos utilizando líneas celulares en cultivo han demostrado una clara relación entre el etanol y dos GTPasas, RhoA y RhoE (proteína íntimamente relacionada con Rnd1). El etanol afecta a la activación de RhoA, aunque de una manera que parece depender del tipo celular. En astrocitos se ha demostrado una disminución en la activación de esta GTPasa tras la exposición al etanol (Martínez *et al.*, 2007), efecto que se revierte mediante la adición de ácido lisofosfatídico. Sin embargo, en las células del cerebelo el etanol aumenta la actividad de RhoA, lo que impide la correcta formación de neuritas (Joshi *et al.*, 2006). Por otro lado, el etanol aumenta la expresión de los antagonistas de RhoA (por ejemplo *rhoE*), fenómeno relacionado con la inducción de una respuesta inflamatoria frente a este teratógeno (Guasch *et al.*, 2007). Estudios similares han demostrado que la adición de etanol a cultivos de astrocitos provoca la desorganización del citoesqueleto, efecto que se revierte por la transfección de dichas células con RhoA (Guasch *et al.*, 2003).

Utilizando embriones de pez cebra se ha determinado que el efecto del etanol sobre el desarrollo del encéfalo depende del momento de exposición y de la estirpe animal (Loucks y Carvan, 2004; Arenzana *et al.*, 2006b). El etanol altera la formación del eje antero-posterior del embrión, induce problemas en los movimientos de convergencia y extensión, e impide la correcta migración de la placa precordial (Blader y Strähle, 1998). También se originan fenotipos ciclópeos en los que la evaginación comienza pero las vesículas no llegan a separarse



totalmente y permanecen fusionadas, apareciendo fenotipos similares a los mutantes *oep* y *cyc*. Aunque la aparición de fenotipos ciclópeos tras la exposición a etanol parece ser un efecto indirecto ocasionado por los problemas en la organización del eje del embrión (Blader y Strähle, 1998), también parecen existir ciertos efectos directos (Loucks et al., 2007). De hecho, el etanol parece tener un efecto muy específico sobre el sistema visual en desarrollo ya que si la exposición en etapas tempranas induce ciclopia, la exposición en estadios más tardíos induce alteraciones en la laminación de la retina y el TO (Arenzana *et al.*, 2006b), microftalmia (Kashyap *et al.*, 2007) y fallos en el procesamiento de la información visual (Bilotta *et al.*, 2002).

Se han postulado varias teorías que intentan explicar los problemas ocasionados por la exposición embrionaria a etanol. A continuación explicaremos brevemente algunas de ellas:

- En un principio se pensaba que el etanol afectaba a la señalización de Shh, pero se descartó que esto produjera los efectos observados en embriones de pez cebra (efectos entre los que se incluye la ciclopia) (Blader y Strähle, 1998). Sin embargo, algunos autores han conseguido rescatar parcialmente el fenotipo inducido (incluida la ciclopia) con la inyección del RNAm de *shh* (Loucks y Ahlgren, 2009).
- Las especies reactivas del oxígeno generadas durante la degradación del etanol son muy tóxicas para la célula. El tratamiento de embriones expuestos a etanol con antioxidantes ha demostrado ser efectivo para eliminar la muerte celular (Reimers *et al.*, 2006).
- El etanol también altera la señalización vía Wnt/Catenina- $\beta$ , morfógenos implicados en la regulación de la formación del eje antero-posterior del organismo, la proliferación celular y la reducción del estrés oxidativo (Chen *et al.*, 2010).
- Las enzimas alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa que metabolizan el etanol intervienen en la síntesis de ácido retinoico. Algunos autores han descrito que el etanol reduce el gradiente caudo-rostral de ácido retinoico (Yelin *et al.*, 2007) y, de hecho, la exposición combinada a

## *Introducción*

---

etanol y ácido retinoico parece proteger al embrión del efecto teratogénico de ambos (Marrs *et al.*, 2010).

Sin embargo, ninguna de esas teorías es capaz de responder a todas las preguntas, ni tampoco se consigue recuperar completamente el fenotipo normal. Ello podría indicar que haya más de un mecanismo alterado.

Uno de los problemas que conlleva el estudio de la teratogenicidad del etanol es que, en teoría, no hay ningún receptor en la célula para él y, por tanto, se desconoce cómo es capaz de alterar las redes de señalización celular y la transcripción. Hay que tener en cuenta un dato importante que se suele obviar en los estudios *in vivo*. Algunas proteínas, como la PKC o complejos proteicos como los canales de potasio Shaw2, presentan dominios altamente hidrofóbicos a los cuales se puede unir de manera específica el etanol, modulando la actividad de dichas proteínas (Shahidullah *et al.*, 2003; Das *et al.*, 2009). Además, se ha demostrado que este efecto puede llegar a ser dual, ya que concentraciones bajas de etanol aumentan la actividad de PKC, mientras que concentraciones elevadas la disminuyen (Slater *et al.*, 2003).

El estudio del etanol ha sido llevado a cabo en distintos modelos tanto *in vivo* como *in vitro* pero, aunque se han obtenido muchos datos sobre cómo altera los distintos procesos celulares, todavía no se conocen demasiado bien los mecanismos a través de los cuales actúa. De hecho, muchos de los resultados obtenidos son contradictorios y no sólo entre distintos modelos sino dentro de la misma especie. Sin embargo, un dato se repite en la mayoría de los trabajos: el etanol altera la dinámica celular más básica, modificando la estabilidad del citoesqueleto, lo que dificulta el correcto establecimiento de uniones celulares, los movimientos celulares y la laminación de las distintas regiones del tubo neural.

# Hipótesis y objetivos

---

Muchos son los estudios que han intentado localizar las dianas moleculares del etanol *in vivo*. El éxito ha sido relativo ya que algunos de los datos obtenidos son contradictorios. Mientras que unos autores afirman que la señalización de Shh no es responsable de la ciclopia inducida por etanol (Blader y Strähle, 1996), otros autores han conseguido revertir el fenotipo inducido por dicho teratógeno, incluida la ciclopia, mediante la inyección del RNAm de este morfógeno (Loucks *et al.*, 2007). Los estudios hechos en cultivos han identificado varias moléculas que intervienen en adhesión celular, como dianas del etanol (Guasch *et al.*, 2003; Slater *et al.*, 2003). Sin embargo, estos estudios también son contradictorios ya que, dependiendo del tipo celular expuesto a etanol, se produce un aumento o una disminución de una misma proteína (Joshi *et al.*, 2006; Martínez *et al.*, 2007). Todo ello ha conducido a proponer que el etanol altera varias vías de señalización, aunque no se ha llegado a una explicación consensuada.

Estudios realizados durante la gastrulación del pez cebra y *Xenopus* han demostrado que el etanol retrasa la migración de la placa precordial (Blader y Strähle, 1996; Yelin *et al.*, 2005). Aunque estos estudios han descrito la alteración de varios morfógenos, como por ejemplo el ácido retinoico, no se ha estudiado la migración desde el punto de vista celular, prestando atención a las modificaciones que debe sufrir el citoesqueleto de las células para llevar a cabo movimientos celulares. Este proceso es de vital importancia durante la gastrulación (revisado en Lepage y Bruce, 2010) y se sabe que las proteínas que intervienen en él son dianas del etanol, al menos en cultivos celulares (Guasch *et al.*, 2003).

Algunos autores han propuesto que la ciclopia, uno de los fenotipos más extremos inducidos por el etanol, es consecuencia de la incorrecta migración de la placa precordial (Blader y Strähle, 1996) y no un efecto directo del etanol. Sin embargo, otros autores han descrito que el etanol altera algunas proteínas implicadas en la división del campo visual (Loucks *et al.*, 2007). Ello no obstante, la vía de señalización implicada en la evaginación de las vesículas ópticas y la morfología celular no ha sido estudiada en profundidad tras la exposición a etanol.

Por último, aunque se ha demostrado que el etanol retrasa la laminación y altera la diferenciación de la vía visual en estadios tardíos (Kashyap *et al.*, 2007; Bilotta *et al.*, 2002; Arenzana, 2006), no se ha realizado una cuantificación de la

## *Hipótesis y objetivos*

---

modificación de los distintos tipos celulares.

Nuestra hipótesis de partida es que, durante el desarrollo del pez cebra, el etanol altera las vías de señalización celular mediante la modificación del patrón de expresión de morfógenos y factores de transcripción y que es capaz de modificar las proteínas que intervienen en adhesión celular, igual que se ha demostrado *in vitro*. Por tanto, el etanol alteraría los movimientos celulares que son tan necesarios durante el desarrollo. Entre los movimientos alterados por el etanol estarían la migración de la placa precordial, la evaginación de las vesículas ópticas y la laminación de las áreas visuales.

Estudiaremos el efecto del etanol en tres momentos distintos del desarrollo del sistema visual del pez cebra: durante la gastrulación, momento en el que se especifica el campo visual; durante la evaginación de las vesículas ópticas; y durante la organogénesis, que es cuando se produce la diferenciación del sistema visual.

Partiendo de lo anteriormente expuesto, los objetivos específicos de la presente Tesis Doctoral son:

- 1) Durante la gastrulación: cuantificar y analizar las causas del retraso en la migración de los progenitores de la placa precordial, tras la exposición a etanol.
  - 1.1) Analizar el patrón de expresión de moléculas específicas de la placa precordial y el retraso en la migración de ésta.
  - 1.2) Evaluar los niveles de expresión de las moléculas responsables de la adhesión celular durante la gastrulación y manipular la traducción de las mismas.
  - 1.3) Cuantificar el grado de adhesión celular de los progenitores de la placa precordial.
- 2) Durante la evaginación de las vesículas ópticas: analizar el fallo en este proceso producido por el etanol.
  - 2.1) Examinar el patrón de expresión de los genes implicados en la división del campo visual.

- 2.2) Comprobar los cambios morfológicos y de polaridad que sufren las células durante este proceso.
- 3) Durante la organogénesis: valorar la maduración de las áreas visuales en ejemplares ciclópeos.
  - 3.1) Estudiar la expresión de los genes implicados en el inicio de la diferenciación de la retina.
  - 3.2) Analizar el nervio óptico y las células que intervienen en su empaquetamiento.
  - 3.3) Cuantificar el número de células positivas para distintos marcadores de diferenciación en la retina y en el techo óptico.

# Material y Métodos

---

### 3.1 EL PEZ CEBRA

El animal de experimentación utilizado para la realización de la presente Tesis doctoral es el pez cebra *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822) (Fig. 12).

Los individuos reproductores no modificados genéticamente pertenecen a la estirpe AB que se encuentra disponible en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCyL). En el caso de los ejemplares transgénicos fueron obtenidos a partir de ejemplares reproductores disponibles en el



**Fig. 12:** Fotografía de un pez cebra macho (izquierda) y hembra (derecha).

University College of London (UCL) y cuyo uso fue amablemente autorizado por el Profesor Stephen Wilson y por el Profesor Masazumi Tada. Las líneas transgénicas y mutantes utilizadas se detallan en la tabla 1.

Línea	Fondo genético	Tipo de transgen/mutación
<i>ath5:GFP</i>	Tg	Expresión de <i>GFP</i> bajo el promotor de <i>ath5</i>
Cyclops	AB	Mutante nulo para <i>ndr2</i>
Gsc:GFP	AB	Proteína de fusión Gooscooid-GFP
One-eye pinhead	TL	Mutante nulo para <i>oep</i>
Smo	AB	Mutante nulo para el receptor <i>smoothened</i> de Shh
Syu	AB	Mutante nulo para <i>shha</i>

**Tabla 1:** Descripción de las líneas transgénicas utilizadas.

Los animales fueron manipulados siguiendo las directrices de la Comunidad Europea (86/609/EEC y 2003/65/EC) y la legislación española (RD 1201/2005, BOE 252/34367-91, 2005) vigentes para el uso y cuidado de animales de experimentación y bajo la supervisión del Servicio de Experimentación Animal de la



Universidad de Salamanca.

### 3.2 MANTENIMIENTO Y CRÍA DE PEZ CEBRA

Todos los animales adultos reproductores de la estirpe AB fueron mantenidos en agua desionizada suplementada con sales Instant Ocean<sup>®</sup> (Aquarium Systems, Mentor, Ohio; EE.UU.) a una concentración de 0,3 g/l. Los ejemplares adultos se encontraban a 28,5°C con un ciclo de 14 horas de luz y 10 de oscuridad (Westerfield, 1995).

Los ejemplares en desarrollo se mantuvieron en una estufa a 28,5°C en medio E3 (5 mM de NaCl, 0,17 mM de KCl, 0,33 mM de CaCl<sub>2</sub> y 0,33 mM de MgSO<sub>4</sub>) al que se añadían un par de gotas de azul de metileno para evitar el crecimiento de hongos.

El día previo a la puesta, dos machos y una hembra reproductores fueron dispuestos en parideras externas. El primer estímulo luminoso tras un periodo de oscuridad desencadena la liberación de los gametos. El uso de parideras externas facilita la recolección de los embriones al quedar estos depositados en una cámara separada. Tras la fecundación, los huevos eran analizados bajo una lupa con el fin de eliminar todos aquellos no fecundados o que presentan anomalías morfológicas. Todos los embriones fueron datados bajo una lupa según las características morfológicas descritas por Kimmel *et al.*, (1996).

Los ejemplares utilizados en la presente Tesis doctoral se pueden dividir en tres grupos:

1) Embriones de los estadios de 50% epibolia (6 hpf, inicio de la gastrulación), 75% epibolia (8 hpf, llegada de la placa precordial al polo animal) y *tailbud* (10 hpf, fin de la gastrulación). Se utilizaron para estudiar el efecto del etanol durante la gastrulación.

2) Embriones de los estadios de 3 somitos (11 hpf, previo a la evaginación de las vesículas ópticas), 6 somitos (12 hpf, media evaginación) y 10 (14 hpf) y 18 (20 hpf) somitos (postevaginación). Se utilizaron para analizar el efecto del etanol sobre la evaginación de las vesículas ópticas.

3) Especímenes de 48 hpf, 3 y 5 dpf. Se emplearon para estudiar el efecto del

etanol a largo plazo.

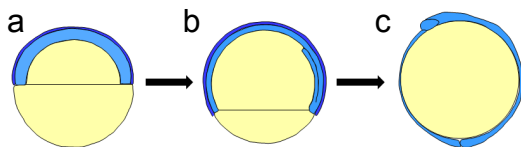
### 3.3 EXPOSICIÓN DE LOS EMBRIONES A ETANOL

En todos los casos se dispusieron 50 embriones por cada placa Petri que contenía medio E3 con la concentración de etanol deseada. Las placas se sellaron con *parafilm* para evitar la evaporación. En el caso de los embriones expuestos desde las 4 hasta las 24 hpf, la solución alcohólica fue renovada a las 12 hpf. Como ejemplares control se utilizaron animales de las mismas edades y de la misma puesta que no habían sido expuestos a etanol.

Hemos realizado tres tratamientos distintos con etanol, dependiendo de la edad a la que se realizaba el análisis fenotípico.

#### 3.3.1 Efecto del etanol en la migración de la placa precordial

En el caso del estudio sobre el efecto teratogénico del etanol durante la gastrulación, los embriones fueron expuestos exclusivamente durante dicho periodo. Desde el inicio de la gastrulación (50% epibolia) hasta que la placa precordial alcanza el polo animal del embrión (75-80% epibolia), edad a la cual los animales eran procesados para los distintos experimentos (Fig. 13). Algunos embriones se dejaron desarrollar hasta el fin de la gastrulación (tailbud).



**Fig. 13:** Tratamiento de los embriones desde el estadio de 50% de epibolia (a) hasta tailbud (c). La mayoría de los embriones fueron recogidos en el estadio de 75% epibolia (b).

Las concentraciones utilizadas en la mayoría de los casos fueron de 1,5%, 2% y 2,4%, aunque para el estudio mediante PCR cuantitativa a tiempo real se añadieron tratamientos con concentraciones de etanol subteratogénicas (0,5% y 1%).

#### 3.3.2 Efecto del etanol en la evaginación de las vesículas ópticas

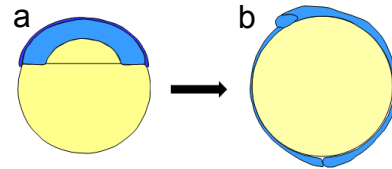
En el caso de los ejemplares destinados al estudio de la evaginación de las vesículas ópticas, el tratamiento utilizado fue la exposición de los mismos a una solución alcohólica de 1,5%, 2% o 2,4% en medio E3. Los embriones se expusieron desde el estadio de cúpula/30% epibolia, hasta el estadio de *tailbud* (Fig. 14). A

## Material y Métodos

---

continuación los ejemplares se lavaron en medio E3 y se mantuvieron hasta la edad deseada.

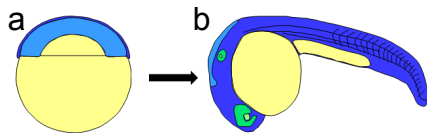
Los animales se recogieron a la edad de 3 (previo a la evaginación de las vesículas ópticas), 6 (durante la evaginación), 10 (se ven dos vesículas ópticas totalmente evaginadas) y 18 somitos (las vesículas ópticas ya se han constituido como copas ópticas).



**Fig. 14:** Tratamiento de los embriones desde el estadio de 30% epibolia (a) hasta el de tailbud (b).

### 3.3.3 Efecto del etanol a largo plazo

En el caso de los ejemplares utilizados para el análisis del efecto del etanol a largo plazo, estos ejemplares fueron expuestos a una solución alcohólica de 1,5% de etanol desde el estadio de cúpula hasta las 24 hpf (Fig. 15), momento en el que se retiraban de la solución alcohólica y se disponían en medio E3 fresco. A las 48 hpf se seleccionaron aquellos embriones que presentaban ciclopedia, entendiendo como tal la fusión total o parcial de las vesículas ópticas.



**Fig. 15:** Tratamiento de los embriones desde el estadio de 30% epibolia (a) hasta las 24 hpf (b).

Se recogieron ejemplares ciclópeos de 48 hpf, 3 dpf y 5 dpf. Los ejemplares que fueron expuestos a etanol pero no presentaban ciclopedia no fueron utilizados en este trabajo.

En la siguiente tabla se muestran todos los estadios que se utilizaron en la presente Tesis Doctoral y una relación respecto a las hpf y el proceso de nuestro interés que tiene lugar.

Horas postfecundación	Nombre del estadio	Proceso
4,3	Cúpula	Inicio de la epibolia.
4,7	30%epibolia o blástula tardía	Inicio de la progresión de la epibolia.
5,3	50% epibolia o gástrula temprana	Inicio de la gastrulación.
8	75% epibolia o gástrula media	La placa precordial llega al polo animal.
10	100% epibolia o gástrula tardía	Fin de la gastrulación, comienza la parcelación del SCN.
11	3 somitos	Inicio de la evaginación del campo visual.
12	6 somitos	Mitad de la evaginación del campo visual.
14	10 somitos	Fin de la evaginación de las vesículas ópticas.
18	18 somitos	Formación de la copa óptica.
24	Prímula 6	Inicio de la diferenciación de la retina.
48		Diferenciación extendida por toda la retina y salida de axones hacia el techo óptico.
72	Larva	Todos los tipos celulares en la retina. Enervación del techo óptico. Laminación de ambas estructuras.
120		Organización de la retina similar al adulto. Aparición del estrato marginal en el techo óptico.

**Tabla 2:** Embriones utilizados en la presente Tesis Doctoral.

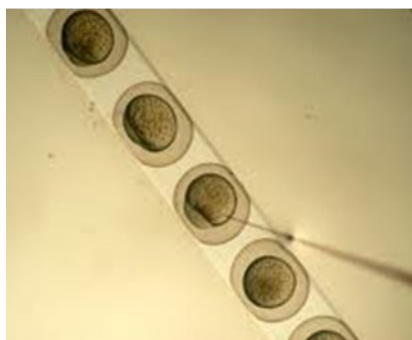
### 3.4 MICROINYECCIÓN DE RNA Y MORFOLINOS

Para el estudio de la posible sinergia entre el etanol y las GTPasas realizamos microinyecciones de RNA y morfolinis (Tabla 3).

RNA	Cantidad inyectada	Efecto teórico
GFP:membrane	100 pg (2nl/embrión)	Las membranas se volverán verdes
Morfolino de Rnd1	35pg (0,7nl/embrión)	Bloqueo de la traducción del RNA de <i>rnd1</i>
Morfolino de Rnd1like	35pg (0,7nl/embrión)	Bloqueo de la traducción del RNA de <i>rnd1like</i>

**Tabla 3:** Descripción del RNA y los morfolinis inyectados.

El RNA o los morfolinis (GeneTools) fueron inyectados con un microinyector (Eppendorf Fento Jet 5247). El RNA se inyectó durante el estadio de 1 o 2 blastómeras directamente en las mismas y los morfolinis en el vitelo en el mismo estadio embrionario (Fig. 16). Tras la inyección, los embriones fueron devueltos a placas Petri. Las concentraciones adecuadas para cada inyección fueron determinadas mediante experimentos de titulación, para ello se inyectaron distintas concentraciones para comprobar cuáles eran letales y cuáles no producían ningún efecto. Se seleccionó la máxima concentración que no inducía la muerte del embrión.



Como control adicional a algunos embriones se les inyectaron 2 nl de tampón sin morfolino ni RNA. Esta inyección no produjo ningún efecto.

**Fig. 16:** Inyección en embriones de pez cebra en el estadio de una célula.

## 3.5 PROCESAMIENTO HISTOLÓGICO

### 3.5.1 Fijación

Una vez datados los embriones se procedió a su fijación. En el caso de los embriones mayores de 24 hpf, previamente fueron anestesiados con etil 3-aminobenzoato metanosulfonato (Sigma Co., St. Louis, MO, EE.UU) al 0,03% en medio E3.

El tipo de fijación utilizado dependía de la técnica a desarrollar posteriormente. Los ejemplares destinados a la detección de RNA mediante hibridación *in situ* (HIS) o de proteínas mediante inmunohistoquímica (exceptuando proteínas de membrana) fueron fijados en paraformaldehído (PFH) al 4% durante una noche a 4°C. Tras ello, se retiró el PFH lavando con tampón fosfato salino libre de RNAsas (PBS) y tras un paso intermedio en 50% PBS/50% metanol los embriones se mantuvieron en metanol a -20°C hasta su uso.

En el caso de los embriones empleados para el estudio de proteínas de membrana (Zo1), se fijaron de la misma manera pero se mantuvieron en una solución de PBS con acida sódica al 0,05% a 4°C hasta su uso.

Para la obtención de cortes semifinos y de secciones para microscopía electrónica, los embriones fueron fijados en una solución de PFH al 2% y glutaraldehído al 2% en tampón cacodilato (TC) durante una noche a 4°C. Tras retirar el fijador mediante tres lavados de diez minutos en TC, se procedió a su procesamiento tal y como se detalla en el apartado “Obtención y tinción de cortes semifinos”.

Los embriones de edades menores a las 24 hpf fueron descorionados después de la fijación con la ayuda de unas pinzas, mientras que los ejemplares mayores de 24 hpf se descorionaron con anterioridad a la fijación, en los casos en los que no se encontraran ya nadando libremente.

Los embriones de 48 hpf, 3 y 5 dpf empleados para realizar una técnica *in toto*, en lugar de seccionarlos, fueron tratados con una solución de 3 mg/ml de feniltiurea (PTU, Sigma) disuelta en medio E3 con el fin de inhibir su pigmentación.

### **3.5.2 Seccionamiento en criostato**

Con el fin de obtener secciones en el criostato, los embriones de pez cebra fueron encastrados en una solución de agar al 1,5% y sacarosa al 10% en PBS. Los ejemplares que se encontraban en metanol fueron previamente rehidratados con PBS. Los embriones de 3, 6 y 10 somitos se orientaron para obtener secciones coronales y los ejemplares de 48 hpf, 3 y 5 dpf se orientaron tanto sagital como horizontalmente. Los bloques se crioprotegieron en una solución de 30% de sacarosa en PBS, durante una noche a temperatura ambiente (TA) y en agitación. Tras congelar el bloque se obtuvieron secciones de 10  $\mu\text{m}$  de grosor en un criostato Leica Jung CM3000 (Nussloch, Alemania), que se recogieron en portaobjetos tratados con Polysina (Thermo Scientific). Las secciones se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **3.5.3 Obtención y tinción de cortes semifinos**

Las secciones semifinas se realizaron sobre embriones de 3, 6, 10 y 18 somitos, con el fin de observar la morfología de las células que constituyen el campo morfogénico visual durante la evaginación de las vesículas ópticas. Tras la retirada del fijador, los embriones fueron descorionados y desvitelados con unas pinzas y se les seccionó la cabeza. Tras tres lavados de veinte minutos en TC a TA, las muestras se postfijaron en una solución acuosa de tetróxido de osmio con ferricianuro potásico al 1% a  $4^{\circ}\text{C}$  durante cuarenta y cinco minutos. A continuación se lavaron las muestras varias veces durante dos horas en TC.

Una vez finalizada la postfijación, se procedió a la deshidratación de las muestras en baños de cinco minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  en soluciones crecientes de etanol de  $50^{\circ}$ ,  $70^{\circ}$ ,  $80^{\circ}$ ,  $90^{\circ}$ ,  $96^{\circ}$  y  $100^{\circ}$ . A continuación las muestras se lavaron tres veces durante diez minutos en óxido de propileno para proceder a la inclusión en resina EMBED-812 (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, EE.UU.). Para este proceso las muestras se incubaron en mezclas sucesivas de EMBED-812:óxido de propileno (1:3; 1:1; 3:1), 60 minutos en cada una de ellas a TA. Finalmente, se dispusieron las muestras en EMBED-812 durante toda la noche a TA. La inclusión definitiva se realizó con la misma resina, en moldes que permiten una correcta orientación de las muestras bajo la lupa, dejándolos polimerizar en una estufa a

60°C durante 24 horas.

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

### **3.5.4 Obtención de secciones para microscopía electrónica**

De los mismos bloques de los que obtuvimos las secciones semifinas, se realizaron cortes ultrafinos de entre 50-80 nm de grosor, en un ultramicrotomo (Ultracut E, Reichert-Jung).

Las secciones ultrafinas se recogieron en rejillas de ojal de cobre (Electron Microscopy Science) recubiertas con una película de 0,5% colodión en amil acetato. Posteriormente se contrastaron con acetato de uranilo (2% acetato de uranilo en etanol al 50%), durante 15 minutos en oscuridad a TA y con citrato de plomo durante 10 minutos a TA, en atmósfera sin CO<sub>2</sub> para evitar que precipite el plomo. Finalmente se lavaron las secciones con abundante agua destilada y se dejaron secar antes de su observación al microscopio electrónico.

## **3.6 PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL**

### **3.6.1 Homogeneización de embriones y extracción de RNA**

La homogeneización de los embriones de pez cebra del estadio y tratamiento correspondiente se realizó mecánicamente mediante pipeteo. Tras obtener una solución totalmente homogénea procedimos a la extracción del RNA total con Trizol Reagent (Sigma), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Por cada 100 embriones se utilizó 1 ml de Trizol al que se añadieron 0,2 ml de cloroformo, que solubiliza los componentes orgánicos separándolos de esta manera del RNA. Tras agitar la mezcla 15 segundos se dejó incubar 3 minutos a TA. A continuación se centrifugó la solución a 12000 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos



## ***Material y Métodos***

---

a 4°C y se procedió a la precipitación del RNA total mediante la adición de 0,5 ml de isopropanol. Para ello se dejó incubar durante 10 minutos a TA y se volvió a centrifugar de la misma manera para obtener un pellet. El RNA precipitado se lavó en 1 ml de etanol al 70% y después se centrifugó a 7000 rpm durante 5 minutos. Tras retirar el exceso de etanol el pellet se eluyó en 20 µl de agua libre de RNAsas.

La concentración de RNA total fue cuantificada utilizando un NanoPhotometer™ (Implen).

### **3.6.2 Obtención de DNAc: retrotranscripción**

Una vez extraído el RNA total procedimos a la obtención del DNA copia (DNAc) de todas las formas de RNA presentes en las células, incluyendo el RNA ribosómico (RNAr) y el RNA mensajero (RNAm).

Para ello utilizamos el kit de Applied Biosystems “High-capacity cDNA Archive Kit”, que utiliza cebadores aleatorios que permiten la retrotranscripción de todo el RNA. El procedimiento se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante: para un volumen final de 20 µl se utilizaron 2 µl de tampón 10x, 2 µl de cebadores 10x, 0,8 µl de mezcla de nucleótidos 25x, 4,2 µl de agua, 1 µl de retrotranscriptasa y 10 µl de una solución de 0,2 µg/µl de RNA.

El programa de retrotranscripción consta de dos pasos: incubación a 25°C durante 10 minutos e incubación a 37°C durante 2 horas, para lo cual se utilizó un termociclador Veriti modelo 9902 (Applied Biosystems).

Tras la retrotranscripción procedimos a la eliminación del RNA que había servido como molde. Para ello digerimos la mezcla obtenida de la retrotranscripción con 0,2 µl de Ribonucleasa A (1 µg/µl, Sigma) durante 20 minutos a 37°C. A continuación se detuvo la reacción añadiendo 8,4 µl de acetato de amonio 7,5M y centrifugando a 13000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Este procedimiento precipita la RNasa y se recupera la fase acuosa que es donde ha quedado el DNAc. Para precipitar el DNAc se añadió 1 ml de etanol puro y tras una ligera agitación se dejó reposar durante una noche a -20°C. Después la mezcla se centrifugó a 13000 rpm durante 20 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante. El pellet, que contiene el DNAc, se lavó con 100 µl de acetato de amonio 0,01 M durante 5 minutos a TA y otra vez se centrifugó a 13000 rpm durante 5 minutos. El pellet resultante tras

desechar el sobrenadante se lavó con 100 µl de etanol frío y se volvió a centrifugar de la misma manera. Tras dejar secar el pellet, éste se resuspendió en 20 µl de agua libre de RNasa.

Con el fin de eliminar cualquier resto de cebador que hubiéramos podido purificar en el paso anterior, pasamos la solución a través de las columnas del kit QIAGEN “QiAquick PCR Purification Kit”. Por último se cuantificó el DNAc utilizando un NanoPhotometer™.

El producto obtenido mediante la purificación por columnas fue el material de partida para realizar la PCR cuantitativa a tiempo real.

### 3.6.3 Diseño de cebadores

Los cebadores para la realización de la QRT-PCR se detallan en la tabla 4.

Gen	Cebador Forward	Cebador Reverse	Amplicón (nt)	Referencia ENSEMBL
<i>ef1alpha</i>	GTA <sup>CTT</sup> CTCA- GGCTGACTGTG	ACGATCA- GCTGTTTCACTC C	136	ENS- DARG00000020 850
<i>rhoAa</i>	GGTGGATTCAA- AACAGGTGG	TCTCCAAACTGT- CAGGACTG	140	ENS- DARG00000026 845
<i>rnd1</i>	GTTATCCCGAGA- CATACGTGC	CCTGACGTGTCC- CATAAACTG	100	ENS- DARG00000030 547
<i>rnd1like</i>	GAA- GACTGCGATGTTAC AGGT	GTATGGA- GATCCTGATGTG TCC	145	ENS- DARG00000004 218
<i>zo-1</i>	ATCT- TACGGCCGAGCAT GAA	GAGAA- TCTGGTCTCCCT CT	156	ENS- DARG00000079 374

**Tabla 4:** Secuencias de los cebadores utilizados en la PCR cuantitativa a tiempo real.

Todos los cebadores se diseñaron a partir de las secuencias de RNAm específicas de pez cebra (*Danio rerio*, estirpe AB), cumpliendo las siguientes normas:

- Tamaño entre 15 y 25 nucleótidos.

## ***Material y Métodos***

---

- Índice GC entre 50% y 60%.
- Temperatura de *melting* (Tm) entre 56°C y 60°C.

Se prestó especial atención a que las características antes descritas fueran lo más parecidas entre ambos cebadores.

Estas características fueron comprobadas mediante el programa Sequene Manipulation Suite: Version 2, disponible en internet (<http://www.protocol-online.org/tools/sms2/>). Con este programa también comprobamos que los cebadores no formaran horquillas, ni que hibridaran consigo mismo ni con el otro cebador. En ninguna de las parejas se observaron estos fenómenos.

Por último, con la aplicación informática BLAST (<http://www.ensembl.org/Multi/blastview>) comprobamos que los cebadores sólo hibridaran con una secuencia del genoma del pez cebra. Todos los cebadores hibridaron con una única secuencia.

### **3.6.4 Diseño de la recta patrón**

Antes de poder cuantificar el número de copias de RNAm es necesario obtener una recta patrón para cada uno de los cebadores utilizados. En esta recta patrón se expresa la concentración de DNAC utilizado y el ciclo en el cual el termociclador empieza a detectar fluorescencia. El paquete informático que utilizamos para analizar los resultados establece una línea umbral, a partir de la cual la cantidad de producto amplificado es suficientemente alta como para que el termociclador detecte la fluorescencia producida por el SYBR-Green al unirse al DNA de doble cadena. El ciclo en el cual la reacción cruza este umbral se denomina valor Ct. El valor Ct de las diluciones 1:10 a partir de las cuales se diseña la recta patrón para cada gen debe diferenciarse en 3,3 ciclos, y por ello se considera este número como pendiente perfecta de la recta patrón. De esta manera, la recta patrón resultante responde a la fórmula:

$$y = ax + b$$

Donde  $y$  es el logaritmo del número de copias del gen,  $a$  es la pendiente de la recta (pendiente perfecta=3,3),  $x$  es el valor Ct y  $b$  es el corte de la recta con el eje de ordenadas. Al elaborar la recta patrón, el valor Ct ( $x$ ) se consigue al hacer la

QRT-PCR y el logaritmo del número de copias ( $y$ ) presentes en una cantidad conocida de producto purificado se puede calcular a partir de la siguiente fórmula:

$$N^{\circ} \text{ copias} = \frac{\text{Conc}(\text{ng}/\mu\text{l})}{\text{Peso molecular amplicón} (\text{ng}/\text{moléc})}$$

$$\text{Peso molecular amplicón} = \frac{N^{\circ} \text{ nucleótidos} \times 330\text{Da} \times 2}{N^{\circ} \text{ de Avogadro}}$$

Otro parámetro importante que se tuvo en cuenta durante el análisis de la cuantificación fue el coeficiente de correlación ( $R^2$ ). Este valor indica la proximidad de las concentraciones resultantes en cada una de las reacciones que han tenido lugar considerándolas por triplicado. Cuanto más se aproxime a 1, más fiable será el resultado final y los resultados que no proporcionaron un  $R^2$  igual o superior a 0,98 fueron desechados.

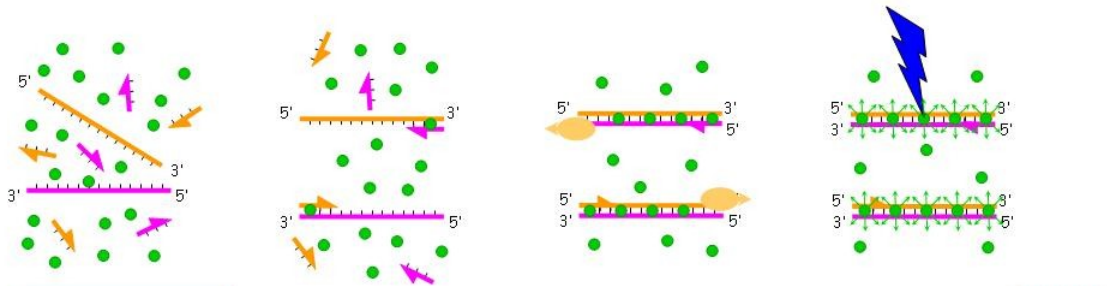
Para poner a punto la recta patrón de cada uno de los genes estudiados, realizamos una PCR básica con un termociclador GeneAmp PCR System 9700 de Applied Biosystems, sometiendo el producto final de la reacción a electroforesis en un gel con 1,5% de agarosa (BIORAD) y 0,5 mg/ml de bromuro de etidio, un agente intercalante que permite visualizar el producto de reacción. La banda resultante e identificada por luz UV se recortó con una cuchilla y el producto se extrajo y purificó con el kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). Después se midió la concentración del producto mediante un NanoPhotometer<sup>TM</sup> y se realizaron 9 diluciones seriadas 1:10, con el fin de cubrir un amplio espectro de concentraciones y que los datos obtenidos a partir de la recta patrón fueran de mayor fiabilidad.

Continuando con la puesta a punto de la recta patrón se realizaron qPCRs tal y como se indica en el siguiente apartado, utilizando como muestras las distintas diluciones: 1 mg/ml, 100 ng/ml, 10 ng/ml, 1 ng/ml, 0,1 ng/ml, 0,01 ng/ml, 0,001 ng/ml, 0,0001 ng/ml y 0,00001 ng/ml. Según los resultados obtenidos se diseñó una recta patrón óptima para cada marcador, utilizando las 3 diluciones seguidas que mejor pendiente proporcionaban, considerando la pendiente perfecta con un valor de -3.3.

### 3.6.5 QRT-PCR

Para la PCR cuantitativa a tiempo real (Fig. 17) hemos utilizado SYBR-Green Power Mix (Applied Biosystems), que incluye Taq Polimerasa, nucleótidos, Tampón,  $MgCl_2$  y agua, todo en una concentración 2X. Así, a cada reacción se añaden 10  $\mu$ l de SYBR-Green Power Mix, 1  $\mu$ l de DNAc de concentración 10  $\mu$ g/ $\mu$ l, 0.8  $\mu$ l de oligonucleótido *forward*, 0.8  $\mu$ l de oligonucleótido *reverse* y 7,4  $\mu$ l de agua libre de nucleasas. El programa de amplificación que se utilizó tanto con las muestras de embriones como con las rectas patrón en el termociclador ABI7300 (Applied Biosystems) fue el siguiente: 2 minutos a 50° C, 10 minutos a 95° C, 40 ciclos de 15 segundos a 95° C y 1 minuto a 56° C. Las qPCRs se realizaron por triplicado en cada experimento y el número de grupos para cada tratamiento fue mayor o igual a 3.

El programa informático incorporado de Applied Biosystems nos proporciona el valor Ct que al ser sustituido en la recta patrón correspondiente, nos proporciona el logaritmo del número de copias de producto final de PCR (DNA), a partir del cual se obtiene el número total de copias.



**Fig. 17:** Resumen de la PCR cuantitativa a tiempo real. Tras la unión de los cebadores se produce la síntesis de las cadenas de DNA. El Sybr-Green se une a la doble hebra y, solo entonces, emite fluorescencia.

### 3.7 HIBRIDACIÓN *IN SITU*

Para la realización de la técnica de HIS todo el material utilizado, tanto líquido como sólido, se autoclavó previamente para eliminar las RNAsas presentes en los materiales y que podrían degradar el RNAm.

### 3.7.1 Obtención de ribosondas

Para la realización de HIS se utilizaron ribosondas sintetizadas a partir de plásmidos amablemente cedidos por diversos laboratorios (Tabla 5).

Ribosonda	Procedencia	Enzima de restricción	Polimerasa
<i>hgg1</i>	S. Wilson (UCL)	XhoI	T3
<i>hlx1</i>	S. Wilson (UCL)	XbaI	T7
<i>ntl</i>	S. Wilson (UCL)	HindIII	T7
<i>otx2</i>	S. Wilson (UCL)	EcoRI	T7
<i>pax6a</i>	S. Wilson (UCL)	SmaI	T7
<i>rhoA</i>	B.C. Low (Singapur)	HindIII	T7
<i>rnd1</i>	M. Tada (UCL)	BamHI	T7
<i>rnd1like</i>	M. Tada (UCL)	HindIII	T3
<i>rx1</i>	S. Wilson (UCL)	EcoRI	Sp6
<i>rx2</i>	S. Wilson (UCL)	EcoRI	Sp6
<i>rx3</i>	S. Wilson (UCL)	XbaI	T7
<i>six3a</i>	S. Wilson (UCL)	BamHI	T7
<i>Snail1a</i>	A. Barrallo (INA)	NcoI	Sp6
<i>zic2</i>	S. Wilson (UCL)	EcoRI	Sp6

**Tabla 5:** Características de las ribosondas utilizadas en la presente Tesis Doctoral.

El primer paso consistió en la amplificación del plásmido circular en bacterias, con el fin de obtener una mayor cantidad del mismo para la síntesis de la ribosonda. Para este fin se utilizaron bacterias termo-competentes One shot® Top10F' (Invitrogen) y se siguió el protocolo indicado por el fabricante. Brevemente, el vial con las bacterias se descongeló en hielo durante media hora y se añadió 1 µl de plásmido circular disuelto en agua. A continuación el vial se introdujo 30 segundos en un baño a 42°C e inmediatamente después se dispusieron otra vez en hielo. Se

## *Material y Métodos*

---

añadieron al vial 250 µl de medio SOC precalentado a 37°C (este medio es suministrado por el fabricante). El vial se mantuvo en agitación rotacional a 37°C y 225 rpm durante una hora y a continuación distintas cantidades del medio con las bacterias se pipetearon en placas Petri con medio LB Agar (Sigma) suplementado con ampicilina. Todos los plásmidos portaban el gen de resistencia a ampicilina, de manera que solo aquellas bacterias transformadas eran capaces de sobrevivir. Las bacterias se crecieron en una estufa a 37°C durante una noche. A continuación se seleccionaron colonias individuales que se crecieron a 37°C en medio LB Broth líquido (Sigma) durante una noche a 225 rpm. De esta manera se obtienen gran cantidad de bacterias que portan el plásmido que nos interesa.

Para extraer el plásmido de las bacterias se procedió al lisado y purificación del plásmido utilizando el kit QIAprepr® Spin Miniprep (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió la concentración del producto final y se realizaron las diluciones pertinentes para obtener soluciones de trabajo a una concentración de 0,5 mg/ml.

A partir del plásmido circular se sintetizaron las ribosondas mediante dos pasos. El primero consiste en la linealización del plásmido mediante el uso de una enzima de restricción situada en el extremo 3' de la secuencia a sintetizar. Para ello se incubaron 10 µl de plásmido, 4 µl del tampón correspondiente a la enzima de restricción, 2 µl de enzima de restricción (Tabla 5) y 4 µl de agua ultrapura, durante dos horas en un baño a 37°C. El resultado de la reacción se purificó con el kit QIAquick® PCR purification Kit (Qiagen), utilizando las instrucciones del fabricante. Una pequeña cantidad del producto obtenido se corrió en un gel de agarosa al 1% para comprobar la correcta linealización.

Tras la linealización se procedió a la síntesis de las ribosondas mediante una incubación de 5 µl del plásmido lineal, 2 µl de nucleótidos marcados con digoxigenina (Roche), 1 µl de inhibidor de RNasas (Promega), 5 µl de tampón (Promega), 1 µl de DTT (Promega), 1 µl de RNA polimerasa (Promega) (Tabla 4) y 5 µl de agua ultrapura, durante dos horas en un baño a 37°C. Para eliminar el DNA lineal que no servía, el producto resultante de la utilización del kit fue tratado con DNasa [20 µl de mezcla; 1 µl de DNasa I (Roche); 3 µl de tampón] durante 15 minutos a 37°C. La reacción se detuvo añadiendo 1 µl de EDTA 0,5 M y calentando

la solución 10 minutos a 75°C.

Por último, para purificar la ribosonda se añadieron 75 µl de agua ultrapura, 200 µl de etanol puro frío y 10 µl de LiCl 4M y la solución se mantuvo a -20°C durante una noche. Al día siguiente, las soluciones se centrifugaron a 13000 rpm y 4°C durante 15 minutos. Tras la centrifugación, se retira el sobrenadante y el pellet visible se resuspende en 25 µl de solución Hyb+ (ver composición en el apartado de “protocolo de hibridación *in situ*”) y se mantuvo a -80°C hasta su uso.

Las ribosondas durante la HIS se utilizan diluídas 1/100 en medio Hyb+. Además, las diluciones se reciclan y se utilizan varias veces.

### 3.7.2 Protocolo de hibridación *in situ*

Para la realización de la HIS, los embriones mantenidos en metanol se rehidrataron en PBS con Triton X-100 al 0,1% (PBST 0,1) con un paso intermedio en 50% metanol y 50% PBST 0,1. Tras la rehidratación, los embriones fueron tratados con una solución de proteinasa K (PK, Sigma) para permeabilizarlos y así permitir la entrada de la ribosonda. La concentración de PK utilizada dependió de la edad del embrión tal y como se detalla en la tabla 6.

Edad	Concentración PK	Duración del tratamiento (min)
12 somitos o inferior	No es necesaria	
12somitos-24 hpf	10µg/ml	5
24 hpf	10µg/ml	10
48 hpf	10µg/ml	30
3 dpf	20µg/ml	30
5 dpf	40µg/ml	30

**Tabla 6:** Duración y concentración del tratamiento con PK.

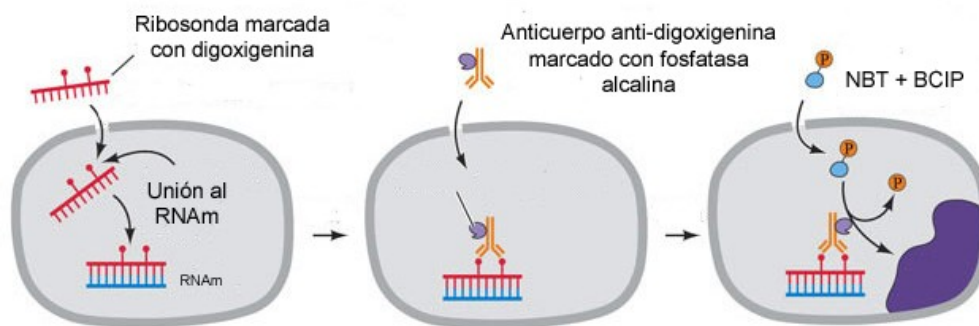
A continuación los ejemplares se postfijaron en PFH al 4% durante veinte minutos a TA y se lavaron varias veces durante una hora en PBST 0,1. Tras ello, se procedió a la prehibridación durante dos horas en un termobloque a 68°C en la solución de hibridación Hyb+ sin la ribosonda [50% de formamida (Sigma); 25% de SSC 20x (NaCl 3M; Citrato tri-sódico 0,34M ); 0,5 mg/ml de RNA de levadura



## Material y Métodos

(Sigma); 0,05 mg/ml de heparina (Sigma); ácido cítrico 1mM; 0,1% de Tween20 (Sigma)] y posteriormente se añadió la ribosonda diluida en solución Hyb+. Los embriones se mantuvieron en dicha solución a 68°C durante una noche.

Tras la hibridación los embriones se sometieron a cuatro lavados de media hora de duración cada uno, en solución Hyb- (50% de formamida; 25% de SSC20x; 0,1% tween20), seguida de un aclarado en SSC 2x y dos lavados de media hora en solución SSC 0,2x. A continuación los embriones se lavaron varias veces durante una hora en PBST 0,1, y se preincubaron 2 horas en solución MAB [Ácido Málico 0,1M; NaCl 0,15M; 2% de Bloking Reagen (Roche) pH 8]. Tras ello se procedió a la incubación en medio MAB con suero antidigoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Roche Applied Science) durante una noche a 4°C (Fig. 18).



**Fig. 18:** Esquema de la técnica de HIS revelada mediante fosfatasa alcalina.

El exceso de anticuerpo se retiró mediante varios lavados en PBST 0,1 durante 2 horas. A continuación se incubaron los embriones en medio Xpho (Tris HCL pH 9,5 0,1M; MgCl<sub>2</sub> 50mM; NaCl 0,1M; Triton X-100 0,1%) durante media hora; y por último se procedió al revelado de las secciones en dicha solución a la que se añadió 1 µl de NBT (Roche) y 3.5 µl de BCIP (Roche) por ml de Xpho (Fig. 18).

El desarrollo de la reacción se siguió bajo la lupa y se detuvo mediante varios lavados en PBST 0,1 y postfijación en PFH 4% durante una noche a 4 °C. Los embriones se deshidrataron en una batería creciente de glicerol (30%, 50%, 70% y 100%) donde se mantuvieron hasta su fotografiado.

Se realizaron los siguientes controles para comprobar la especificidad del marcaje:

- 1.- Realización del protocolo descrito sin la correspondiente ribosonda antisentido.
- 2.- Hibridación con la correspondiente ribosonda sentido.
- 3.- Hibridación previo tratamiento con RNasa A.
- 4.- Incubación de las secciones sin el anticuerpo anti-digoxigenina-fosfatasa alcalina.

En ningún caso se obtuvo marcaje positivo.

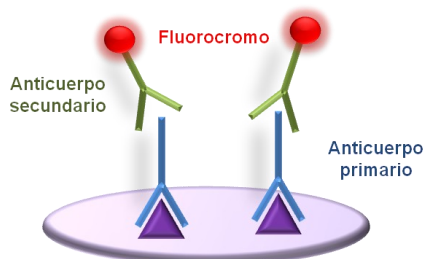
### 3.8 INCORPORACIÓN DE BRDU

Para analizar la proliferación celular diseñamos experimentos de incorporación de BrdU en embriones control y ciclópeos de 48 hpf, 3 y 5 dpf. Para ello, incubamos los embriones descorionados en una placa Petri con una solución de BrdU 10 mM (Roche) con 12% de DMSO (Roche) durante 2 horas a 28,5°C. Tras ello, los embriones fueron fijados y se obtuvieron secciones tal y como se ha indicado anteriormente.

### 3.9 INMUNOHISTOQUÍMICA

#### 3.9.1 Inmunohistoquímica fluorescente en secciones

Para realizar la técnica inmunohistoquímica fluorescente (Fig. 19) se dejaron secar las secciones obtenidas en el criostato a TA durante al menos dos horas, y se rehidrataron mediante tres lavados de cinco minutos en PBS. Exclusivamente para la detección de BrdU antes de la preincubación, las secciones eran lavadas en



**Fig. 19:** Esquema de la inmunohistoquímica fluorescente.

tampón HCl 2N a 37°C durante 30 minutos y después en tampón borato pH=8. A continuación se preincubaron con una solución compuesta por 5% de suero de cabra y 0,2% de Triton X-100 en PBS durante dos horas a TA. A esta solución de preincubación se le añadió DMSO al 1% cuando se pretendía marcar factores de transcripción

## Material y Métodos

(Pax2, Pax6 y Prox1). Las secciones se incubaron en la solución anterior más el anticuerpo primario (Tabla 7) durante 1 noche a TA. Tras la incubación con el anticuerpo se lavaron tres veces durante cinco minutos, en agitación, en PBS con gelatina de pez (Sigma) para eliminar la autofluorescencia y el exceso de anticuerpo. Las secciones se incubaron con una solución compuesta por 5% de suero de cabra, 0,2% de Triton X-100 y una dilución 1/250 del anticuerpo secundario (Tabla 8) en PBS durante una hora a TA. Los núcleos se contrastaron con DAPI y tras varios lavados en PBS se montaron con la solución ProLong® Gold Antifade Reagent (Invitrogen).

Antígeno	Anticuerpo	Dilución de uso	Casa comercial	Testado en
BrdU	IgG de rata, monoclonal	1:5000	Accurate	Molécula exógena
Calretinina (CR)	IgG de ratón, monoclonal	1:10000	Swant	Castro <i>et al.</i> , 2006
Glutamina sintetasa (GS)	IgG de rata, monoclonal	1:1000	Chemicon	Cid <i>et al.</i> , 2010
Pax2	IgG de conejo, policlonal	1:250	Covance	Sánchez-Simón <i>et al.</i> , 2010
Pax6	IgG de conejo, policlonal	1:1000	Covance	Sánchez-Simón <i>et al.</i> , 2010
Prox1	IgG de conejo, policlonal	1:1000	Covance	Cid <i>et al.</i> , 2010
Tirosina hidroxilasa (TH)	IgG de ratón, monoclonal	1:800	Chemicon	Arenzana <i>et al.</i> , 2006a
Zpr1	IgG de rata, monoclonal	1:200	ZIRC	Específico
Zpr3	IgG de rata, monoclonal	1:200	ZIRC	Específico

**Tabla 7:** Anticuerpos primarios utilizados en la técnica inmunohistoquímica fluorescente sobre secciones.

Antígeno	Anticuerpo	Conjugado con	Casa comercial
IgG de rata	IgG de cabra	Cy2	Jackson
IgG de ratón	IgG de cabra	Cy2	Jackson
IgG de ratón	IgG de cabra	Alexa 633	Sigma
IgG de conejo	IgG de cabra	Cy2	Covance
IgG de conejo	IgG de cabra	Alexa 488	Sigma

**Tabla 8:** Anticuerpos secundarios utilizados en la técnica inmunohistoquímica fluorescente.

### 3.9.2 Inmunohistoquímica *in toto*

Los embriones se rehidrataron mediante varios lavados en PBS con Triton X-100 al 0,5% (PBST 0,5), y, con el fin de permeabilizarlos, se trataron con PK a una concentración y durante un tiempo que dependió de la edad (Tabla 6).

Tras dos lavados en PBST 0,5, los embriones se postfijaron en PFH para eliminar cualquier resto de PK. A continuación se dieron varios lavados durante una hora con PBST 0,5. Antes de incubar en el anticuerpo los embriones se preincubaron en una solución compuesta por 10% de suero y 1% de DMSO en PBST 0,5. Posteriormente, los embriones se incubaron durante una noche a TA en una solución como la anterior a la que se añadió el anticuerpo primario (Tabla 9).

Antígeno	Anticuerpo	Dilución	Casa comercial	Testado en
GFP	IgG de conejo, policlonal	1:1000	Sigma	Molécula exógena
Tubulina $\alpha$ -acetilada	IgG de ratón, monoclonal	1:1000	Sigma	Kim <i>et al.</i> , 2008
Zo1	IgG de ratón, monoclonal	1:250	Invitrogen	Zhang <i>et al.</i> , 2010

**Tabla 9:** Anticuerpos primarios utilizados en la técnica inmunohistoquímica fluorescente *in toto*.

Los embriones se lavaron en PBST 0,5 varias veces durante dos horas y se incubaron durante una noche a 4°C en una solución compuesta por 10% de suero, 1% de DMSO y anticuerpo secundario (Tabla 8) en PBST 0,5.

Tras la incubación con el anticuerpo secundario, los embriones se lavaron varias veces con PBST 0,5 y se contrastaron los núcleos con *sytox* (Sigma).

## 3.10 ANÁLISIS DE IMAGEN

### 3.10.1 Microscopía de campo claro y epifluorescencia

Las imágenes de las secciones se obtuvieron con un fotomicroscopio Olympus Provis AX70 equipado con campo claro y epifluorescencia, conectado a una cámara

digital Olympus DP70.

### **3.10.2 Microscopía electrónica**

Las rejillas con las secciones ultrafinas se visualizaron en un microscopio electrónico ZEISS-EM 900 con una cámara TRS (Slow Scan CCD) acoplada y las imágenes se tomaron con el programa informático ImageSP Viewer.

### **3.10.3 Lupa**

Para obtener imágenes de las HIS se utilizó una lupa Leica M165FC a la que se acopló una cámara Leica DFC 500 con el programa Leica Application Suite V3.

### **3.10.4 Microscopía confocal**

Para la visualización de embriones vivos y realización de *time-lapses* (obtención de imágenes de confocal seriadas durante varias horas) los embriones se descorionaron con unas pinzas a la edad de 2 ó 3 somitos y su fluorescencia fue comprobada en una lupa. Los embriones se encastraron en una solución de agar al 1,3% en medio E3 sobre un cubreobjetos. El embrión se orientó con el fin de obtener imágenes coronales en el microscopio confocal. Tras la polimerización del agar, el bloque se cubrió con un portaobjetos y se llevó al microscopio confocal donde se colocó en una placa Petri que se rellenó con agua. Cada 3 minutos se tomó una serie de secciones en el eje z. Los embriones *ath5:GFP* y aquellos en los que se realizó la inmunohistoquímica contra Zo1 se prepararon de la misma forma.

Las imágenes confocales se tomaron utilizando un microscopio confocal SPE con un objetivo de inmersión en agua de 40 o 63 aumentos y una apertura numérica de 0,8. Todas las imágenes de microscopía confocal se procesaron utilizando el software proporcionado por Leica y el programa Volocity (Improvision).

### **3.10.5 Modificación final de las imágenes**

Por ultimo, las propiedades de luz y brillo de todas las imágenes fueron modificadas con el programa Adobe Photoshop CS5 para que reflejara lo visto en los microscopios.

## 3.11 TOMA DE MEDIDAS Y CONTEOS

### 3.11.1 Medición de la distancia entre núcleos

Para este estudio se utilizaron embriones de la línea transgénica Gsc:GFP amablemente cedida por el Prof. Tada. Los animales se trataron tal y como se ha indicado en el apartado correspondiente y se tomaron imágenes de microscopia confocal de 1  $\mu\text{m}$  de grosor de la región de la placa precordial anterior.

Con las series de imágenes obtenidas se hizo una reconstrucción tridimensional utilizando el programa Volocity. Tras localizar las células de la placa precordial que expresan la proteína GFP fusionada a la proteína Goosoid, exclusiva de esta región del embrión, se seleccionaron al azar tres células por embrión. Gracias a la reconstrucción conseguida fue relativamente fácil localizar el centro del núcleo celular y trazar una línea desde éste al centro del núcleo de una célula adyacente. De esta manera obtuvimos la medida de la distancia entre el centro del núcleo de dos células adyacentes. Este proceso se repitió tres veces por cada célula seleccionada, por lo que realizamos un mínimo de nueve medidas por embrión y se utilizaron al menos tres embriones por cada grupo experimental.

### 3.11.2 Medición de la migración de la placa precordial

*hlx1* marca la parte posterior y central de la placa precordial y permite cuantificar el efecto producido por el etanol en la migración de la misma. Tras la realización de la técnica de HIS contra el RNAm de dicho gen, se tomaron imágenes a bajo aumento de todos los grupos experimentales. El patrón de expresión de *hlx1* es una línea recta que puede ser fácilmente medida. Para ello utilizamos el programa ImageJ. Se midieron 30 ejemplares por cada grupo experimental.

### 3.11.3 Conteo de células

Con el fin de analizar las alteraciones en la diferenciación de las áreas visuales de los ejemplares ciclópeos contamos el número de células positivas para cada uno de los marcadores, tanto en la retina como el techo óptico, con la ayuda

## *Material y Métodos*

---

del programa ImageJ. Debido a que los ejemplares ciclópeos presentan una retina y un techo óptico mas pequeños, utilizando el mismo programa medimos el área sobre la cual contábamos las células. Así, en la mayoría de los casos el resultado está expresado en número de células/área. En los casos en los que un marcador se expresaba en una única población celular muy localizada se contó el número total de células.

Se contaron las células y se midió el área en un mínimo de tres secciones por embrión, obteniendo una media de células/área observadas en ese embrión y se contaron un mínimo de tres embriones por cada marcador y grupo experimental.

### **3.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico de todos los resultados se realizó mediante el programa Prism 4.0 (GrapPad). En todos los casos se realizó una comparación mediante una T de Student con una corrección de Welch entre el grupo tratado y su respectivo control. Un valor  $p < 0,05$  fue considerado como significativo. Se utilizó el mismo programa para realizar las distintas representaciones graficas, aunque éstas fueron posteriormente modificadas con el programa Adobe PhotoShop CS5.

# Resultados

---



## 4.1 EFECTOS DEL ETANOL DURANTE LA GASTRULACIÓN

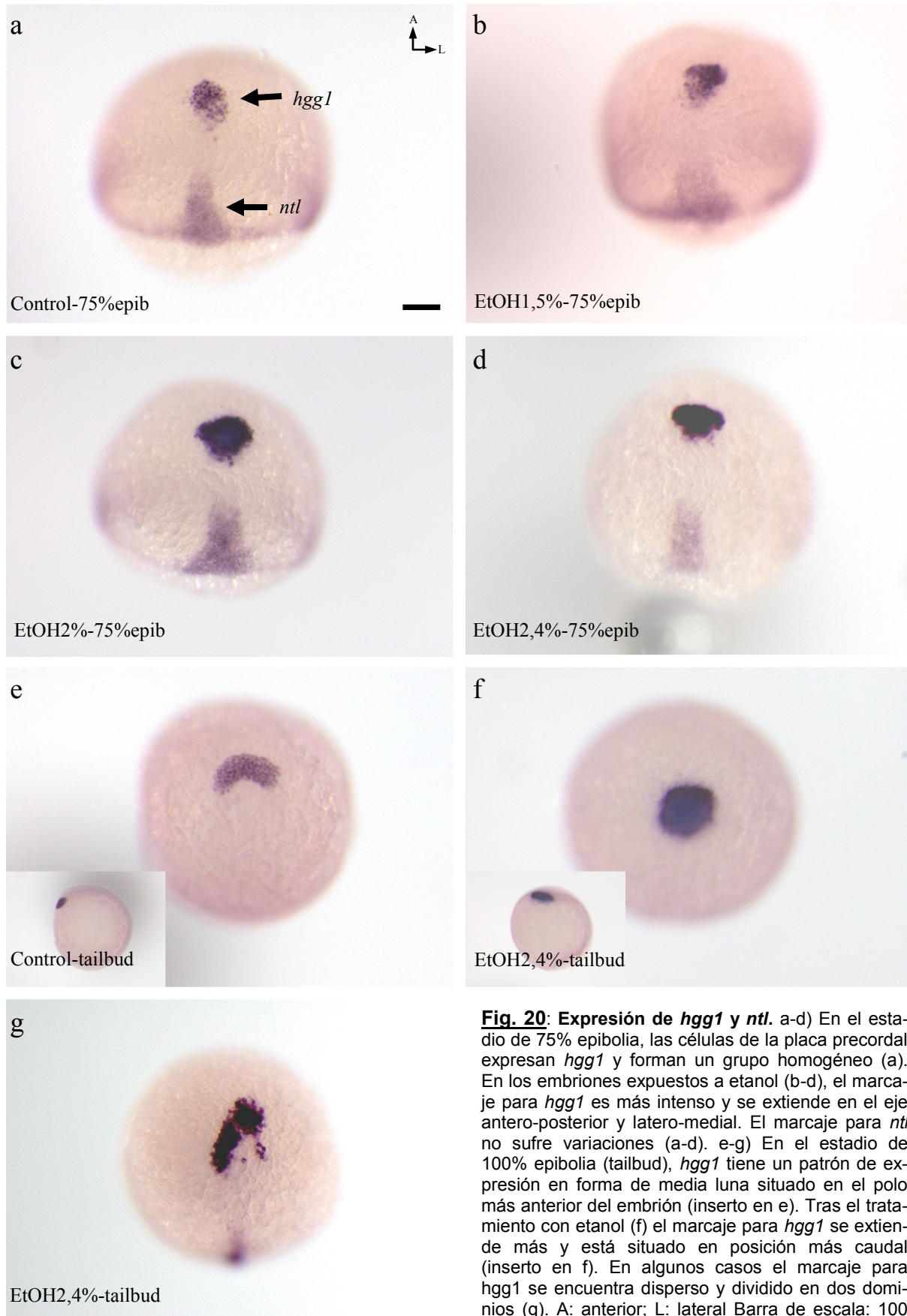
Desde hace años se sabe que el etanol altera gravemente la gastrulación, aunque no se conocen los mecanismos celulares a través de los cuales actúa. Además, las alteraciones producidas en esta etapa del desarrollo causan graves efectos en el sistema visual. En consecuencia, el conocimiento de la acción del alcohol en el proceso de gastrulación, nos ayudará a analizar y comprender sus efectos sobre el desarrollo del sistema visual.

### 4.1.1 Alteración de la migración de la placa precordal

Para comprobar si se produce alteración en la migración de la placa precordal, como ya describieron Blader y Strähle en 1996, realizamos una doble HIS contra *hgg1*, marcador específico del margen anterior de la placa precordal, y *ntl*, marcador de la notocorda (Fig. 20). El marcaje con *ntl* nos sirvió como control interno para comprobar si el etanol afecta a todas las estructuras o sólo específicamente a algunas como la placa precordal. La HIS se realizó en el estadio de 75% epibolia y al final de la gastrulación.

En los ejemplares control, en el estadio de 75% de epibolia, la placa precordal alcanza el polo animal y las células que la constituyen forman un grupo homogéneo (Fig. 20a). En este estadio algunas células en posición más caudal todavía no han llegado al extremo anterior. Las células de la notocorda que expresan *ntl* forman una banda estrecha que se origina en el anillo germinal y se extiende hacia la región anterior, por detrás de la placa precordal (Fig. 20a). Tras el tratamiento con etanol (Fig. 20b-d) el marcaje en la notocorda se mantiene similar al observado en los controles. Sin embargo, el marcaje de *hgg1* es más intenso y extendido, ocupando un área mayor en el eje antero-posterior, lo que revela un retraso en la migración de la placa precordal. También se extiende más en el eje latero-medial, lo que indica una desorganización interna de la placa precordal. Este efecto es más claro en los embriones tratados con concentraciones más elevadas de etanol (Fig. 20c, d), lo que demuestra que el efecto del etanol sobre la migración de la placa precordal es dependiente de la dosis.

## Resultados



**Fig. 20: Expresión de *hgg1* y *ntl*.** a-d) En el estadio de 75% epibolia, las células de la placa precordial expresan *hgg1* y forman un grupo homogéneo (a). En los embriones expuestos a etanol (b-d), el marcaje para *hgg1* es más intenso y se extiende en el eje antero-posterior y latero-medial. El marcaje para *ntl* no sufre variaciones (a-d). e-g) En el estadio de 100% epibolia (tailbud), *hgg1* tiene un patrón de expresión en forma de media luna situado en el polo más anterior del embrión (inserto en e). Tras el tratamiento con etanol (f) el marcaje para *hgg1* se extiende más y está situado en posición más caudal (inserto en f). En algunos casos el marcaje para *hgg1* se encuentra disperso y dividido en dos dominios (g). A: anterior; L: lateral Barra de escala: 100  $\mu$ m.

Al final de la gastrulación (100% epibolia o *tailbud*), en los ejemplares control, *hgg1* se expresa en una banda estrecha con forma de media luna en la región más anterior del animal (Fig. 20e). Se observa cómo el proceso de epibolia ya ha terminado (inserto en Fig. 20e). Sin embargo, en los animales expuestos a 2,4% de etanol, se pierde el patrón de expresión en forma de media luna (Fig. 20f), el marcaje para *hgg1* es mucho más intenso y se ha extendido en el eje antero-posterior.

La epibolia sufre graves retrasos y la placa precordial no llega a una posición tan anterior como en los ejemplares control (inserto en Fig. 20f). Se observan con frecuencia fenotipos aberrantes en los que las células de la placa precordial han perdido la cohesión entre ellas y forman un dominio extendido y partido en dos (Fig. 20g). Este fenotipo extremo sólo se observa en algunos ejemplares tratados con 2,4% de etanol.

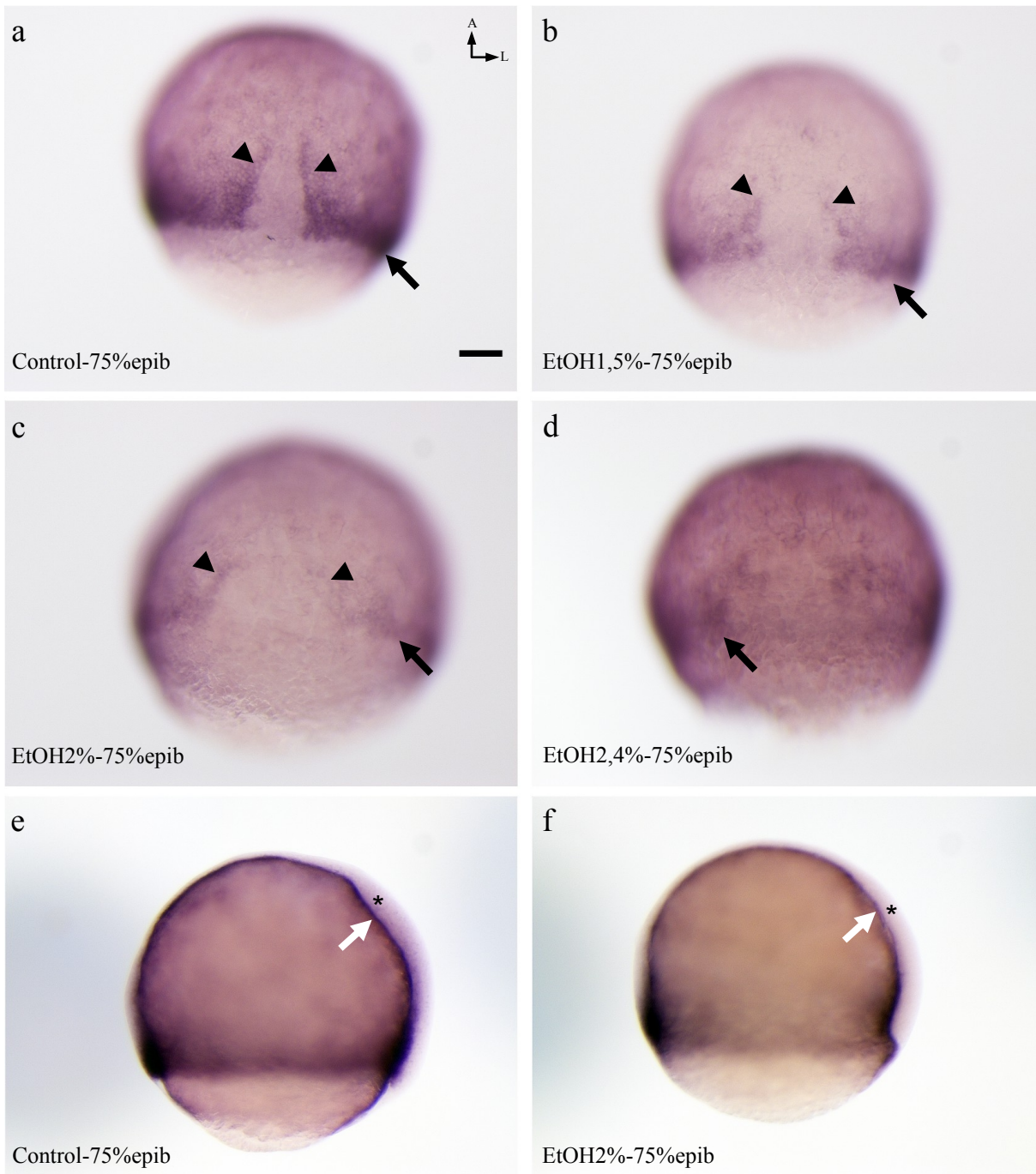
Estos resultados demuestran que el etanol induce un fallo en la migración de la placa precordial y una desunión de las células que la constituyen.

### 4.1.2 Patrón de expresión de *snail1a*

Mediante HIS analizamos el patrón de expresión de *snail1a* en el estadio de 75% epibolia, momento en el que la placa precordial alcanza el polo animal del embrión. *Snail1a* se expresa en el anillo germinal, en las células adaxiales que se encuentran a ambos lados de la notocorda y en las células que subyacen a la placa precordial (Fig. 21a, e). El marcaje de las células adaxiales se extiende desde el anillo germinal hasta la región media del embrión. En los embriones expuestos a 1,5% de etanol (Fig. 21b) el marcaje también se encuentra en el anillo marginal y en las células adaxiales, aunque en esta última región está reducido y no alcanza la misma extensión que en los ejemplares control (Fig. 21a). El marcaje de todos los dominios se encuentra reducido en los embriones expuestos a una solución de 2% de etanol (Fig. 21c). En la mayoría de los embriones expuestos a 2,4% de etanol (Fig. 21d), el marcaje del anillo germinal apenas se aprecia y el de las células adaxiales desaparece totalmente. En vistas laterales se aprecian mejor las células positivas para *snail1a* que subyacen a la placa precordial y van un poco por delante de ésta (Fig. 21e), la exposición a etanol también reduce este marcaje (Fig. 21f).

## Resultados

Estos resultados nos permiten afirmar que la expresión de *snail1a* se reduce en los embriones expuestos a etanol, de manera similar en todos los dominios.

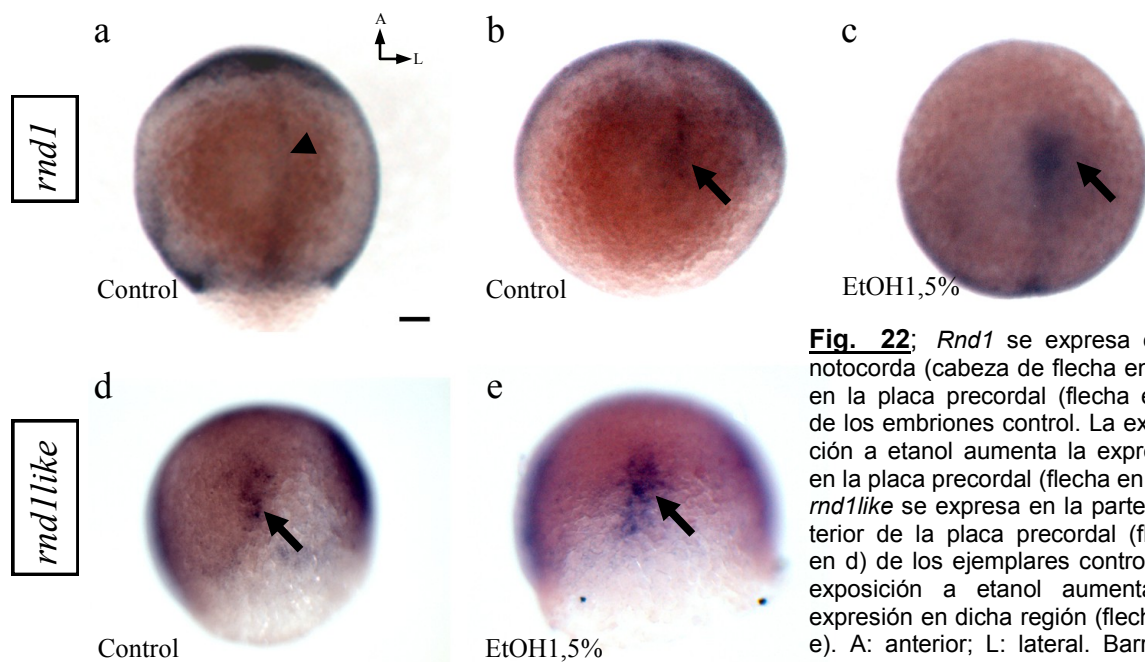


**Fig. 21: Expresión de *snail1a*.** Este factor de transcripción se expresa en el anillo germinal (flechas negras a-d) y en las células adaxiales (cabezas de flecha a-d). En los embriones expuestos a 1,5% etanol (b) el marcaje de las células adaxiales se reduce pero el del anillo germinal se mantiene. El efecto es todavía mayor en los embriones expuestos a 2% (c) y 2,4% (d) de etanol, en los que el marcaje ha desaparecido de las células adaxiales y prácticamente del anillo germinal. En los ejemplares control (e) algunas células que expresan *snail1a* (flechas blancas), subyacen a la placa precordial (asteriscos). Este marcaje se reduce claramente en los ejemplares expuestos a 2,4%. A: anterior; L: lateral. Barra de escala: 100  $\mu$ m.

### 4.1.3 Analisis de la expresion de las GTPasas

Las GTPasas desempeñan un papel muy importante durante la migración de la placa precordial y, en cultivos celulares, se ha descrito que su expresión sufre alteraciones tras el tratamiento con etanol. Para comprobar si estos hechos tienen equivalencia *in vivo* estudiamos su expresión mediante HIS y QRT-PCR.

*Rnd1* se expresa en la notocorda (Fig. 22a) y en la placa precordial (Fig. 22b) de los ejemplares control. Tras el tratamiento con etanol hay un aumento de su expresión en la placa precordial (Fig. 22c). *Rnd1like* se expresa también en la placa precordial (Fig. 22d) y, tras el tratamiento con etanol, aumenta la expresión en esta región (Fig. 22e).



**Fig. 22;** *Rnd1* se expresa en la notocorda (cabeza de flecha en a) y en la placa precordial (flecha en b) de los embriones control. La exposición a etanol aumenta la expresión en la placa precordial (flecha en c). *rnd1like* se expresa en la parte posterior de la placa precordial (flecha en d) de los ejemplares control y la exposición a etanol aumenta su expresión en dicha región (flecha en e). A: anterior; L: lateral. Barra de escala: 150  $\mu$ m.

Debido a que las sondas utilizadas para realizar la HIS no parecían funcionar demasiado bien y no nos daban una información clara sobre la expresión de estos genes, analizamos ésta mediante PCR cuantitativa a tiempo real en embriones control y tratados con distintas concentraciones de etanol. No se observaron variaciones significativas en la expresión del gen de referencia usado, *ef1a*, en ninguno de los grupos experimentales (Fig. 23a)

Mediante QRT-PCR comprobamos que se produce un aumento muy significativo de la expresión de *rhoAa* en los ejemplares tratados con

## *Resultados*

---

concentraciones bajas de etanol (Fig. 23b). Sin embargo, cuando los embriones se tratan con concentraciones más altas de etanol el efecto no es tan claro. Además, no hay una relación entre dosis y sobre-expresión cuando se utilizan distintas concentraciones de etanol.

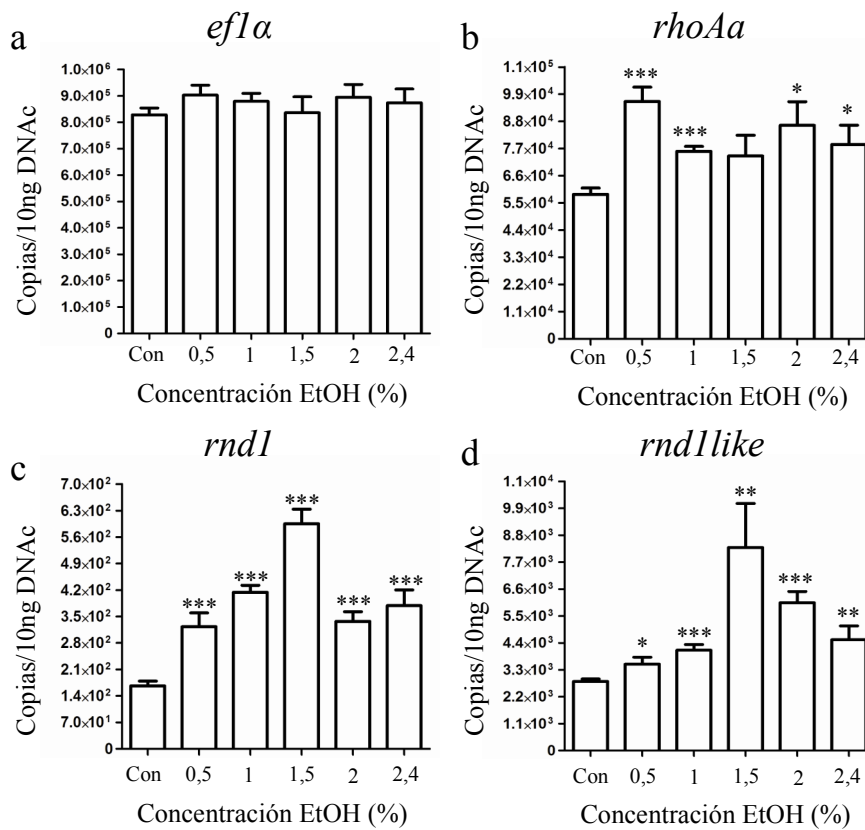
Hemos comprobado que el etanol aumenta de forma clara y significativa la expresión de *rnd1* (Fig. 23c) y de *rnd1like* (Fig. 23d). En ambos casos, el efecto de la exposición a etanol sobre la expresión de los genes es muy similar, habiendo un efecto dependiente de la concentración de etanol hasta 1,5%. Cuando se utilizan concentraciones de etanol de 2 y 2,4% el efecto sobre el aumento de la expresión no es tan evidente, aunque continúa siendo muy significativo. Este descenso se debe, posiblemente, a un efecto tóxico del etanol a concentraciones elevadas.

En el caso de *rnd1* (Fig. 23c) los ejemplares control expresan aproximadamente 140 copias de este gen, mientras que el número de copias en los animales expuestos a 1,5% de etanol se cuadruplica llegando a alcanzar más de 600, y en los embriones expuestos a 2% de etanol se detectan más de 350 copias, más del doble que en los ejemplares control.

El efecto del etanol sobre *rnd1like* es también muy evidente (Fig. 23d) y sigue el mismo patrón de aumentos que en el caso de *rnd1*. En los ejemplares control se alcanzan más de 2200 copias del gen. En los animales expuestos a 1,5% de etanol, que son los que muestran un mayor aumento de la expresión del gen, se observó que el número de copias alcanza más de 7700, en los tratados con 2,4% de etanol más de 4400 copias. Todo ello indica que el etanol es capaz de duplicar la expresión de *rnd1like*.

Estos datos indican que las GTPasas *rnd1* y *rnd1like* se expresan en la placa precordial y que la exposición embrionaria a etanol induce un aumento de su expresión que, además, depende de la concentración de etanol. El patrón de aumento de la expresión de *rnd1* y *rnd1like* es similar, alcanzándose un pico en la expresión cuando los embriones se exponen a 1,5% de etanol.

Los resultados obtenidos para *rhoAa* no son tan evidentes por lo que no se utilizó en los siguientes experimentos.



**Fig. 23:** Cuantificación de los niveles de expresión de *efla* (a), *rhoAa* (b), *rnd1* (c) y *rnd1like* (d) en el estadio de 75% epibolia por QRT-PCR. La exposición a etanol no afecta a la expresión del gen de referencia (a), pero aumenta claramente la expresión de *rhoAa* (b), sobre todo cuando se utilizan concentraciones bajas. La exposición embrionaria a etanol aumenta la expresión tanto de *rnd1* (c) como de *rnd1like* (d) de manera dosis dependiente, al menos hasta 1,5% de etanol.  
 \* = p<0,05;  
 \*\* = 0,05>p>0,001;  
 \*\*\* = p<0,001.

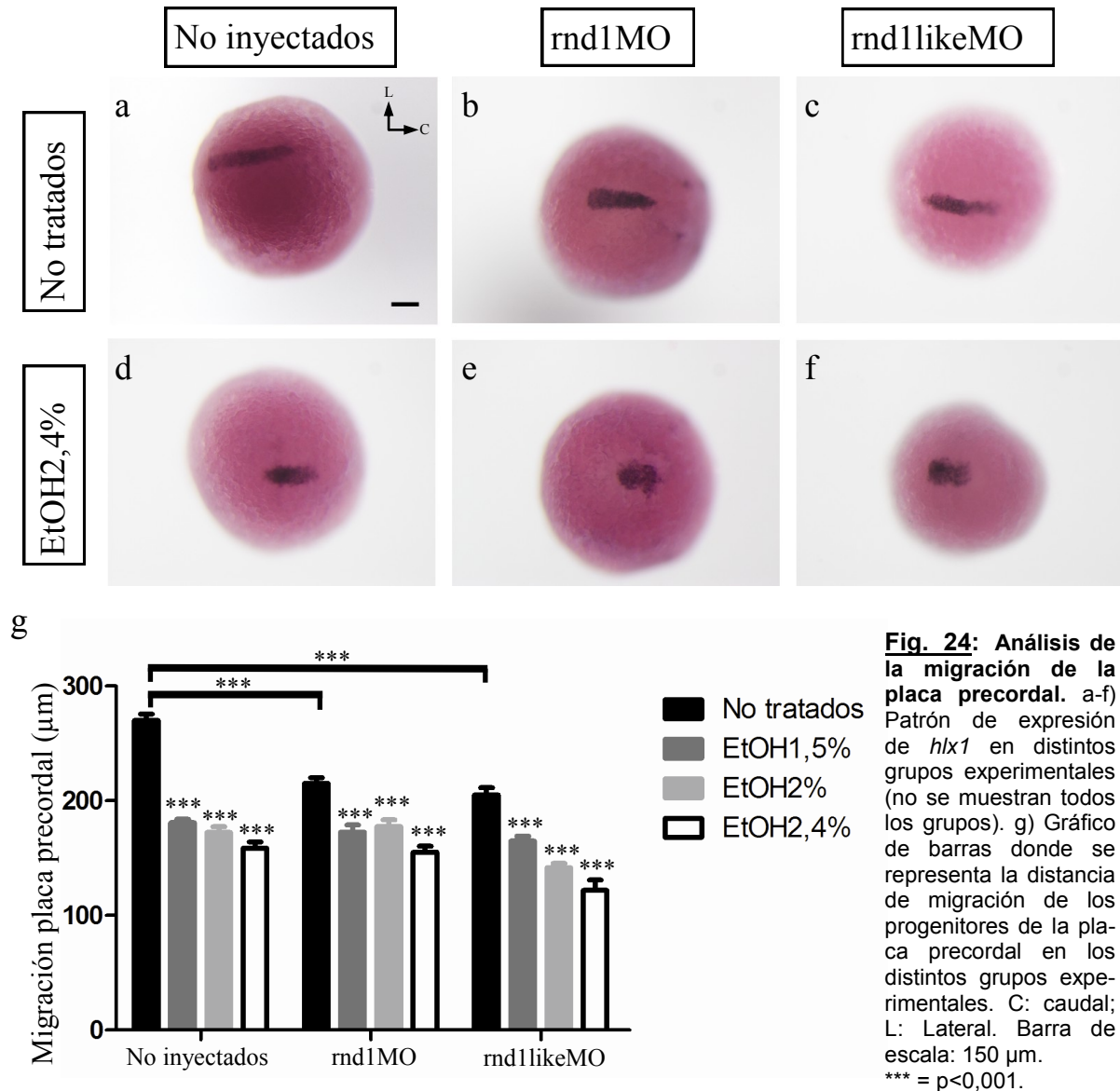
#### 4.1.4 Modificación de la expresión de las GTPasas

Para bloquear la traducción de *rnd1* y *rnd1like*, en algunos ejemplares se inyectaron los morfolinós (MO) de estos genes. Partíamos de la hipótesis de que la inyección de los MO conferiría cierta resistencia al embrión frente al etanol.

Los resultados los comprobamos realizando una HIS contra *hlx1*, un gen que se expresa en las células de la parte posterior y media de la placa precordial y que se utiliza como marcador de la progresión de la migración de dicha placa.

Realizamos la HIS en una serie de grupos experimentales: no inyectados [no tratados (Fig. 24a) y tratados (Fig. 24d)], inyectados con *rnd1*MO [no tratados (Fig. 24b) y tratados (Fig. 24e)] e inyectados con *Rnd1like*MO [no tratados (Fig. 24c) y tratados (Fig. 24f)].

## Resultados



Para facilitar el análisis medimos la migración con el programa *ImageJ* y lo representamos mediante un gráfico de barras (Fig. 24g). El etanol disminuye de forma significativa la migración de la placa precordial en los ejemplares no inyectados, incluso cuando son tratados con la concentración más baja, 1,5% de etanol. Hemos comprobado que la exposición de los embriones a 2,4% de etanol es la que induce un mayor retraso.

Cuando se analiza la migración de la placa precordial tras la inyección de los MO se observa una disminución significativa de ésta (Fig. 24g). Observamos una diferencia importante entre la inyección de ambos MO. La exposición a etanol de los embriones inyectados con el MO de *rnd1like* induce una disminución todavía mayor en la migración de la placa precordial respecto a los controles. Este efecto no



se produce en los embriones inyectados con el MO de *rnd1*, en los que la disminución de la migración es comparable a la producida en los embriones no inyectados. Por tanto, la inyección de MO no proporciona resistencia al etanol, al menos en lo que se refiere al proceso de migración global de la placa precordial.

La inyección del MO de *rnd1* y de *rnd1like* no sólo no confiere resistencia al embrión frente a la exposición a etanol, sino que por sí sola reduce significativamente la migración de la placa precordial y, además, agrava el retraso inducido por el etanol. Los resultados de la inyección de los dos MO simultáneamente no los mostramos ya que se produce un parón de la gastrulación y, finalmente, la muerte de los embriones.

### 4.1.5 Análisis de la unión entre células

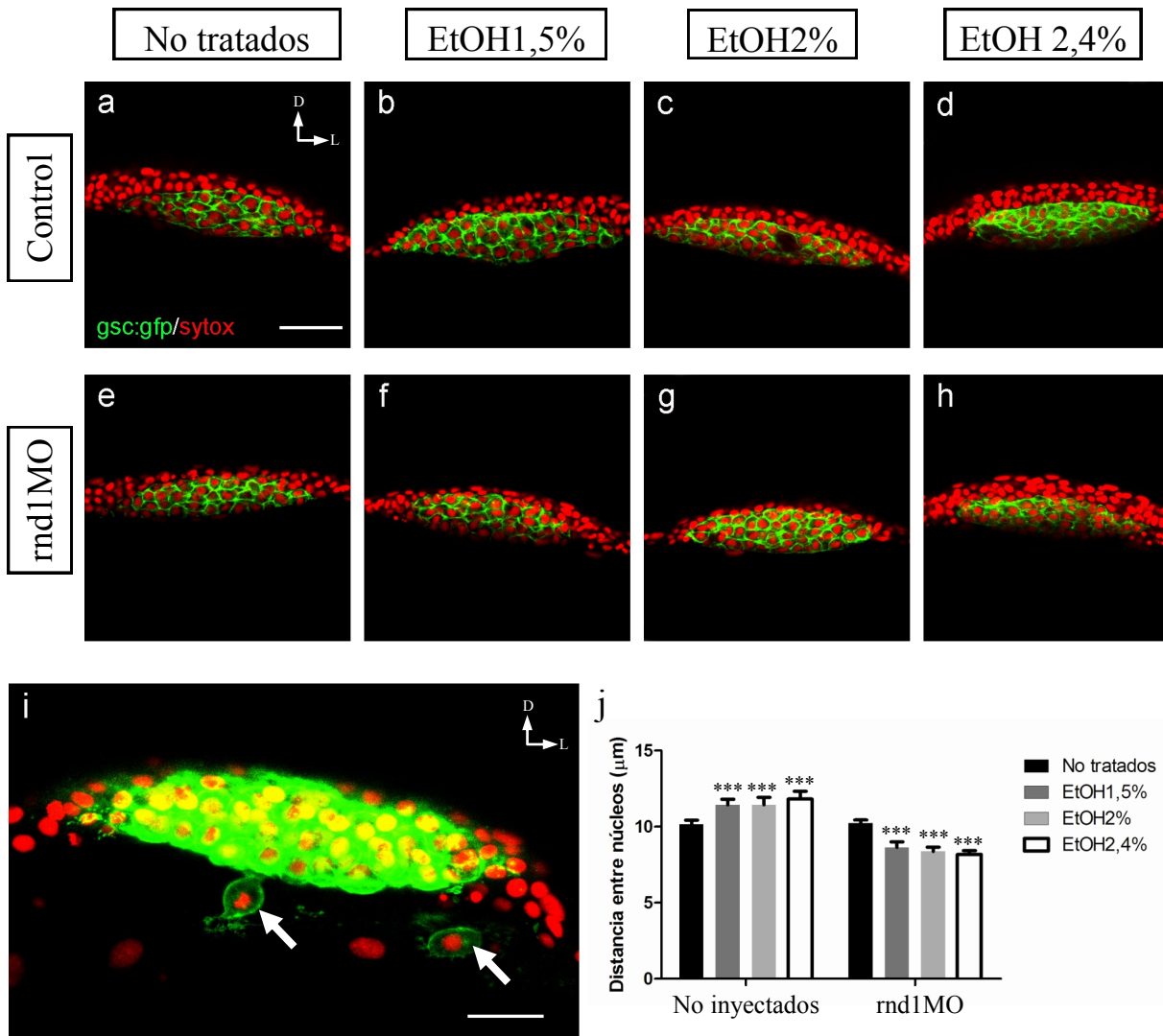
Durante la migración de las células de la placa precordial hay que tener en cuenta diversos factores, tales como la velocidad del movimiento de las células o la direccionalidad de las mismas. El factor que mayor relación tiene con las GTPasas es la cohesión de las células, el grado de unión entre ellas. Por ello, y aunque la inyección de los MO no revertía el fenotipo inducido por el etanol, decidimos analizar su efecto sobre la distancia celular dentro de la placa precordial.

En este caso el estudio se llevó a cabo exclusivamente tras la inyección del MO de *rnd1* ya que éste parecía ser el que menos dañaba al desarrollo del embrión. Para este experimento utilizamos una línea transgénica AB(Gsc:GFP) generada por el Prof. Tada en UCL (Londres) y que constituye una buena herramienta en el estudio de la teratogenia inducida por etanol. Todas las células de la placa precordial expresan la proteína Goosoid y, en esta línea transgénica, dicha proteína se encuentra fusionada con la proteína GFP (Fig. 25a-i).

Comparando las imágenes de microscopía confocal obtenidas para ejemplares control [no tratados (Fig. 25a) y expuestos a 1,5% (Fig. 25b), 2% (Fig. 25c) y 2,4% (Fig. 25d) de etanol] con embriones inyectados con el MO de *rnd1* [no tratados (Fig. 25e) y expuestos a 1,5% (Fig. 25f), 2% (Fig. 25g) y 2,4% (Fig. 25h) de etanol] no observamos ningún cambio evidente en la distribución de Gsc ni en la distancia celular. Lo único que cabe destacar es que tras el tratamiento con etanol se observan, frecuentemente, células fuera de la placa precordial que aún expresan

## Resultados

Gsc pero más débilmente (Fig. 25i).



**Fig. 25: Análisis de la distancia entre los progenitores de la placa precordal.** a-i) Distribución de la proteína Gsc:GFP en los distintos grupos experimentales. En los embriones expuestos a etanol es frecuente ver células fuera de la placa precordal que expresan débilmente Gsc (flechas en i). j) Medición de la distancia entre los núcleos de las células de la placa precordal. La distancia media en los ejemplares control (inyectados o no) es de aproximadamente 10 µm, el etanol incrementa esta distancia significativamente. En los embriones inyectados con el MO de *rmd1* y expuestos a etanol el efecto es el contrario, disminuyendo significativamente la distancia entre los núcleos celulares. D: dorsal; Lateral. Barra de escala: 50 µm. \*\*\* =  $p < 0,001$ .

Utilizando el programa *Volocity*, que nos permite hacer mediciones en tres dimensiones, analizamos la distancia entre células adyacentes dentro de la placa precordal (Fig. 25j). La distancia media entre las células en los ejemplares control es de aproximadamente 10 µm. En los embriones expuestos a las distintas concentraciones de etanol, esta distancia se incrementa significativamente (Fig. 25j). Tras la inyección del MO no se observa ninguna variación en la distancia entre núcleos en los ejemplares no tratados con etanol. Sin embargo, en los embriones

expuestos a etanol, a los que previamente se les había inyectado el MO de *rnd1*, la distancia entre las células de la placa precordial disminuía significativamente. Curiosamente, la inyección del MO de *rnd1* revierte el efecto inducido por el etanol, de manera que la distancia entre núcleos es menor que en el caso control.

La exposición a etanol produce un aumento de la distancia entre las células y parece que hay una sinergia entre el etanol y *Rnd1* ya que, tras la inyección del MO el etanol no aumenta la distancia entre las células sino que produce el efecto contrario, una disminución de la distancia celular.

### 4.1.6 Resumen

El etanol produce un retraso en la migración de los progenitores de la placa precordial, que no son capaces de alcanzar el polo animal del embrión, y una desorganización de los mismos. Además, el grado de alteración depende directamente de la concentración de etanol utilizada.

Tras la exposición a etanol se induce una sobre-expresión de las GTPasas *Rnd1* y *Rnd1like*. Sin embargo, el bloqueo de su traducción mediante el uso de MO no es capaz de revertir el efecto.

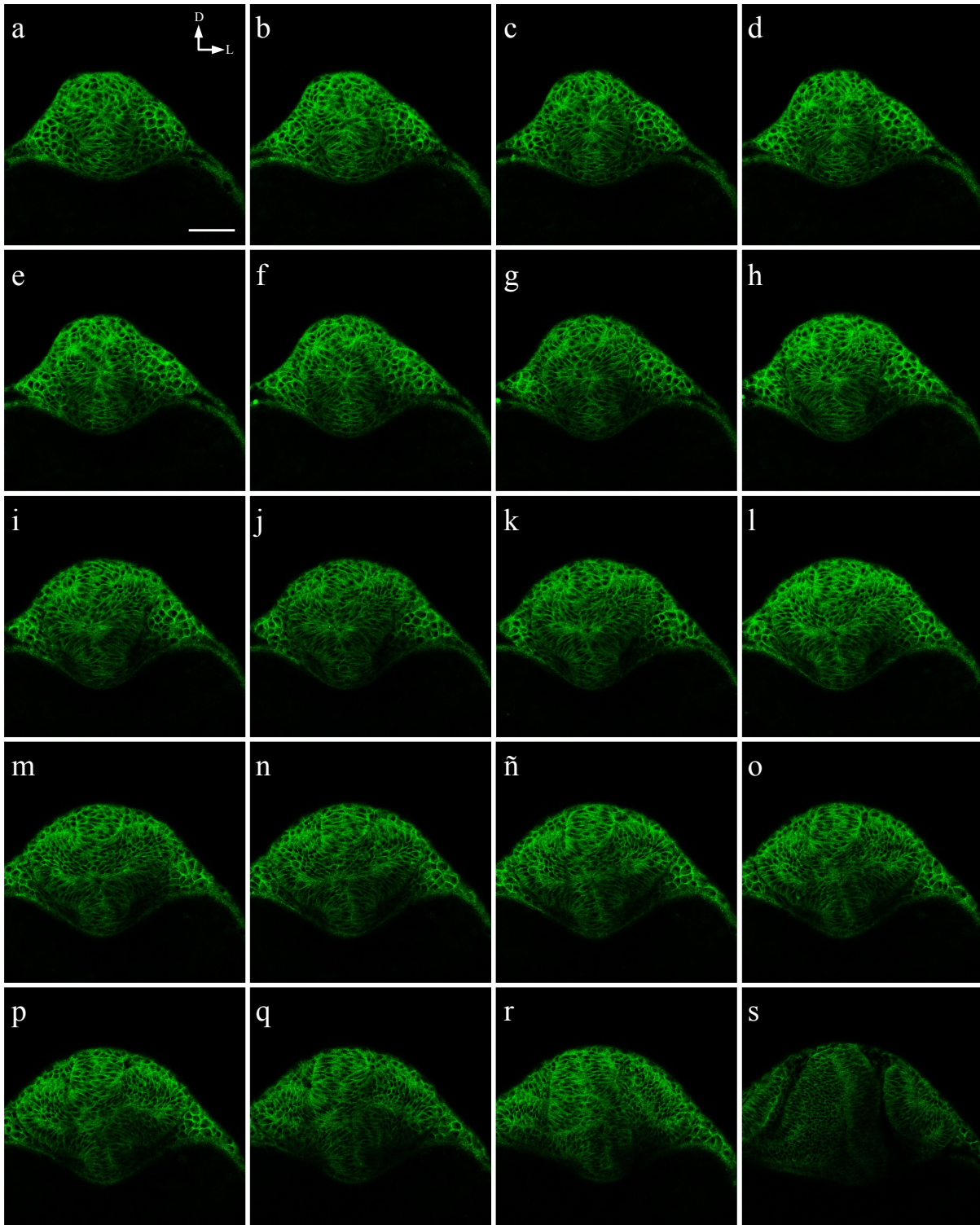
Cuando analizamos específicamente la cohesión de las células dentro de la placa precordial vemos que el etanol aumenta la distancia entre las mismas. En los embriones, que tras la inyección del MO de *rnd1*, son expuestos a etanol esta distancia disminuye significativamente, indicando que la desorganización celular inducida por el etanol podría estar mediada a través de *rnd1*.

## 4.2 EFECTOS DEL ETANOL SOBRE LA EVAGINACION DE LAS VESÍCULAS ÓPTICAS

Es bien conocido que el etanol impide la correcta evaginación de las vesículas ópticas, llegando a inducir fenotipos ciclópeos. Sin embargo, no se conoce con detalle el mecanismo a través del cual actúa el etanol. Hemos estudiado el efecto del etanol durante la evaginación de las vesículas ópticas mediante el análisis de la citoarquitectura de las células que conforman el campo

## Resultados

morfogenético visual y mediante el análisis de los patrones de expresión de algunos genes implicados en este proceso. Además, analizamos los cambios en la polaridad celular que suceden durante el mismo.



**Fig 26:** a-s) Secuencia de división del campo visual en un embrión de pez cebra inyectado con la construcción membr:GFP. D: dorsal; L: lateral. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

El proceso de división del campo visual en condiciones normales se puede observar en la tira de imágenes de la Fig. 26. Las imágenes pertenecen a un embrión AB inyectado con una construcción llamada membr:GFP y se han tomado cada pocos minutos durante varias horas. En esta construcción se ha añadido a la proteína GFP la secuencia típica de miristoilación y, por tanto, se dirige a la membrana plasmática tras la traducción. De esta manera, todas las membranas del embrión se vuelven fluorescentes.

### 4.2.1 Estudio de los patrones de expresión de genes

Hemos elegido los genes de la familia Rx y aquellos que se encuentran en su red de transducción, porque juegan un papel importante durante la división del campo visual. Estudiamos mediante HIS la expresión de cinco genes, *otx2*, *zic2*, *pax6*, *rx3/rx1* y *six3*.

#### *otx2*

La expresión de *otx2* es fácilmente reconocible en los embriones en el estadio de 3 somitos, tanto en el control (Fig. 27a) como tras la exposición a 1,5% (Fig. 27b), 2% (Fig. 27c) y 2,4% (Fig. 27d) de etanol. En este estadio, *otx2* se expresa en toda la región anterior del animal incluyendo el campo visual, telencéfalo y diencéfalo, así como en el cerebro medio, hasta el límite entre el mesencéfalo y el rombencéfalo, lo que se conoce como MHB (de sus siglas en inglés: *Midbrain Hindbrain Boundary*). La única diferencia en la expresión de *otx2* entre los embriones expuestos a etanol y los controles es una expansión del área positiva cuando se utilizan concentraciones bajas (1,5% y 2%) (Fig. 27b, c), y una reducción del marcaje al exponer los embriones a 2,4% de etanol (Fig. 27d).

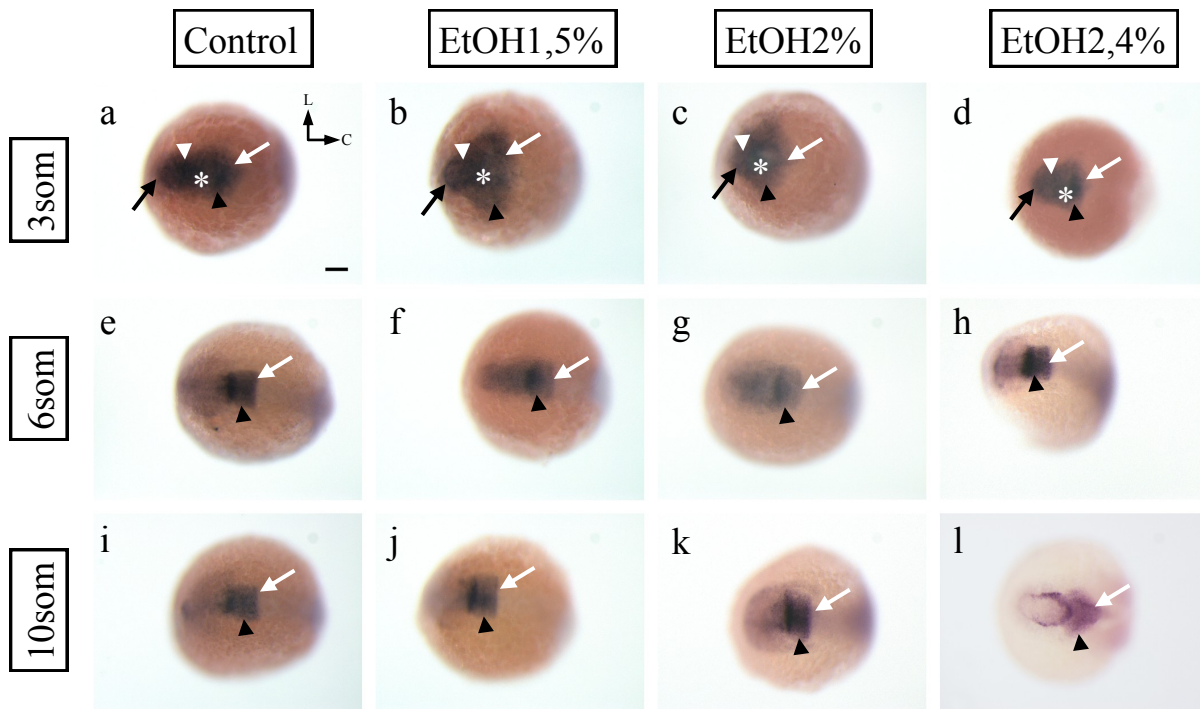
A partir del estadio de 6 somitos, la expresión de *otx2* queda restringida a una banda en el mesencéfalo y en el MHB, aunque persiste algo de marcaje en las regiones más anteriores (Fig. 27e). En los embriones expuestos a etanol (Fig. 27f-h) también tiene lugar la pérdida de expresión de *otx2*, aunque no es tan evidente ya que se encuentra parcialmente retrasado. De esta manera, el diencéfalo, el campo visual y el telencéfalo todavía presentan expresión de *otx2* (Fig. 27f-h).

En el estadio de 10 somitos sólo se observa expresión de *otx2* en una banda ancha en la región del mesencéfalo, en el MHB y en la parte anterior del

## Resultados

rombencéfalo (Fig. 27i). En los embriones expuestos a etanol el patrón de expresión de *otx2* es similar y no se observa ningún cambio significativo, expresándose también en dichas regiones (Fig. 27j-l). En los embriones expuestos a 2,4% de etanol se conserva cierto marcaje en las paredes laterales del diencefalo.

Mediante HIS vemos que *otx2* no se altera tras la exposición a etanol, solo parece existir un leve retraso en la adquisición del patrón de expresión definitivo.

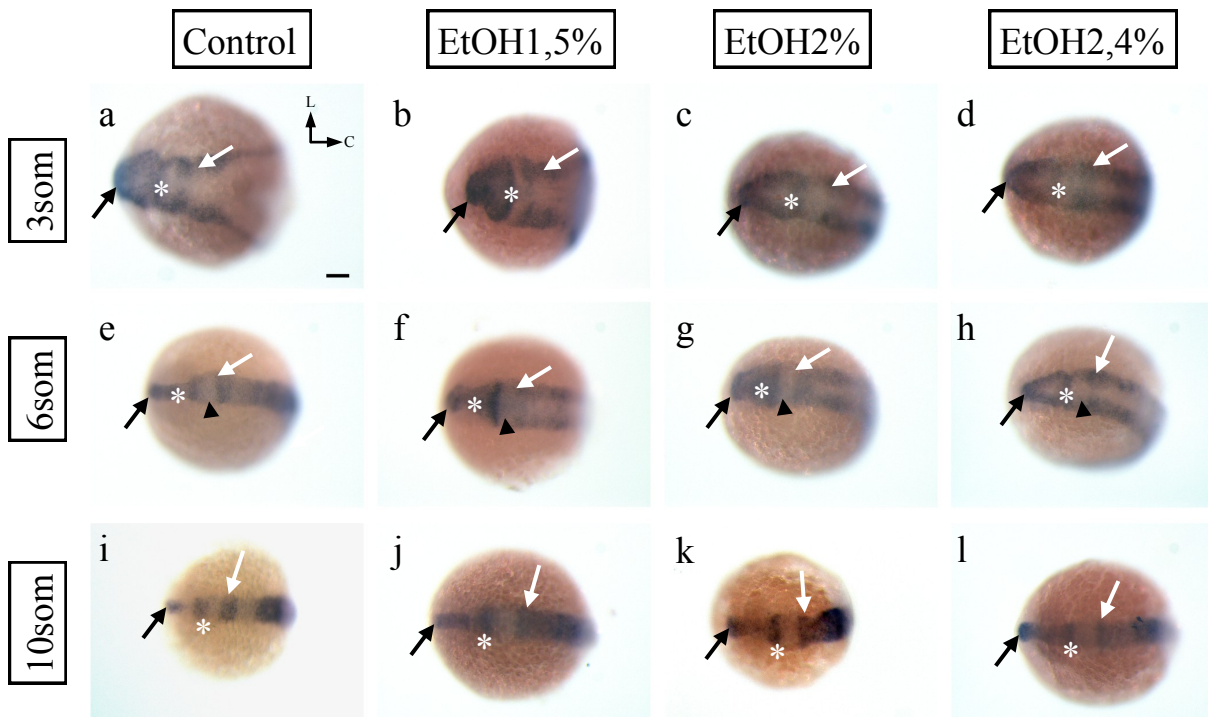


**Fig. 27: Expresión de *otx2*.** a-d) En embriones de 3 somitos (a) *otx2* se expresa en el T, el D, el CV y el M hasta el MHB. No se aprecian grandes diferencias en los embriones tratados con etanol aunque en los expuestos a 1,5% (b) y 2% (c) hay una extensión del marcaje y en los expuestos a 2,4% (d) de etanol una reducción de la expresión. e-h) En el estadio de 6 somitos *otx2* se expresa únicamente en el M y en el MHB (e). En los embriones expuestos a etanol (f-h) el patrón de expresión es bastante similar. i-l) El marcaje de *otx2* en embriones de 10 somitos es prácticamente idéntico al estadio anterior, expresándose en el M, el MHB y en la región anterior del rombencéfalo (i). Las diferencias con los embriones expuestos a 1,5% (j) y 2% (k) de etanol son mínimas. En los embriones expuestos a 2,4% de etanol (l) *otx2* se expresa en regiones anteriores. C: caudal; CV: campo visual (cabeza de flecha blanca); D: diencefalo (asterisco blanco); L: lateral; M: mesencéfalo (cabeza de flecha negra); MHB: *midbrain-hindbrain* boundary (flecha blanca); T: telencéfalo (flecha negra). Barra de escala: 100  $\mu$ m.

### *zic2*

*Zic2* presenta un patrón de expresión cambiante en los embriones entre los estadios de 3 y 10 somitos. En embriones de 3 somitos se detecta la expresión de *zic2* en el telencéfalo, el diencefalo, el MHB y los límites laterales del cerebro medio y posterior y de la placa neural posterior (Fig. 28a). En los embriones expuestos a etanol no hemos observado variaciones en el patrón de expresión, ni con 1,5% (Fig. 28b), 2% (Fig. 28c), o 2,4% (Fig. 28d) de etanol.

En el estadio de 6 somitos se produce un cambio en el patrón de expresión de *zic2* sobre todo en los ejemplares control (Fig. 28e). *Zic2* ya no se expresa en las regiones laterales sino en las centrales. En este estadio *zic2* se expresa más en el telencéfalo, diencéfalo, cerebro posterior y placa neural posterior, mientras que el marcaje en el mesencéfalo es más débil. De esta forma resulta un patrón de expresión de *zic2* en forma de bandas, que en estadios posteriores es más evidente.



**Fig. 28: Patrón de expresión de *zic2*.** a-d) En embriones de 3 somitos *zic2* se expresa en el T, el D, el MHB y los límites laterales del cerebro medio y posterior y de la placa neural posterior (a). No se observan cambios en los embriones expuestos a etanol (b-d). e-h) En los ejemplares control de 6 somitos *zic2* se expresa en la región central del T, D, cerebro posterior y placa neural posterior, mientras que el marcaje en el M es más débil. En los ejemplares expuestos a 1,5% de etanol (f) el patrón de *zic2* es muy similar al de los controles pero en los embriones expuestos a 2% (g) y 2,4% (h) de etanol es más similar al estadio anterior. i-l) En el estadio de 10 somitos la expresión de *zic2* es menor en los ejemplares control, y se encuentra marcaje en líneas horizontales muy definidas en el T, el D, MHB y placa neural posterior (i). La expresión de *zic2* en los ejemplares expuestos a etanol es prácticamente idéntica a los animales control (j-l). C: caudal; D: diencéfalo (asterisco blanco); L: lateral; M: mesencéfalo (cabeza de flecha negra); MHB: *midbrain-hindbrain boundary* (flecha blanca); T: telencéfalo (flecha negra). Barra de escala: 100  $\mu$ m.

El cambio en el patrón de expresión en los ejemplares expuestos a etanol no es tan marcado, debido probablemente al retraso en el desarrollo (Fig. 28f-h). *Zic2* se expresa en los mismos lugares que en los ejemplares control, pero con un patrón de expresión intermedio entre el observado en el estadio de 3 somitos y el observado en el de 6 somitos, detectándose marcaje tanto en los márgenes laterales como en la región central del SNC. El cambio en la expresión de *zic2* es

## ***Resultados***

---

mucho más evidente en los embriones expuestos a 2,4% de etanol (Fig. 28h), en los cuales el patrón es prácticamente idéntico al observado en el estadio de 3 somitos.

En el estadio de 10 somitos no hay modificaciones en la expresión de *zic2* en los ejemplares control (Fig. 28i), aunque es más evidente la expresión de *zic2* en bandas que incluyen el telencéfalo, el diencéfalo, el MHB y la placa neural posterior. El marcaje detectado en el mesencéfalo y el rombencéfalo es prácticamente inexistente. En los embriones expuestos a etanol (Fig. 28j-l) el patrón de expresión cambia y se parece al mostrado por los ejemplares control, coincidiendo las regiones que muestran mayor y menor expresión. Ni siquiera aquellos embriones expuestos a 2,4% de etanol presentan diferencias significativas (Fig. 28l).

La exposición temprana a etanol no altera el patrón de expresión de *zic2*, aunque si lo retrasa levemente, coincidiendo con el retraso general del desarrollo.

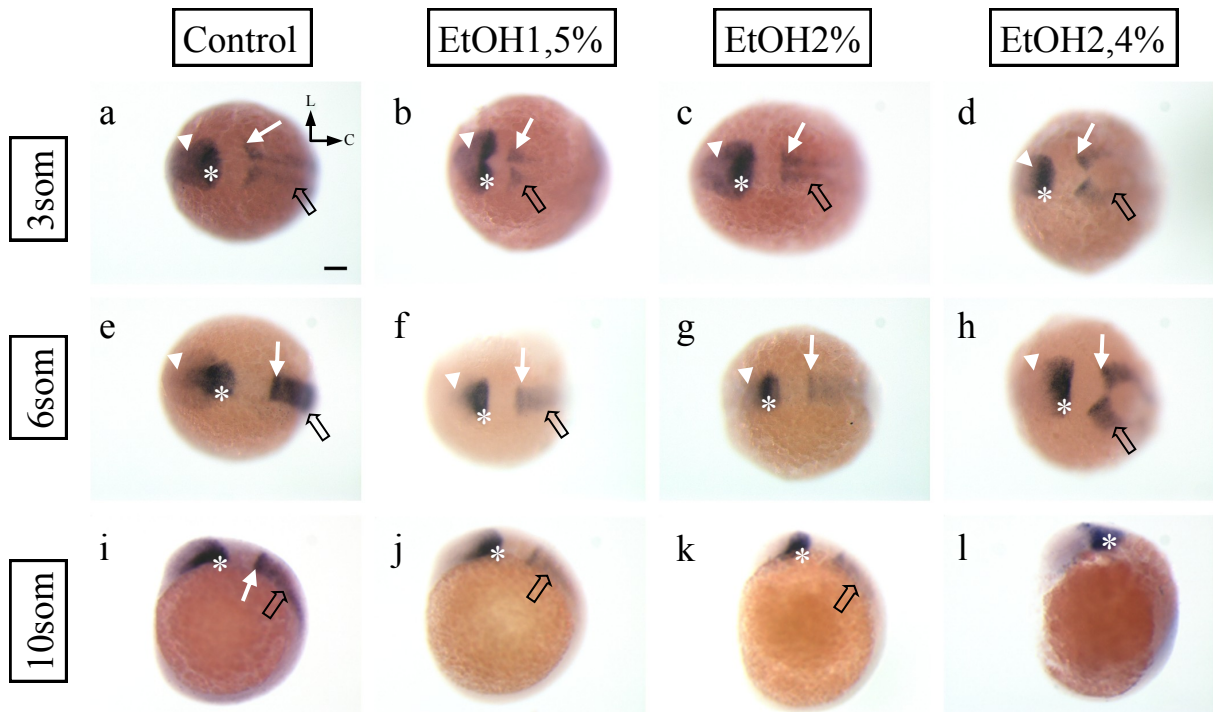
### ***pax6***

*Pax6* es un factor de transcripción muy importante en el desarrollo no sólo del sistema visual sino también de las regiones más posteriores del SNC. Así, en embriones de 3 somitos detectamos su expresión en la región más anterior del animal incluyendo el telencéfalo, el diencéfalo y el campo visual (Fig. 29a), en el MHB, en la parte anterior del rombencéfalo y en dos bandas longitudinales a lo largo de la línea media del embrión. Tras el tratamiento con etanol (Fig. 29b-d) no observamos grandes cambios en la expresión de *pax6* en la región anterior ya que se expresa en el prosencéfalo y en el MHB. Sin embargo, tras la exposición a etanol, los embriones muestran una expresión muy débil a lo largo de la línea media. En los ejemplares expuestos a 2,4% (Fig. 29d) se observa que la parte posterior del embrión no es totalmente recta, sino que está combada hacia el exterior. Este fenotipo podría ser debido al retraso ocasionado en la culminación de la epibolia.

En los embriones de 6 somitos la expresión de *pax6* comienza a desaparecer del área visual, quedando restringida al diencéfalo (Fig. 29e). La expresión en el rombencéfalo se hace más intensa a lo largo de la línea media (Fig. 29e). Tras el tratamiento con etanol se observan los mismos cambios en la región anterior, sólo hay marcaje en la región diencefálica (Fig. 29f-h). Sin embargo, hay una reducción



del marcaje de *pax6* a lo largo de la línea media que se correlaciona con la concentración de etanol utilizada. En los embriones expuestos a 2,4% de etanol (Fig. 29h) se observa el retraso en la finalización de la epibolia.



**Fig. 29: Patrón de expresión de *pax6*.** a-d) En los ejemplares control de 3 somitos (a) *pax6* se expresa en el D, el CV, el MHB y dos bandas longitudinales a lo largo de la LM caudal. En los embriones expuestos a etanol (b-d) la expresión de *pax6* no varía en la región anterior pero se reduce en la región caudal, sobre todo en los ejemplares expuestos a 2,4% de etanol (d). e-h) En los embriones de 6 somitos no hay *pax6* en el CV y sólo se expresa en el diencefalo, el MHB y la LM caudal donde ahora distinguimos una única banda (e). El patrón de expresión de *pax6* es similar en los ejemplares expuestos a etanol (f-h), sin embargo en los embriones expuestos a 2,4% de etanol, la LM caudal está separada (h). i-l) En los ejemplares control de 10 somitos *pax6* se expresa en el D, el MHB y la LM caudal (i), el marcaje del D caudal se extiende por la región ventral, por debajo del campo visual (i). En los embriones expuestos a etanol *pax6* se expresa en el D caudal pero el marcaje no se extiende por la región ventral (j-l) y el marcaje en la LM caudal está muy reducido (j, k) o es inexistente (l). C: caudal; CV: campo visual (cabeza de flecha blanca); D: diencefalo (asterisco blanco); L: Lateral LM: línea media (flecha vacía); MHB: *midbrain-hindbrain boundary* (flecha blanca). Barra de escala: 100  $\mu$ m.

En los ejemplares control de 10 somitos, *pax6* se expresa en la región diencefálica posterior (Fig. 29i) y el marcaje se extiende a lo largo del diencefalo ventral hasta casi el margen más anterior del embrión. Esta extensión ventral se sitúa por debajo del campo visual. La expresión de *pax6* en el MHB se continua a lo largo de la línea media hasta la región media de la cola (inserto en Fig. 29i). En los embriones expuestos a etanol, se ve el marcaje en la región posterior del diencefalo dorsal pero hay cambios en los otros dominios de expresión (Fig. 29j-l). Se reduce la extensión del marcaje en la región ventral del diencefalo y en la línea media del rombencéfalo y la cola (Fig. 29j-l). Estas reducciones son más evidentes a mayor

## ***Resultados***

---

concentración de etanol, así cuando se utiliza 1,5% se observa cierto marcaje en el diencéfalo ventral y en la línea media (Fig. 29j) pero cuando se utiliza 2,4%, la expresión de *pax6* prácticamente desaparece de ambos (Fig. 29l).

El patrón de expresión de *pax6* sí está alterado en los embriones expuestos a etanol, sobre todo en el diencéfalo ventral y en la línea media posterior. La disminución del marcaje en ambas regiones parece tener una relación directa con la concentración de etanol utilizada.

### *rx3/rx1*

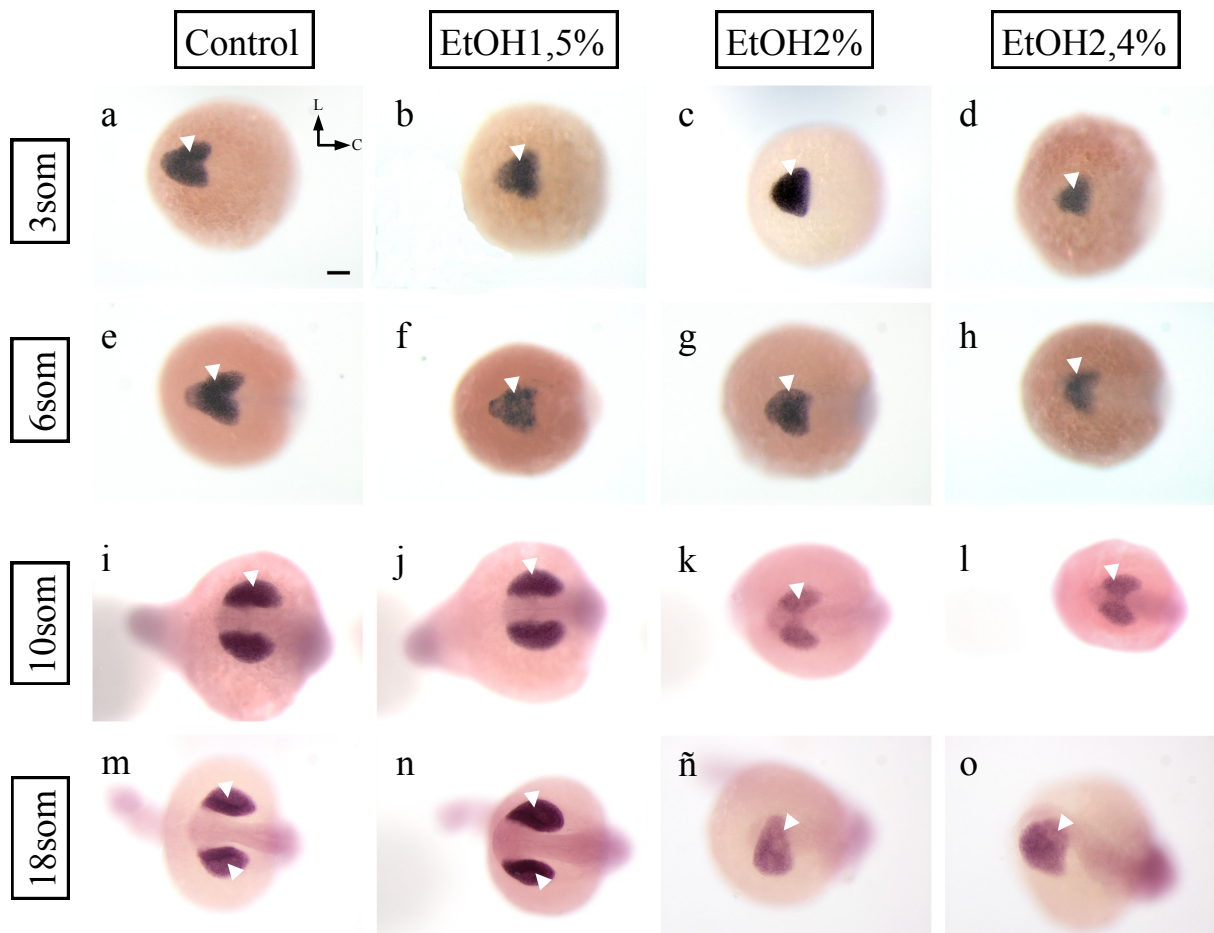
*Rx3* es un marcador exclusivo del campo visual y del diencéfalo. Los ejemplares control de 3 somitos (Fig. 30a) presentan un patrón de expresión de *rx3* en forma bilobulada con una separación caudal, reflejo de la progresión de la evaginación de las vesículas ópticas. En la mayoría de los embriones expuestos a etanol (Fig. 30b-d) no se distingue ninguna hendidura caudal y se observa la reducción de la extensión del marcaje, sobre todo cuando los embriones son expuestos a concentraciones elevadas de etanol (Fig. 30d).

En el estadio de 6 somitos la separación de la expresión de *rx3* en la región caudal es más prominente en los ejemplares control y el marcaje en el hipotálamo presuntivo se reduce (Fig. 30e). Tras la exposición a 1,5% de etanol (Fig. 30f) normalmente se observa un patrón de expresión de *rx3* similar al control. Sin embargo, cuando los embriones se exponen a 2% (Fig. 30g) y 2,4% (Fig. 30h) de etanol, la separación caudal no es evidente y se reduce la extensión del marcaje en el campo visual, mientras que el marcaje en el diencéfalo es más similar al observado en los controles.

La expresión de *rx3* en los embriones de 10 somitos es muy débil y se sustituye por la expresión de *rx1* y *rx2*; por ello en esta edad y en los embriones de 18 somitos realizamos la HIS contra *rx1*.

En el estadio de 10 somitos, las dos vesículas ópticas están totalmente evaginadas en los ejemplares control (Fig. 30i) y con un marcaje intenso para *rx1*. En la mayoría de los embriones expuestos a 1,5% de etanol (Fig. 30j) las vesículas también están separadas e intensamente teñidas. Sin embargo, las vesículas ópticas de los embriones que son expuestos a 2% (Fig. 30k) y 2,4% (Fig. 30l) de

etanol permanecían fusionadas, aunque en el caso de los primeros (Fig. 30k) presentan algún indicio de separación caudal.



**Fig. 30: Patrón de expresión de *rx3* y *rx1*.** a-d) En embriones de 3 somitos *rx3* muestra un patrón de expresión bilobulado, localizado en el CV. Esta forma no se aprecia en los embriones expuestos a etanol (b-d). e-h) La hendidura caudal del dominio positivo a *rx3* es mayor en los ejemplares control de 6 somitos (e) y se observa en los ejemplares expuestos a 1,5% de etanol (f). Este fenotipo no se observa en los embriones expuestos a 2% (g) y 2,4% (h) de etanol. i-l) En embriones de 10 somitos hay expresión de *rx1* en las vesículas ópticas, las cuales, en los ejemplares control (i) y los expuestos a 1,5% de etanol (j), están separadas. Las vesículas permanecen unidas en los embriones expuestos a 2% y 2,4% de etanol (k, l). m-o) *Rx1* está presente en las vesículas ópticas de embriones de 18 somitos. Tanto los ejemplares control (m) como los expuestos a 1,5% (o) de etanol muestran las dos vesículas separadas y constituidas cada una como copa óptica. En el resto de grupos, las vesículas permanecen fusionadas (ñ, o). C: caudal; CV: campo visual (cabeza de flecha blanca, también las vesículas ópticas); L: lateral. Barra de escala: 100  $\mu$ m.

En los embriones de 18 somitos, *rx1* se expresa en las vesículas ópticas que ya han sufrido cambios morfogénéticos y están constituidas como copas ópticas (Fig. 30m). Los embriones expuestos a 1,5% de etanol son similares a los ejemplares control (Fig. 30n), aunque algunos presentan un leve retraso y las copas ópticas algo menos separadas. Los embriones expuestos a 2% (Fig. 30ñ) y 2,4% (Fig. 30o) de etanol, en su gran mayoría, muestran un único campo visual en el que las vesículas no están evaginadas. Las formas que adquiere el campo visual son

## *Resultados*

---

distintas dependiendo de los embriones. En algunos es más alargada (Fig. 30n), como si se hubiera producido cierto movimiento de evaginación, pero en otros las vesículas permanecen unidas o totalmente sin extender (Fig. 30o).

Dentro de cada grupo experimental no todos los embriones muestran el mismo patrón de expresión de *rx3/rx1*. Por ello decidimos contar el número de embriones que en cada grupo mostraba un fenotipo claramente alterado y que denominamos fenotipo etanol, entendiendo como tal el mostrado por la mayoría de los embriones tratados con 2,4% de etanol y que se reproducía en cierto número cuando se utilizaban concentraciones más bajas.

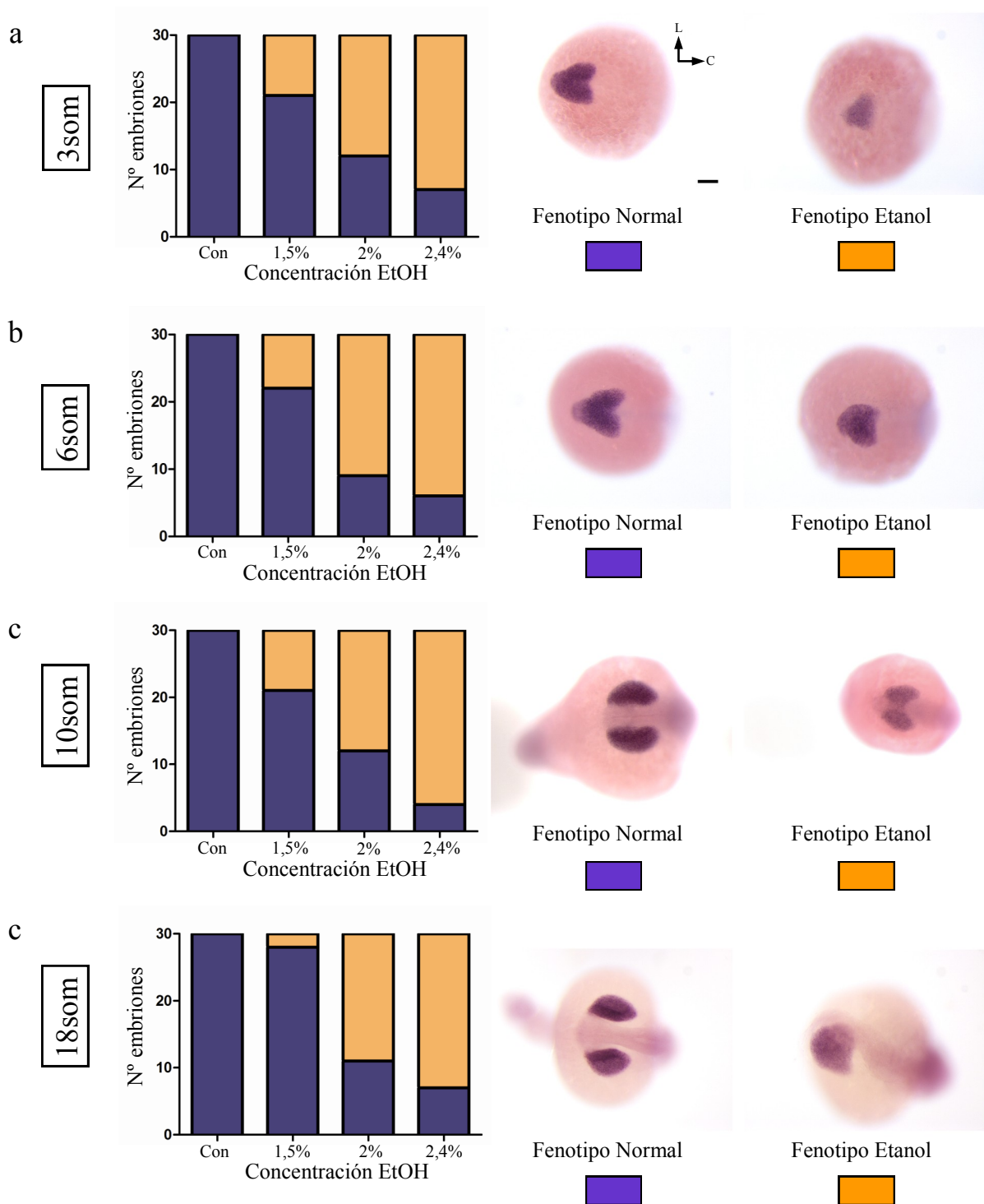
En embriones de 3 somitos (Fig. 31a) todos los embriones control muestran un fenotipo normal, al igual que la mayoría de los embriones expuestos a 1,5% de etanol. En los embriones expuestos a 2% y 2,4% de etanol, la gran mayoría muestran un fenotipo alterado.

En el estadio de 6 somitos (Fig. 31b), todos los animales control muestran un fenotipo normal y sólo un pequeño porcentaje de los embriones tratados con 1,5% de etanol muestran el fenotipo alterado. Sin embargo, la gran mayoría de los expuestos a 2% y 2,4% de etanol lo presentan, y no hay grandes diferencias entre estos dos grupos.

En embriones de 10 somitos encontramos porcentajes similares (Fig. 31c). Todos los controles y la mayoría de los embriones expuestos a 1,5% de etanol muestran un fenotipo normal y casi todos los ejemplares expuestos a 2 y 2,4% de etanol el fenotipo alterado.

En el último estadio analizado, el de 18 somitos (Fig. 31d), el número de embriones expuestos a 1,5% de etanol que muestra un fenotipo alterado disminuye. Sin embargo, en el caso de los embriones expuestos a 2% y 2,4% de etanol, el número de embriones con fenotipo alterado se mantiene constante.

El etanol induce cambios en la expresión de *rx3/rx1* y a elevadas concentraciones de etanol no hay signos de evaginación de las vesículas ópticas. Además, el número de embriones que muestra un fenotipo alterado depende directamente de la concentración de etanol utilizada; y este número se mantiene constante a lo largo del desarrollo.



**Fig 31: Conteo de los embriones** que muestran fenotipos normales y alterados de la expresión de *rx3* y *rx1* a los 3 (a), 6 (b), 10 (c) y 18 (d) somitos. C: caudal; L: lateral. Barra de escala: 100  $\mu$ m.

## *Resultados*

---

### *six3a*

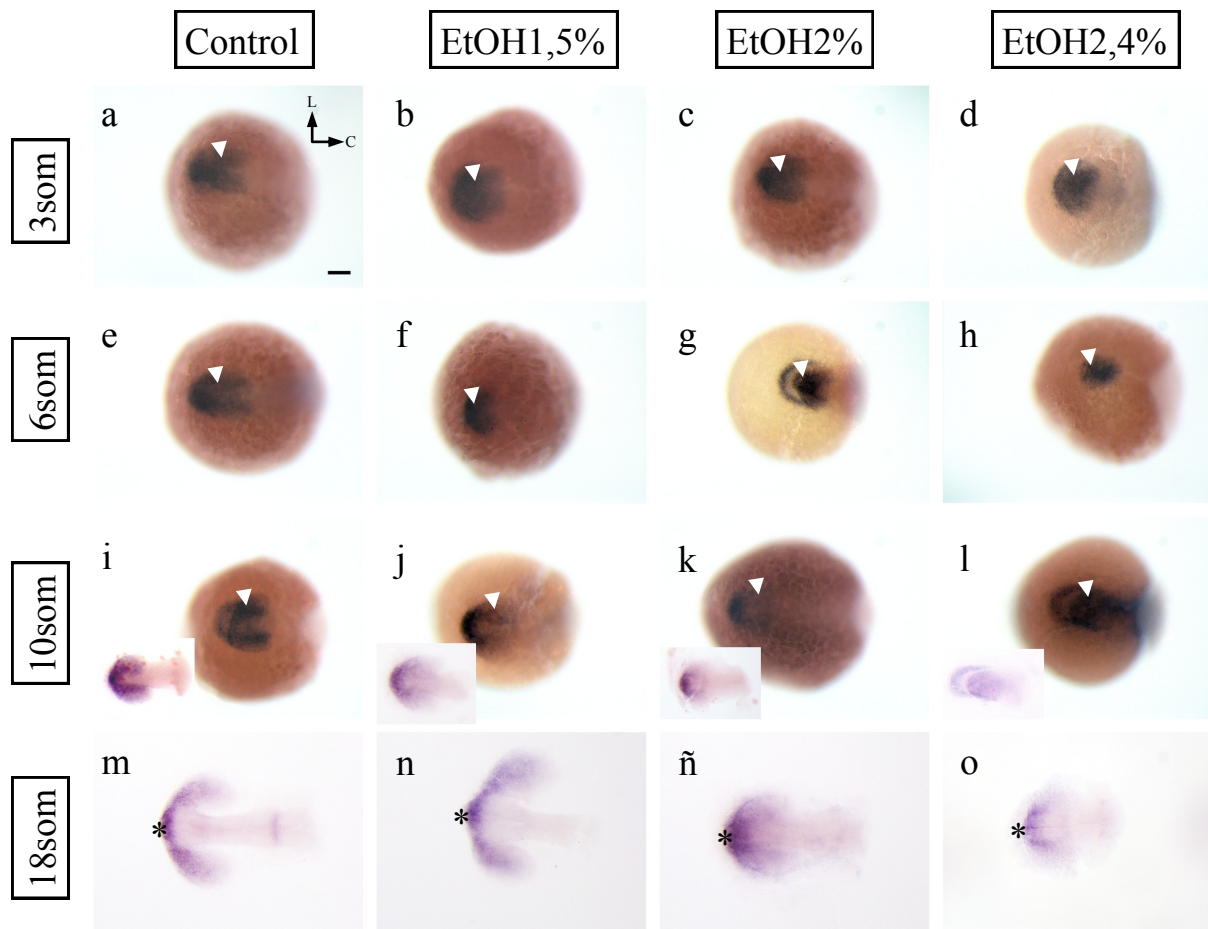
*Six3a* es un factor de transcripción que juega un papel muy importante a lo largo de todo el desarrollo de las vesículas ópticas. En embriones de 3 somitos, *six3a* se expresa en el prosencéfalo anterior, incluyendo el campo visual (Fig. 32a), con un patrón similar al manifestado por *rx3*. En los embriones expuestos a etanol no se observan diferencias en el marcaje con ninguna de las concentraciones utilizadas (Fig. 32b-d) salvo una reducción del marcaje en el campo visual.

El patrón de expresión de *six3a* en el estadio de 6 somitos es bastante similar al estadio anterior en los ejemplares control (Fig. 32e): *six3a* se expresa en las dos mitades del campo visual, a esta edad parcialmente evaginado, y en el hipotálamo presuntivo (diencéfalo). En los embriones expuestos a 1,5% de etanol (Fig. 32f) se observa cierta reducción del marcaje aunque *six3a* mantiene la expresión en las mismas regiones. En los embriones expuestos a 2% (Fig. 32g) y 2,4% (Fig. 32h) de etanol la reducción es mayor y en los últimos sólo se expresa en la región más anterior del campo visual. Además, hemos encontrado fenotipos aberrantes en los que el marcaje más anterior está separado del marcaje del campo visual (Fig. 32g).

En embriones de 10 somitos *six3a* no se encuentra en la región entre ambas vesículas y sólo se expresa en la región anterior de éstas y en el hipotálamo presuntivo (Fig. 32i), estando ambos dominios unidos. En los embriones expuestos a 1,5% de etanol (Fig. 32j) el marcaje es similar aunque hay una reducción de su expresión en las vesículas ópticas. Esta disminución del marcaje de *six3a* es más evidente en los embriones expuestos a 2% de etanol (Fig. 32k). En el caso de los embriones expuestos a 2,4% etanol es frecuente ver patrones de expresión de *six3a* muy alterados (Fig. 32l) como el descrito en los embriones de 6 somitos (Fig. 32l).

Los dominios de expresión de *six3a* no varían demasiado en los ejemplares control en el estadio de 18 somitos (Fig. 32m), las copas ópticas, unidas por medio del pedúnculo óptico, son positivas y también el hipotálamo. Los embriones expuestos a 1,5% de etanol (Fig. 32n) no presentan diferencias con respecto a los animales control. Sin embargo, tanto los embriones expuestos a 2% (Fig. 32ñ) como a 2,4% (Fig. 32o) de etanol muestran una reducción del marcaje en las vesículas ópticas aunque el marcaje del pedúnculo óptico se conserva o incluso es

más intenso que en los animales control.



**Fig. 32: Patrón de expresión de *six3a*.** a-d) En los embriones de 3 somitos *six3a* se expresa en la región anterior del embrión (a) con una hendidura caudal. Este patrón se reconoce en los embriones expuestos a 1,5% (b) y 2% (c) de etanol pero no en los expuestos a 2,4% de etanol (d). e-h) La expresión de *six3a* es similar en embriones de 6 somitos (e). En los embriones expuestos a etanol disminuye el marcaje (f-h) y se encuentran fenotipos aberrantes (g). i-l) En el estadio de 10 somitos cada vesícula óptica resulta positiva para *six3a*, así como el pedúnculo óptico y el hipotálamo (diencéfalo) (i). En los embriones expuestos a etanol, el marcaje en las vesículas ópticas disminuye significativamente, mientras que en el pedúnculo se mantiene (j, k). Fenotipos aberrantes (l). m-o) Las vesículas ópticas y el pedúnculo óptico expresan *six3a* en el estadio de 18 somitos (m). Este fenotipo también se reconoce en los ejemplares expuestos a 1,5% de etanol (n). Los embriones expuestos a 2% (ñ) y 2,4% (o) de etanol muestran una menor extensión del marcaje. C: caudal; CV: campo visual (cabeza de flecha blanca, también las vesículas ópticas); L: lateral. Pedúnculo óptico: asterisco negro. Barra de escala: 100  $\mu$ m.

Al igual que en el caso de *rx3/rx1* hemos contado el número de embriones que muestran un fenotipo claramente alterado en cada uno de los tratamientos. Todos los ejemplares control de 3 somitos (Fig. 33a) y casi todos los expuestos a 1,5% de etanol presentan un fenotipo normal. Sin embargo, la mayoría de los animales expuestos a 2% y 2,4% de etanol muestran un fenotipo aberrante.

Casi todos los embriones de 6 somitos expuestos a 1,5% de etanol (Fig. 33b) tienen un fenotipo normal, mientras que la mayoría de los expuestos a 2% y 2,4%

## *Resultados*

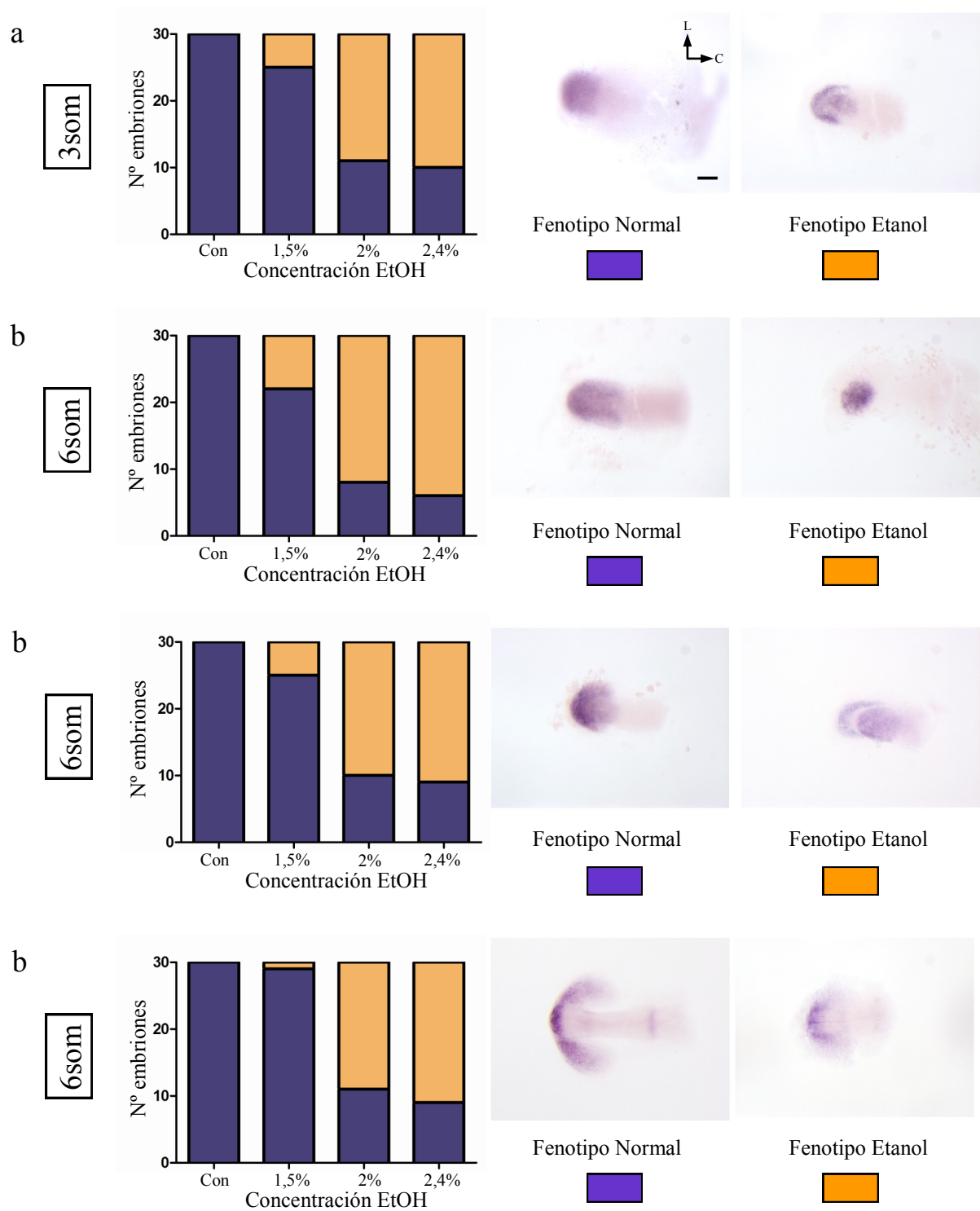
---

de etanol el fenotipo está alterado. En los embriones de 10 somitos (Fig. 33c) las proporciones de ejemplares con fenotipo normal y alterado se mantienen constantes en cada grupo. Los embriones expuestos a 2% y 2,4% de etanol tienen el mayor número de ejemplares con fenotipo alterado, pero sin grandes diferencias entre ellos.

En el último estadio analizado, el de 18 somitos (Fig. 33d), sólo encontramos un embrión expuesto a 1,5% de etanol que mostraba un fenotipo alterado. En los embriones expuestos a 2% y 2,4% de etanol el número de embriones alterados es similar al de anteriores estadios.

*Six3a* tiene un patrón de expresión similar en embriones control y expuestos a etanol de 3 somitos, y se altera en los estadios posteriores. Los porcentajes de embriones con fenotipo alterado en los distintos estadios y en los distintos grupos coinciden con lo observado en los patrones de expresión de *rx3/rx1*.





**Fig. 33: Conteo de los embriones** que muestran fenotipos normales y alterados de la expresión de *six3a* a los 3 (a), 6 (b), 10 (c) y 18 (d) somitos. C: caudal; L: lateral. Barra de escala: 100  $\mu$ m.

## Resultados

---

### 4.2.2 Analisis de la citoarquitectura

Los resultados de las hibridaciones *in situ* muestran que el patrón de expresión de algunos genes está alterado y que el propio campo visual sufre alteraciones tras el tratamiento con etanol. Mediante el uso de secciones semifinas hemos analizado si se producían alteraciones en la citoarquitectura del campo visual como consecuencia del tratamiento con etanol.

En los ejemplares control el campo visual es fácilmente distinguible ya en el estadio de 3 somitos (Fig. 34a). Las células de este dominio se caracterizan por tener núcleos grandes, morfología circular y pequeños espacios entre ellas. Dicha región se reconoce también en los embriones expuestos a 1,5% de etanol (Fig. 34b) pero no en los otros dos grupos experimentales, expuestos a 2% y 2,4% de etanol (Fig. 34c, d). En estos ejemplares las células no tienen una morfología circular, ni sus núcleos se tiñen tan intensamente. Además, presentan espacios mucho mayores entre ellas y, sobre todo, en los embriones expuestos a 2,4% de etanol, encontramos gran cantidad de núcleos picnóticos. Otra característica de los ejemplares expuestos a etanol es que presentan un prosencéfalo más ancho que los ejemplares control (Fig. 34a, d).

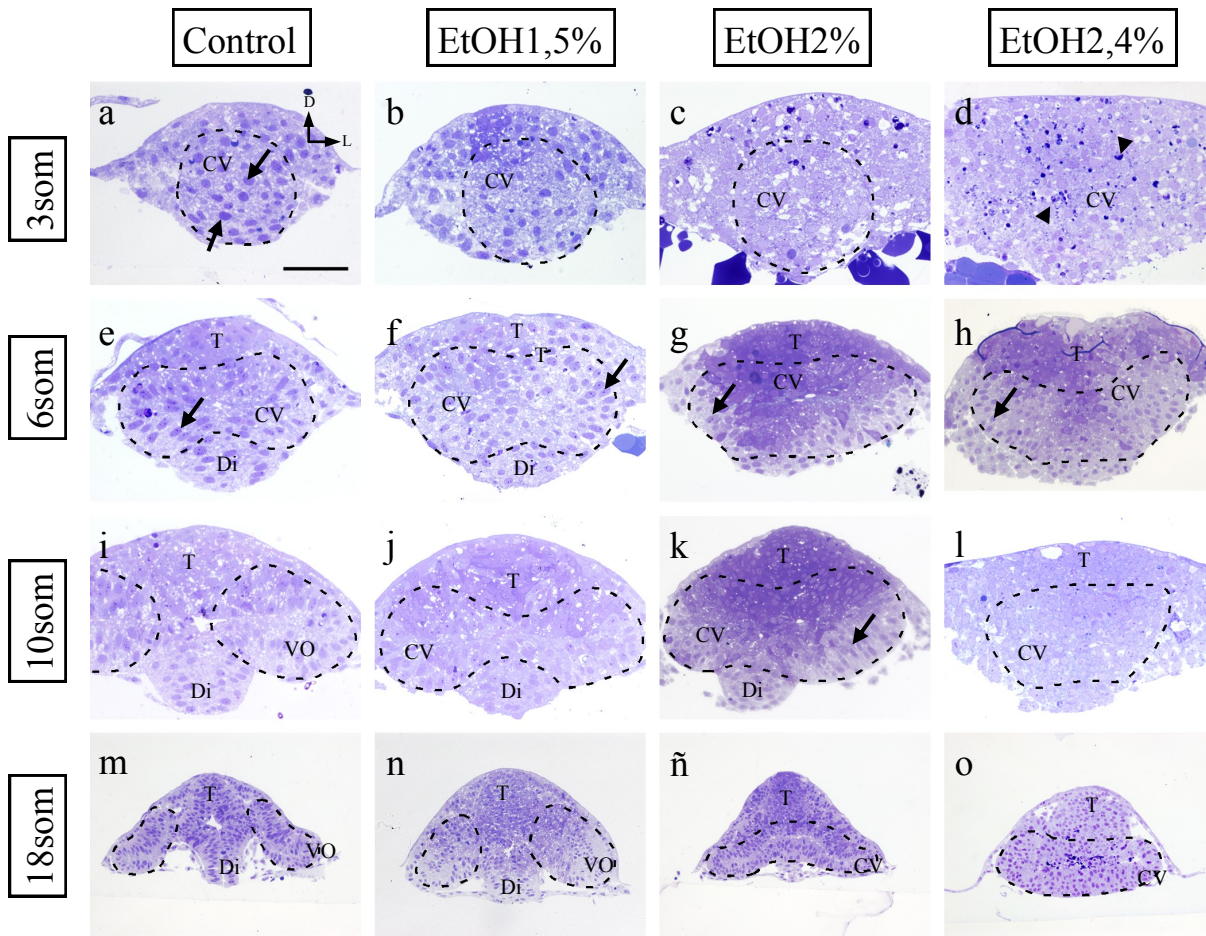
En los embriones de 6 somitos, el campo visual se encuentra parcialmente dividido y, en los ejemplares control (Fig. 34e) y en los expuestos a 1,5% de etanol (Fig. 34f) la morfología celular ha cambiado respecto al estadio anterior. Las células del campo visual se alargan adquiriendo un aspecto fusiforme con su dominio apical orientado hacia la región central del embrión, de manera similar a lo que ocurre en el diencéfalo (Fig. 34e). En los embriones expuestos a 2% (Fig. 34g) y 2,4% (Fig. 34h) de etanol, aunque se reconoce el campo visual, estos cambios no son tan evidentes. Algunas células cambian su morfología pero no todas se alargan en la misma orientación.

Las dos vesículas ópticas totalmente separadas se pueden distinguir en los embriones de 10 somitos. Cada una presenta células fusiformes orientadas hacia la región central (Fig. 34i). Aunque la división del campo visual ha terminado, los progenitores retinianos mantienen la morfología alargada y fusiforme que habían adquirido en estadios anteriores. Además, tal y como veremos con la

inmunohistoquímica para Zo1, orientan sus dominios apicales hacia la región central del embrión, es decir las células se encuentran polarizadas. Estas características morfológicas también las encontramos en otras regiones como el diencéfalo, situado entre ambas vesículas ópticas, pero es en los progenitores retinianos donde es más evidente (Fig. 34i). En los embriones expuestos a 1,5% de etanol se reconoce el mismo patrón, aunque parece que va retrasado y hay una mayor separación entre las células (Fig. 34j). Los embriones expuestos a 2% de etanol (Fig. 34k) presentan algunas células alargadas y fusiformes, aunque no siguen una ordenación determinada. Por último, en los ejemplares expuestos a 2,4% de etanol (Fig. 34l) la citoarquitectura de las vesículas ópticas está alterada, las células se disponen desordenadamente, no están polarizadas y hay muchos más espacios entre ellas.

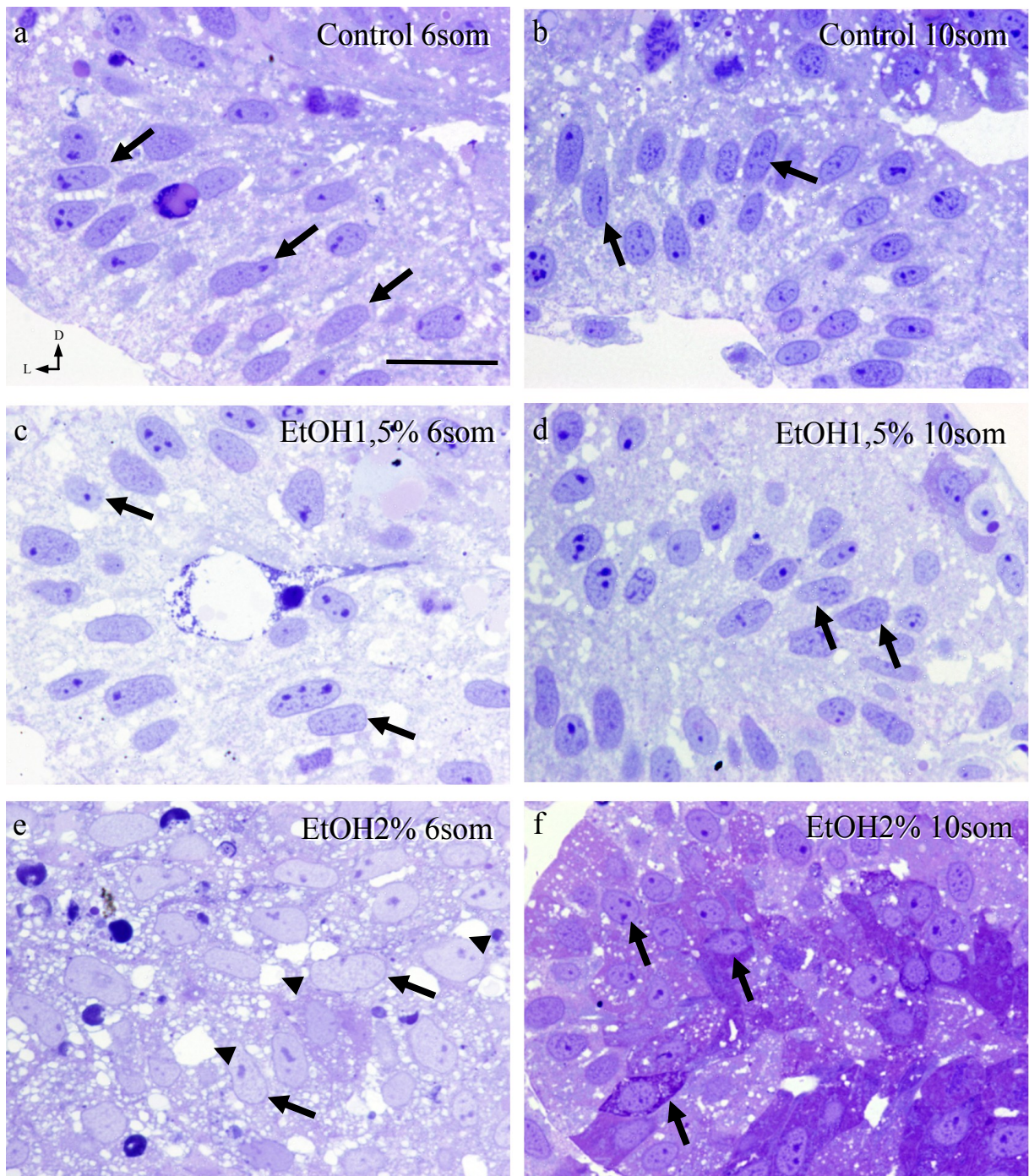
Tras la evaginación de las vesículas ópticas comienza la formación de la copa óptica; y durante este proceso las vesículas se comban hacia el interior (Fig. 34m). En los embriones de 18 somitos, las células del campo visual ya no se encuentran directamente unidas al telencéfalo sino que se observa el inicio de la formación del pedúnculo óptico. Las vesículas presentan el mismo aspecto en los embriones expuestos a 1,5% de etanol (Fig. 34n), aunque la disposición de las células y el hecho de que no ha comenzado la formación de la copa óptica sugiere un retraso en su formación. La disposición de las vesículas ópticas en los ejemplares expuestos a 2% de etanol (Fig. 34ñ) es totalmente distinta, sólo se ven dos vesículas parcialmente separadas, en las que las células no están organizadas como en los ejemplares control, ni se encuentran todas polarizadas del mismo modo. Las dos vesículas permanecen fusionadas en la región ventro-medial, región donde se debe disponer el hipotálamo. En los embriones expuestos a 2,4% de etanol (Fig. 34o) la citoarquitectura está más alterada, no hay signos de evaginación de las vesículas ópticas y el campo visual está constituido por células de pequeño tamaño y morfología circular. Estas células dejan un espacio central, similar a lo que se observa en los ejemplares control, pero dicho espacio está ocupado por núcleos picnóticos.

## Resultados



**Fig. 34: Citoarquitectura del CV de embriones control y expuestos a etanol.** a-d) En embriones de 3 somitos los progenitores del CV tienen núcleos grandes y morfología circular (flechas en a). Lo mismo se observa en los embriones expuestos a 1,5% de etanol (b), pero no es tan evidente en los otros dos grupos experimentales (c, d). Además, tienen muchos núcleos picnóticos (cabezas de flecha en d). e-h) Embriones de 6 somitos. Las células del CV tienen una morfología fusiforme (flechas en e, f) y están orientadas hacia la región central del embrión. En los embriones expuestos a 2% (g) y 2,4% (h) de etanol, las células del CV no están organizadas (flechas en g, h). i-l) Embriones de 10 somitos. Las células tienen una morfología fusiforme (i). Los embriones expuestos a 1,5% de etanol muestran una organización similar aunque algo retrasado (j). En los embriones expuestos a 2% (k) y 2,4% (l), aunque se ven algunas células polarizadas, no hay ningún orden evidente (flecha en k). m-o) La copa óptica se está formando en los embriones de 18 somitos, las células son fusiformes, tanto las del dominio dorsal como las del ventral (m). Las VO se distinguen en los embriones expuestos a 1,5% de etanol (n) pero no ha empezado a formarse la copa óptica. Los ejemplares expuestos a 2% de etanol (ñ) muestran dos VO parcialmente fusionadas en la región central y, en los expuestos a 2,4% de etanol (o) una única VO sin evidencias de inicio de la división. En los dos grupos no hay polarización celular (ñ, o). CV: campo visual; Di: diencefalo; T: telencefalo; VO: vesícula óptica. Barra de escala 50µm.

Si nos fijamos con detalle en los embriones de 6 somitos, las células del campo visual de los animales control son fusiformes y están orientadas hacia la región central (Fig. 35a), característica que también se observa en los ejemplares expuestos a 1,5% de etanol (Fig. 35c). En todos los animales expuestos a etanol es frecuente ver células con grandes vacuolas en su interior (Fig. 35c). En los animales expuestos a 2% de etanol (Fig. 35e) las células tienen una morfología más redondeada y no están orientadas en la misma dirección, además presentan grandes espacios entre ellas.



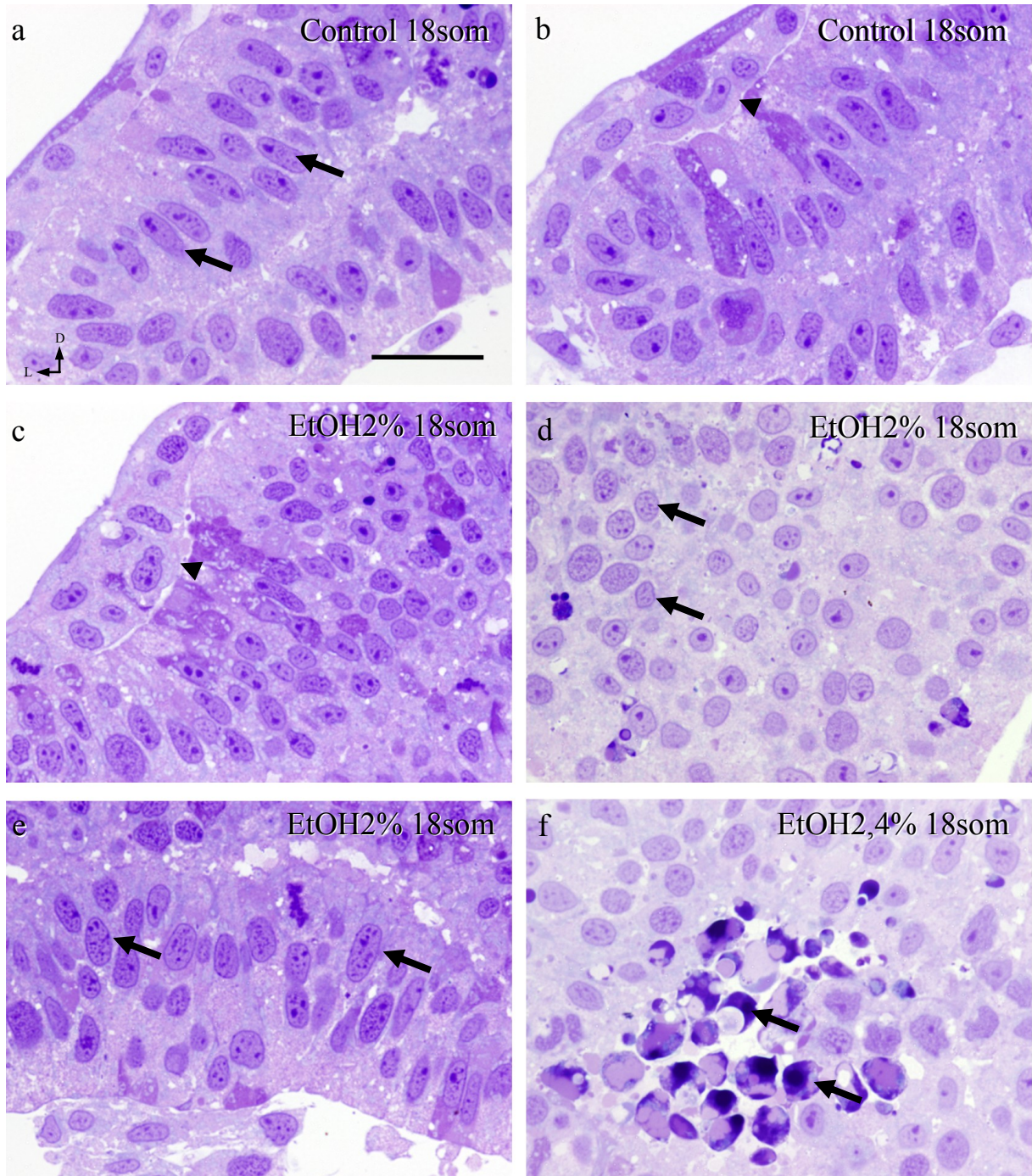
**Fig. 35:** Microfotografías de secciones semifinas de embriones de 6 y 10 somitos. a, c, e) Las células del CV de los ejemplares control son grandes y alargadas (flecha en a). Tras el tratamiento con etanol las células son más redondeadas (flechas en c, e) y tienen gran cantidad de vacuolas (cabeza de flecha en e). b, d, f) El campo visual presenta células polarizadas tanto en los ejemplares control de 10 somitos como en los expuestos a 1,5% de etanol (flechas en b, d). Al exponer a los embriones a concentraciones mayores de etanol las células se ven más pequeñas, redondeadas y con muchas vacuolas (flechas en f). CV: campo visual. D: dorsal; L: lateral. Barra de escala: 20  $\mu$ m.

## *Resultados*

---

En los embriones de 10 somitos tanto en los controles (Fig. 35b) como en los expuestos a 1,5% de etanol (Fig. 35d), las células del campo visual son grandes y están polarizadas. Sin embargo, en los embriones expuestos a mayores concentraciones de etanol (Fig. 35f), las células del campo visual son más grandes y redondeadas y, muchas de ellas, presentan vacuolas.

El campo visual en los embriones de 18 somitos, está formado por células grandes, orientadas hacia la región central (Fig. 36a). Además, en la región anterior del campo visual se empieza a formar el cristalino (Fig. 36b), en esta región las células son incluso más alargadas. En los ejemplares expuestos a etanol también tiene lugar la formación del cristalino (Fig. 36c). En estos embriones, en general, las células del campo visual presentan núcleos redondeados y pequeños (Fig. 36c, d) y no se observa la orientación celular que se ve en los ejemplares control. Sin embargo, las regiones más caudales de las vesículas ópticas de los embriones expuestos a etanol presentan características más similares a los animales control, los núcleos de las células son más grandes y se encuentran polarizados, al menos en lo que respecta al dominio ventral del campo visual (Fig. 36e). Por último, una de las características comunes a todos los embriones expuestos a etanol es que la región del pedúnculo óptico presenta una elevada muerte celular (Fig. 36f).



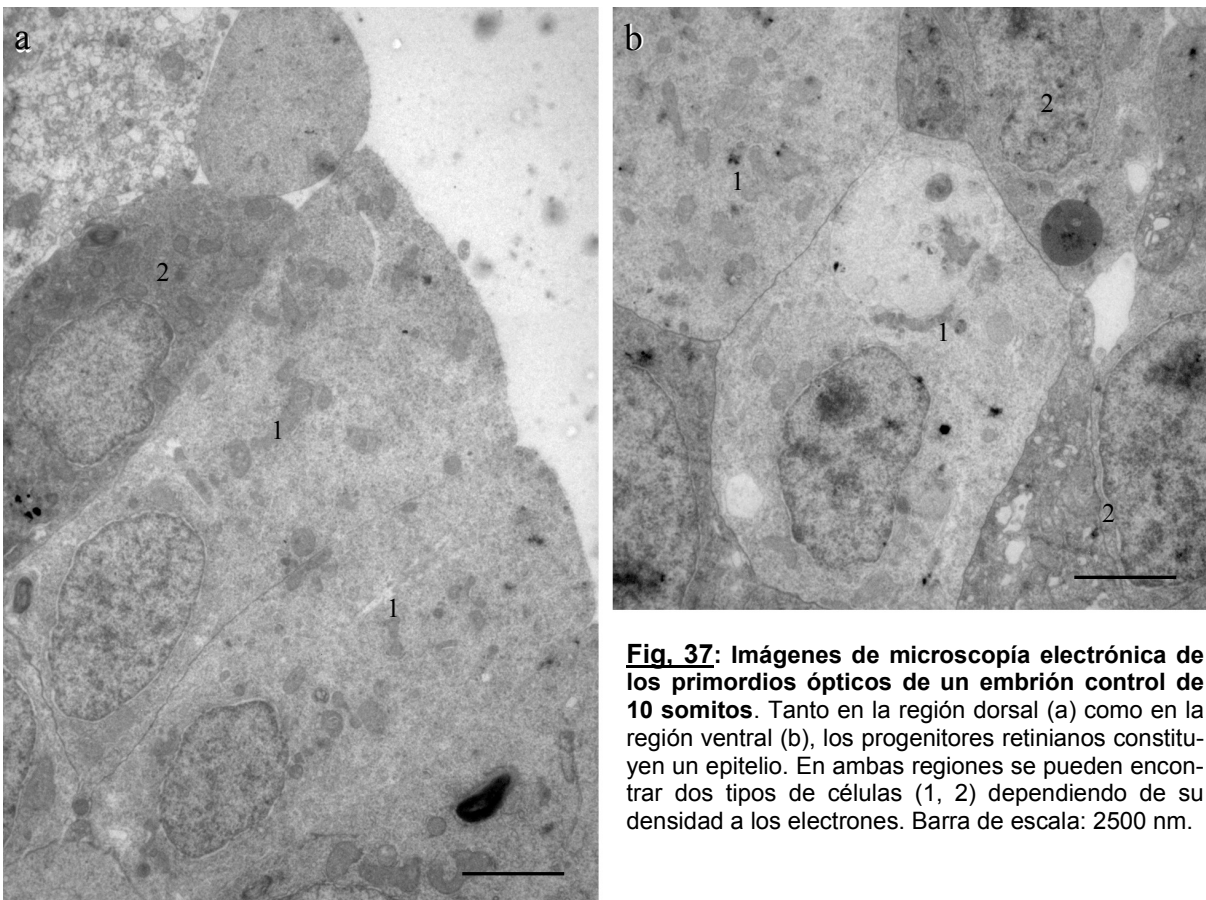
**Fig 36: Microfotografías de secciones semifinas de embriones de 18 somitos.** Las células del CV están polarizadas (flechas en a) y comienza la formación del cristalino (cabeza de flecha en b). La formación del cristalino también se observa en los ejemplares expuestos a etanol (cabeza de flecha en c), aunque las células del campo visual presentan núcleos más pequeños y redondeados (flechas en d). En la región caudal las células poseen una morfología más similar a la que presentan los ejemplares control (flechas en e). La región que va a dar lugar al pedúnculo óptico presenta una elevada muerte celular (flechas en f). CV: campo visual; D: dorsal; L: lateral. Barra de escala: 20  $\mu$ m.

También hemos analizado la citoarquitectura mediante microscopía electrónica, prestando especial atención a la morfología de la células y sus núcleos, la apariencia de la membrana plasmática y la presencia de diferenciaciones en ésta.

## Resultados

Sólo mostramos imágenes a microscopía electrónica de embriones de 10 somitos, momento en el cual las vesículas ópticas se han separado en los ejemplares control, pero permanecen fusionadas en la mayoría de los ejemplares tratados con etanol.

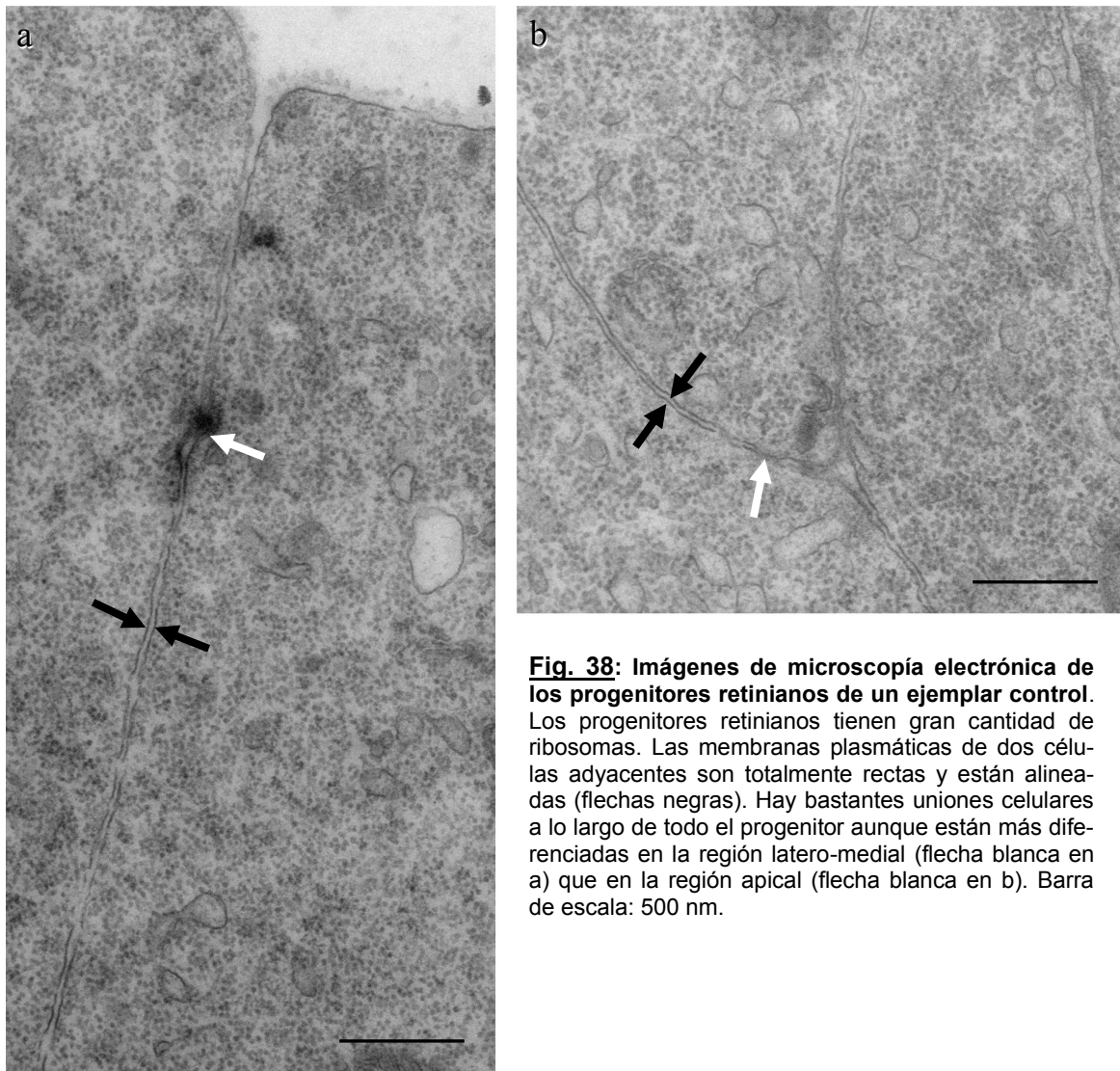
En los ejemplares control las células de los primordios ópticos tienen una morfología alargada, con núcleos situados hacia la región apical y apenas sin espacio intercelular, principalmente las de la región dorsal (Fig. 37a). En esta región se observan dos tipos de células, unas más abundantes y menos electrodensas y otras más electrodensas que son escasas. Todas las células están orientadas hacia la región central del embrión. Las células de la región ventral del primordio óptico presentan también las mismas características que las anteriores, pero con una morfología más cúbica (Fig. 37b). También se encuentran células de los dos tipos. Por tanto ambas regiones de los primordios ópticos están constituidas como un verdadero epitelio en el estadio de 10 somitos.



**Fig. 37:** Imágenes de microscopía electrónica de los primordios ópticos de un embrión control de 10 somitos. Tanto en la región dorsal (a) como en la región ventral (b), los progenitores retinianos constituyen un epitelio. En ambas regiones se pueden encontrar dos tipos de células (1, 2) dependiendo de su densidad a los electrones. Barra de escala: 2500 nm.



Al analizar con mayor detalle los progenitores retinianos resulta evidente la gran cantidad de ribosomas que poseen (Fig. 38a) y, además, éstos se distribuyen uniformemente por toda la célula. Las membranas plasmáticas de dos células contiguas están perfectamente alineadas y casi no existe espacio intercelular entre ellas (Fig. 38a). A lo largo de toda la longitud del progenitor hemos encontrado uniones celulares con un aspecto más o menos diferenciado. Las uniones celulares más diferenciadas se encuentran en la región latero-medial de los progenitores (Fig. 38a). En la región apical de las células, aunque éstas presentan un aspecto fusiforme, no hemos encontrado grandes complejos de unión y los que hay no están muy diferenciados (Fig. 38b).



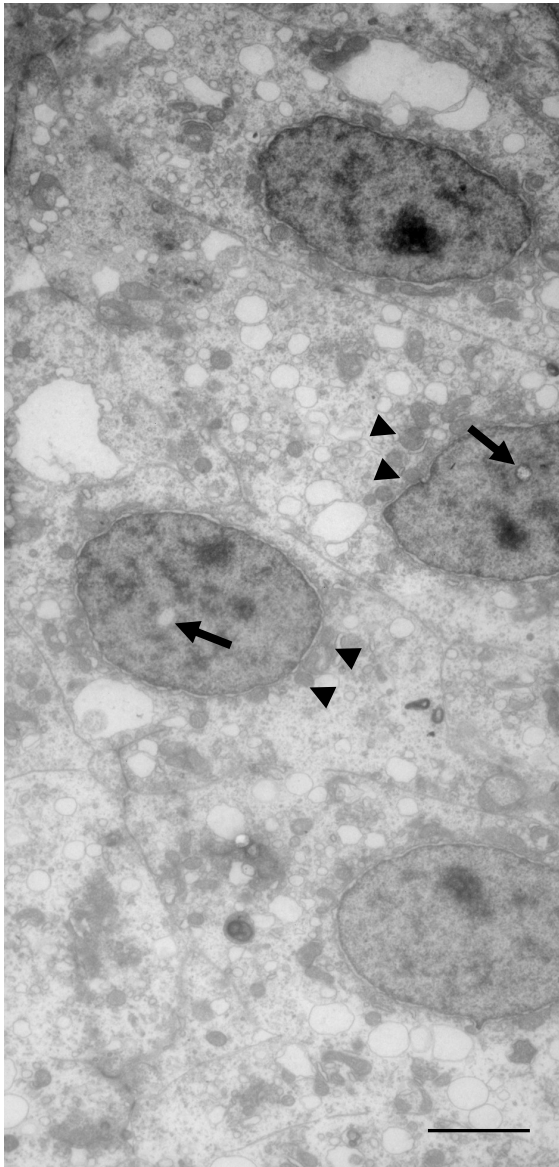
**Fig. 38:** Imágenes de microscopía electrónica de los progenitores retinianos de un ejemplar control. Los progenitores retinianos tienen gran cantidad de ribosomas. Las membranas plasmáticas de dos células adyacentes son totalmente rectas y están alineadas (flechas negras). Hay bastantes uniones celulares a lo largo de todo el progenitor aunque están más diferenciadas en la región latero-medial (flecha blanca en a) que en la región apical (flecha blanca en b). Barra de escala: 500 nm.

En los ejemplares expuestos a etanol la organización es distinta. Las células no tienen un aspecto epitelial y, aunque algunas son fusiformes, no están

## Resultados

---

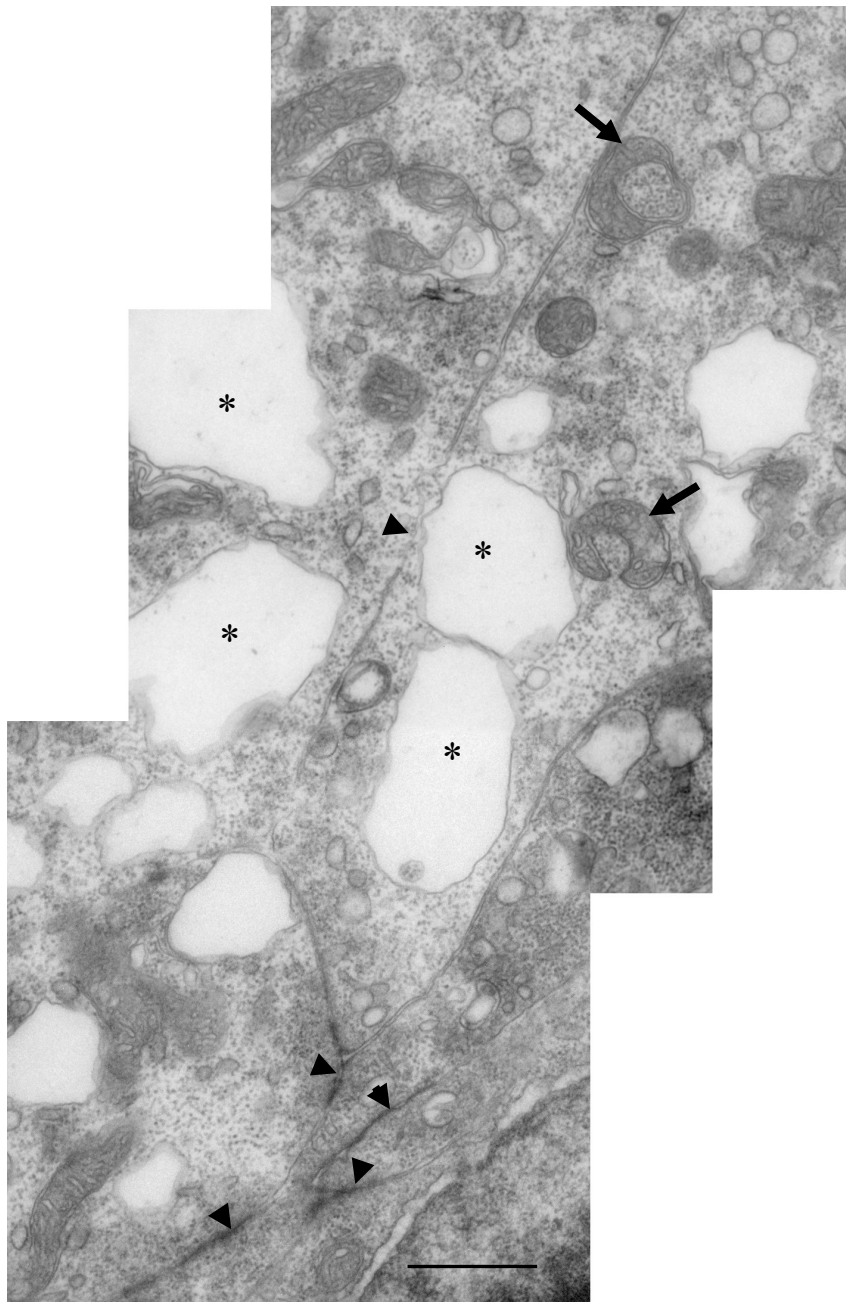
orientadas en la misma dirección. Lo primero que destaca en estos embriones es el aspecto del citoplasma, con gran cantidad de vacuolas y un reducido número de ribosomas (Fig. 39). Los núcleos, en general, no tienen una forma tan alargada como en los controles y, en muchos casos, presentan pseudo-inclusiones en su interior (Fig. 39). En general, el citoplasma es poco electrodensito y es muy frecuente encontrar mitocondrias pegadas al núcleo de los progenitores retinianos (Fig. 39).



**Fig. 39:** Imágen de microscopía electrónica de los progenitores retinianos de un ejemplar expuesto a 2% de etanol. Los progenitores retinianos tienen un aspecto poco electrodensito, muy vacuolizado y con menos ribosomas que en los ejemplares control. Aunque algunas células se encuentran polarizadas no lo hacen todas en la misma dirección. Los núcleos también tienen un aspecto más redondeado que en los ejemplares control y, en muchos casos presentan pseudo-inclusiones en su interior (flechas). Es frecuente ver mitocondrias muy cerca del núcleo (cabeza de flecha). Barra de escala: 2500 nm.

Al analizar los progenitores retinianos de los animales tratados con etanol, destaca la gran cantidad de vacuolas y mitocondrias con aspectos irregulares que presentan (Fig. 40). El aspecto de la membrana no es muy diferente a los ejemplares control y también hemos encontrado uniones celulares. De hecho, parece que son más abundantes, al menos, en la región apical. Sin embargo, estas

uniones no parecen tener un patrón determinado y las células se ven bastante desorganizadas (Fig. 40).



**Fig. 40:** Imágen de microscopía electrónica de los progenitores retinianos de un ejemplar expuesto a 2% de etanol. Progenitores retinianos con gran cantidad de vacuolas (asteriscos) y mitocondrias con morfologías aberrantes (flechas). Hay bastantes uniones celulares de aspecto no muy diferenciado y desordenadas (cabezas de flecha), de manera que las células no sólo se unen por sus dominios apicales. Barra de escala: 500 nm.

### 4.2.3 Alteración de la polaridad celular por parte del etanol

Tras comprobar que la morfología celular está alterada por la exposición a etanol y que las células no modifican su morfología de circular a fusiforme, hemos analizado el patrón de distribución de Zo1.

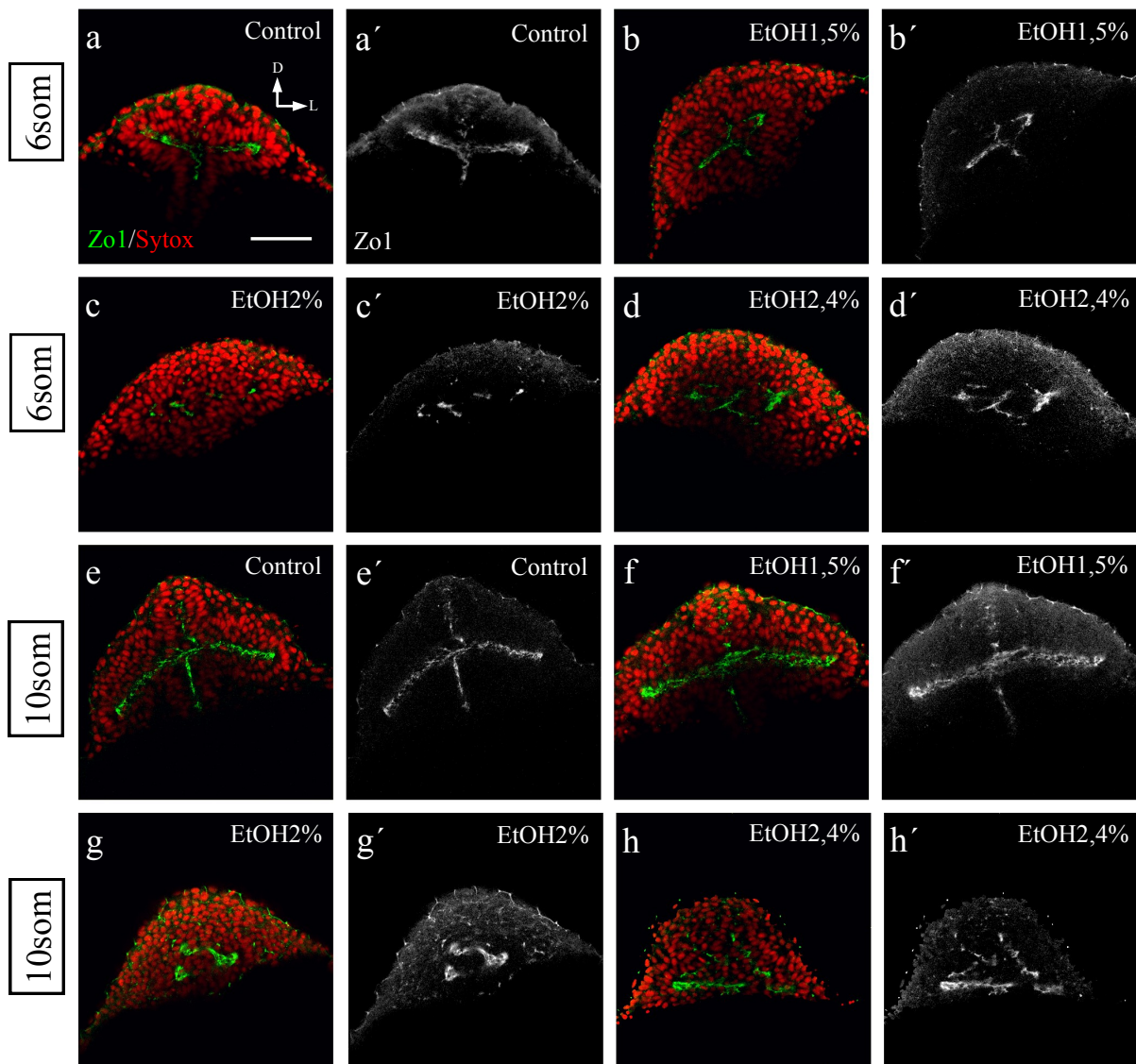
En los embriones de 3 somitos (información no mostrada) no encontramos inmunorreactividad para Zo1, lo que revela la ausencia de polarización a esta edad.

## *Resultados*

---

En el estadio de 6 somitos las células del campo visual de los ejemplares control expresan Zo1 en su dominio apical (Fig. 41a, a'), orientándose todas ellas hacia un eje central presuntivo. También se distingue que las células de otras regiones prosencefálicas (telencéfalo y diencefalo) sufren el mismo proceso aunque con distinta orientación. En los embriones expuestos a 1,5% de etanol (Fig. 41b, b') se observa el mismo patrón de marcaje para Zo1, pero el eje central no está perfectamente constituido. Las mismas alteraciones se observan en la polarización del telencéfalo y el diencefalo. En los embriones expuestos a 2% (Fig. 41c, c') y 2,4% (Fig. 41d, d') de etanol hay marcaje para Zo1 en la región central de los embriones, pero no se observa el patrón de distribución característico de los controles. Además, las células de dicha región no están dispuestas en la misma dirección como sucede en los ejemplares control. Por otro lado, es difícil distinguir la polarización que deberían haber sufrido las otras regiones prosencefálicas.

Los ejemplares control de 10 somitos presentan dos vesículas ópticas totalmente evaginadas entre las que se encuentran el telencéfalo dorsalmente y el diencefalo ventralmente (Fig. 41e, e'). Las células de los primordios ópticos están orientadas hacia un eje central, quedando divididas en una porción dorsal y otra ventral. Las vesículas ópticas todavía están conectadas directamente con el resto del prosencefalo ya que no ha tenido lugar la formación del pedúnculo óptico. Las células que unen las vesículas con el resto del SNC también se encuentran orientadas. Los embriones expuestos a 1,5% de etanol (Fig. 41f, f') son muy parecidos a los embriones no tratados pero su desarrollo parece retrasado. Además, el eje central, que se pone de manifiesto por la presencia de Zo1, no está tan bien definido, sino que es una banda más amplia. El patrón de distribución de Zo1 de los ejemplares expuestos a 2% (Fig. 41g, g') y 2,4% (Fig. 41h, h') de etanol es totalmente distinto. Las células sí se han orientado, o al menos algunas de ellas, aunque no hacia un único eje sino que hay varios ejes dentro del campo visual. Por otro lado, mientras que en los controles no hay muchas regiones inmunorreactivas para Zo1 fuera de los dominios ya mencionados, en los embriones tratados con 2% y 2,4% de etanol es fácil distinguir células marcadas fuera de ellos.

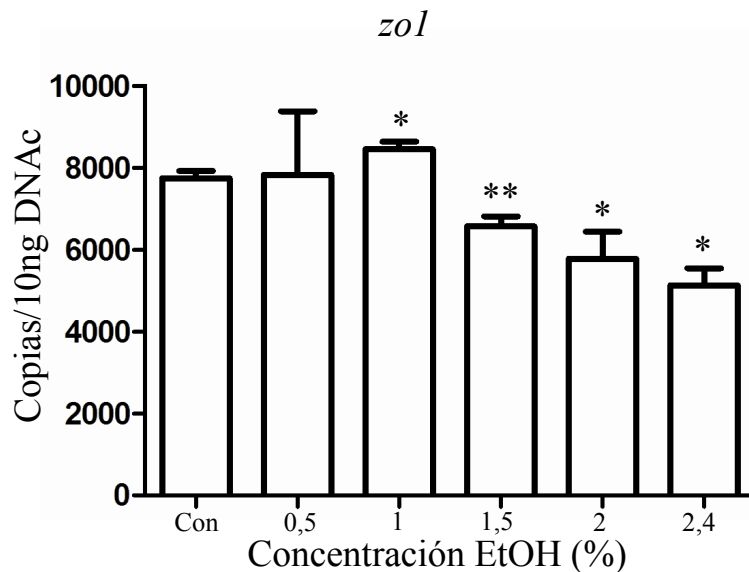


**Fig. 41: Patrón de distribución de Zo1.** a-d) En los ejemplares control de 6 somitos, Zo1 se localiza en la región apical de las células del campo visual (a, a') y éstas se orientan hacia un hipotético eje en la región central. La exposición a 1,5% de etanol induce un retraso en la polarización (b, b'), mientras que la exposición a 2% (c, c') y 2,4% (d, d') de etanol produce una alteración en la distribución de Zo1. e-h) En embriones de 10 somitos hay más marcaje para Zo1 y quedan definidos los dos primordios ópticos en los ejemplares control (e, e') con las células orientadas hacia el eje central. En los embriones expuestos a 1,5% de etanol (f, f') se observa un patrón similar. En los ejemplares expuestos a 2% (g, g') y 2,4% (h, h') de etanol el marcaje para Zo1 está disperso y no se observa la polarización celular de las células del campo visual. D: dorsal; L: lateral. Barra de escala 50µm.

El etanol es capaz de alterar la distribución normal de Zo1 y por tanto los procesos de polarización y orientación celular que se producen en el campo visual. Hemos analizado la expresión de *zo1* por QRT-PCR en embriones de 10 somitos (Fig. 42). En los ejemplares control se encontraron 8000 copias de *zo1*. No observamos variaciones significativas en la expresión de este gen en los embriones expuestos a 0,5% de etanol y sólo un ligero aumento en los embriones expuestos a 1% de etanol. En los ejemplares expuestos a 1,5% de etanol el número de copias es significativamente menor. Aunque los embriones expuestos a 2% y 2,4% de

## Resultados

etanol muestran un número de copias significativamente inferior al que presentan los controles, también presentan variabilidad. En el caso de los animales expuestos a 2% de etanol se encontraron 6000 copias de *zo1* y en los ejemplares expuestos a 2,4% de etanol 5000 copias. Por tanto, el etanol no sólo reduce el número de copias de *zo1* cuando los embriones se exponen a 1,5%, 2% y 2,4% sino que lo hacen de manera dosis dependiente, siendo los embriones expuestos a la mayor concentración de etanol los que menor número de copias presentaban.



**Fig. 43:** Cuantificación de la expresión de *zo1* en el estadio de 10 somitos mediante QRT-PCR. A concentraciones bajas el etanol aumenta ligeramente la expresión de *zo1*. Cuando se utilizan concentraciones elevadas de etanol (a partir de 1,5%) disminuye la expresión de *zo1*.  
\* =  $p < 0,05$ ;  
\*\* =  $0,05 > p > 0,001$ .

Tras comprobar que la exposición embrionaria a etanol produce alteraciones en la polarización celular, analizamos si ocurría lo mismo en algunos modelos de ciclopia genética. Para ello estudiamos el patrón de expresión de *Zo1* en los mutantes *syu*, *sno*, *cyc* y *oep*. Las imágenes de los mutantes *cyc* y *oep* fueron realizadas en el UCL (Londres) por la Dra. Florencia Cavodeassi, que amablemente nos ha autorizado su uso.

Los mutantes *syu* no tienen *Shh* y una de las hipótesis sobre la causa de la ciclopia inducida por etanol es la alteración de la expresión de *shh*. El patrón de expresión de *Zo1* es normal en todos los embriones de 6 somitos analizados (Fig. 43a, a'), aunque algunos presentan un patrón algo alterado en el estadio de 10 somitos (Fig. 43b, b'). Estos embriones tienen dos vesículas ópticas evaginadas.

En el caso de los mutantes *sno* el patrón de distribución de *Zo1* es similar al de los ejemplares control, salvo por una diferencia que se repetía en los embriones de 6 (Fig. 43c, c') y 10 (Fig. 43d, d') somitos. Las células del campo visual dorsal y

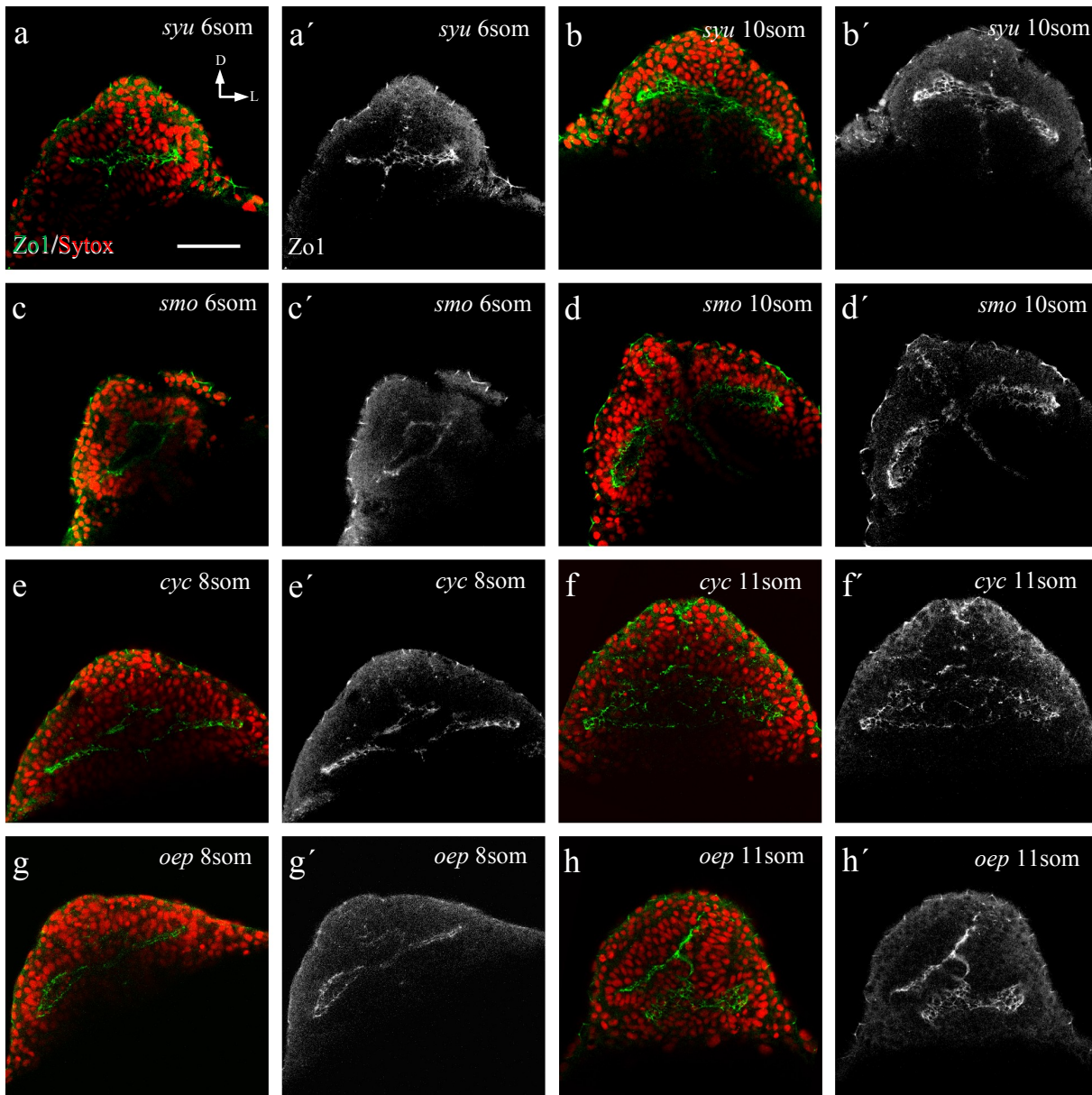
del ventral no quedan confrontadas directamente ya que queda un pequeño espacio entre ellas, que es más amplio en las regiones laterales.

Los mutantes *cyc* presentan indicios de ciclopia claros, aunque no a los 8 somitos donde el patrón de Zo1 era parecido al de los ejemplares control (Fig. 43e, e'). La polarización en el telencéfalo y el diencefalo parece que no es correcta y se pierde en la región central del campo visual. Sin embargo, en el estadio de 11 somitos (Fig. 43f, f') no hay evidencias de evaginación y las células se han polarizado en torno a un amplio eje central que parece triangular. En este caso las células se encuentran orientadas hacia un único eje que da lugar al característico ojo único central de estos mutantes.

En el caso de los mutantes *oep*, los embriones de 8 somitos (Fig. 43g, g') presentan una expresión menor de zo1 en el campo visual. Además, dicho marcaje es asimétrico y hay una mayor densidad de células polarizadas en un lado que en el otro. Sin embargo, el fenotipo no está tan gravemente alterado como en los ejemplares expuestos a etanol. En el estadio de 11 somitos (Fig. 43h, h'), las células están polarizadas hacia varios ejes situados en distintas orientaciones y regiones del campo visual. Esta polarización se parece más a la inducida por la exposición temprana a etanol, aunque está algo más organizada ya que los distintos ejes de polarización están claramente definidos y prácticamente no hay células polarizadas fuera de ellos.

El etanol altera no sólo la distribución espacial de Zo1 sino que también reduce sus niveles de expresión. De los mutantes analizados, sólo *cyc* y *oep* presentan patrones de distribución de Zo1 alterados y los mutantes *oep* se parecen más a los embriones expuestos a etanol. Estos dos tipos de embriones muestran células polarizadas en los estadios finales de la evaginación pero se establecen varios ejes de polarización.

## Resultados



**Fig. 43:** Patrón de distribución de Zo1 en mutantes *smo*, *syu*, *cyc* y *oep*. a, b) Los mutantes *syu* no presentan alteraciones en la distribución de Zo1 en el campo visual, ni en embriones de 6 (a, a') ni en los de 10 somitos (b, b'). c, d) Los mutantes *smo* de 6 somitos tienen un espacio entre las dos filas de células positivas para Zo1 (c, c') y cada hilera se polariza correctamente. Dicho espacio sigue siendo visible en el estadio de 10 somitos (d, d') y se ven los dos primordios ópticos evaginados. e, f) Los ejemplares *cyc* de 8 somitos (e, e') tienen una banda positiva a Zo1 en la región central. En el estadio de 11 somitos (f, f') hay una evaginación incompleta y hay muchas regiones positivas para Zo1. g, h) Los ejemplares *oep* de 6 somitos (g, g') presentan una distribución de Zo1 similar a los mutantes *cyc*, con un hipotético eje central hacia el que están polarizadas las células. En el estadio de 11 somitos (h, h') el patrón de marcaje es distinto ya que hay una polarización hacia varios ejes con distintas orientaciones. D: dorsal; L: lateral. Barra de escala 50µm.

### 4.2.4 Resumen

El etanol altera la expresión de algunos genes implicados en la evaginación de las vesículas ópticas, principalmente de aquellos genes que se expresan dentro del campo visual (*rx3*, *six3a*). El etanol no sólo altera la expresión de morfógenos,



sino también de genes que codifican para proteínas del citoesqueleto como *zo1*. Tras la exposición a etanol, las células tienen núcleos más pequeños y redondeados, menor cantidad de ribosomas y más vacuolas. Aunque tienen uniones celulares, éstas parecen más inmaduras y desorganizadas. La distribución de Zo1 está alterada en los embriones expuestos a etanol y es distinta a la distribución en otros modelos ciclópeos que hemos analizado, aunque el que presentan los mutantes *oep* es bastante similar.

### 4.3-EFECTOS DEL ETANOL A LARGO PLAZO

Tras comprobar el efecto de la exposición a etanol durante la gastrulación y la evaginación de las vesículas ópticas, hemos analizado qué ocurre a largo plazo con las áreas visuales de los embriones ciclópeos y para ello hemos utilizado ejemplares a las 48 hpf, 3 y 5 dpf. En ellos, estudiamos la proliferación y diferenciación celular y la organización de la retina y el techo óptico. Los embriones ciclópeos fueron obtenidos tal y como se indica en el apartado de material y métodos.

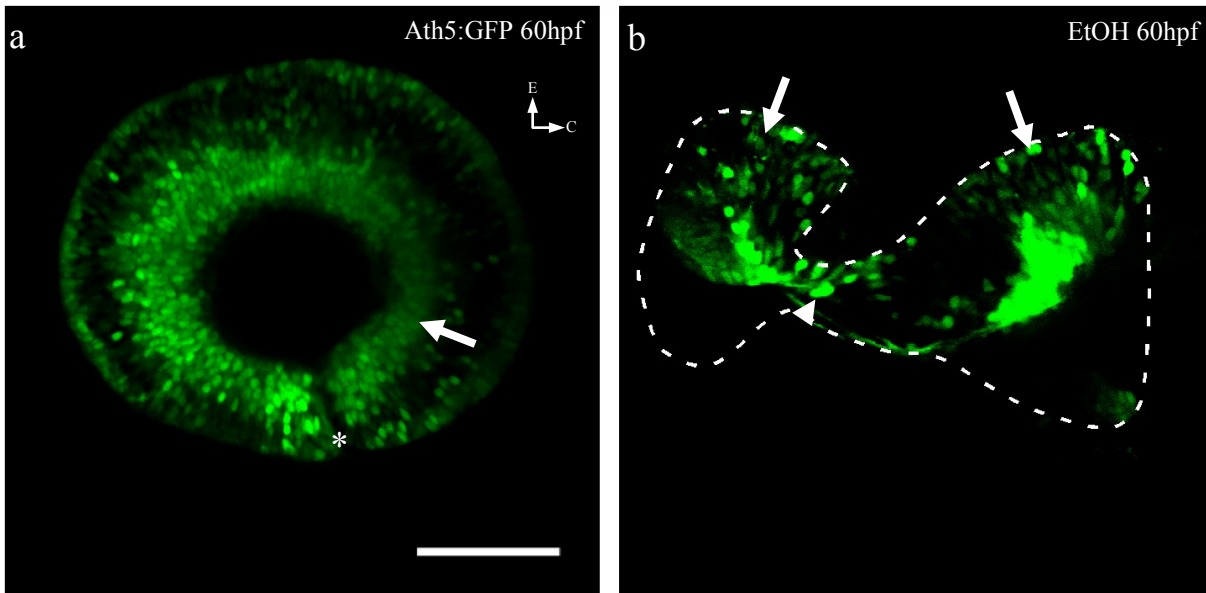
#### 4.3.1 Organización inicial de la retina de embriones ciclópeos

Hemos utilizado animales transgénicos expuestos a etanol para ver la distribución del factor de transcripción bHLH Ath5 (*atoh7*), que se expresa en las células ganglionares en proceso de diferenciación, siendo éste el primer marcador de diferenciación de la retina. En estos animales transgénicos, la proteína GFP se expresa bajo el promotor de *ath5*, por lo que no vemos la proteína en si, sino que lo que se marcan son las células que expresan el factor. Estos animales son muy útiles para conocer el lugar de expresión de dicha proteína sin necesidad de fijar el tejido, ya que la fluorescencia es suficientemente intensa como para poder tomar imágenes de microscopía confocal *in vivo*.

La expresión de *ath5* comienza en la región vitreal central de la retina a las 28/30 hpf y se extiende como una ola hacia las regiones laterales. Alrededor de las 60 hpf ocupa toda la extensión de la retina vitreal (Fig. 44a), en lo que constituirá la CCG, exceptuando la fisura coroidea. Ath5 también se expresa en algunas células

## Resultados

de la región central y en las células más esclerales, zonas que darán lugar a la CPI y la CNI. Los ejemplares ciclópeos presentan un patrón de distribución de Ath5 similar al de las larvas control, pero el marcaje está restringido a la región central de la retina (Fig. 44b). En la región donde las vesículas ópticas de las larvas ciclópeas se fusionan se encuentran elementos positivos para Ath5.

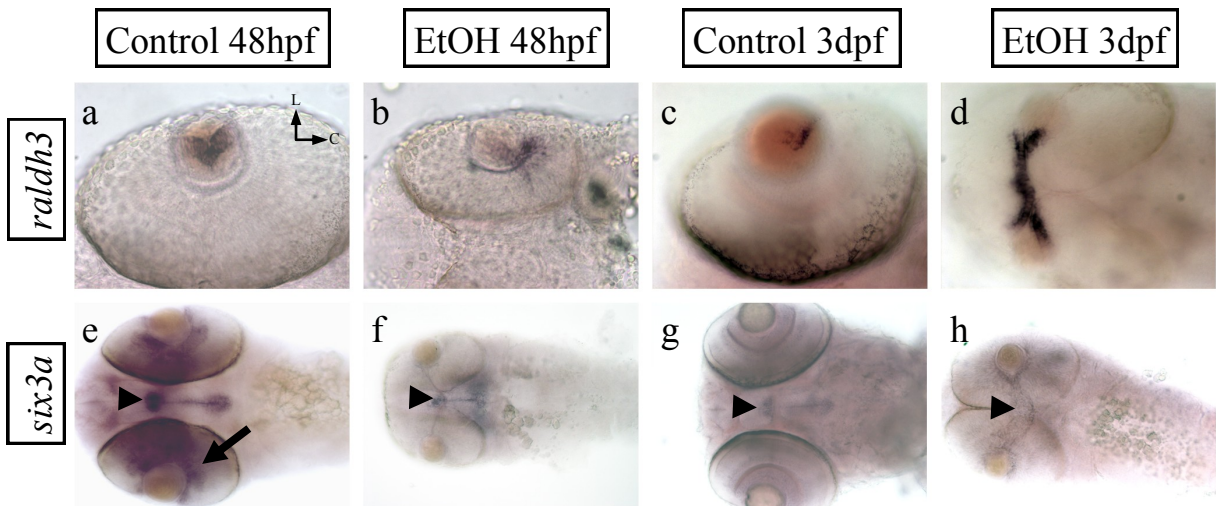


**Fig. 44:** Expresión de *ath5:GFP* en ejemplares control y ciclópeos. En los ejemplares control (a) Ath5 se distribuye en la células de la CCG presuntiva (flecha en a) extendiéndose por toda la retina excepto en la fisura coroidea (asterisco en a). En los ejemplares ciclópeos (b), el marcaje presenta una menor extensión y sólo se encuentra en la región central de ambas hemi-retinas (flechas en b) y en la región de fusión de ambas (cabeza de flecha en b). hpf: horas post-fecundación. C: caudal; E: escleral. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

Mediante HIS hemos estudiado la distribución de algunos marcadores que intervienen en la organización dorso-ventral de la estructura retiniana como *raldh3* y *six3a*. El primero de los marcadores estudiados, *raldh3*, se expresa en la región ventral de la retina, en una zona próxima al cristalino en los ejemplares control y ciclópeos a las 48 hpf (Fig. 45a, b). A los 3 dpf, el patrón de expresión de *raldh3* es prácticamente el mismo, aunque algo más débil en las larvas control (Fig. 45c) mientras que es más intenso en los ejemplares ciclópeos (Fig. 45d). En los organismos ciclópeos cada hemirretina expresa *raldh3*, llegando ambos dominios a fusionarse en la región más ventral. A los 5 dpf, la expresión de *raldh3* era indetectable en ambos grupos experimentales.

A las 48 hpf, en los ejemplares control *six3a* se expresa en la región ventral de la retina y en el diencéfalo, lo que en este estadio ya constituye el hipotálamo

(Fig. 45e). En los ejemplares ciclópeos, a las 48 hpf, no hay expresión de *six3a* en la retina (Fig. 45f) aunque sí en el hipotálamo. Esta estructura no se localiza directamente entre ambas vesículas sino en una posición más dorsal que en los animales control. A los 3 dpf no encontramos expresión de *six3a* en la retina de los ejemplares control (Fig. 45g) pero sí en el hipotálamo; en los animales ciclópeos se ve expresión de *six3a* tanto en la retina como en el hipotálamo (Fig. 45h).



**Fig. 45: Expresión de *raldh3* y *six3a* en la retina de ejemplares control y ciclópeos.** a-d) *raldh3* en la región ventral de la retina adyacente al cristalino a las 48 hpf, tanto en ejemplares control (a) como en ciclópeos (b). A los 3 dpf la expresión de *raldh3* es menor en los animales control (c) pero es muy intenso en los ciclópeos (d), incluso el marcaje de las dos hemirretinas se fusiona. e-h) A las 48 hpf *six3a* se expresa en la región ventral de la retina (flecha en e) y en el hipotálamo presuntivo (cabeza de flecha en e) en los ejemplares control. No se observa marcaje en la retina de los ejemplares ciclópeos pero sí en el hipotálamo (cabeza de flecha en f). A los 3 dpf no se ve marcaje en la retina (g) aunque sí en el hipotálamo, tanto en ejemplares control como ciclópeos (cabeza de flecha en g, h). C: caudal; L: lateral.

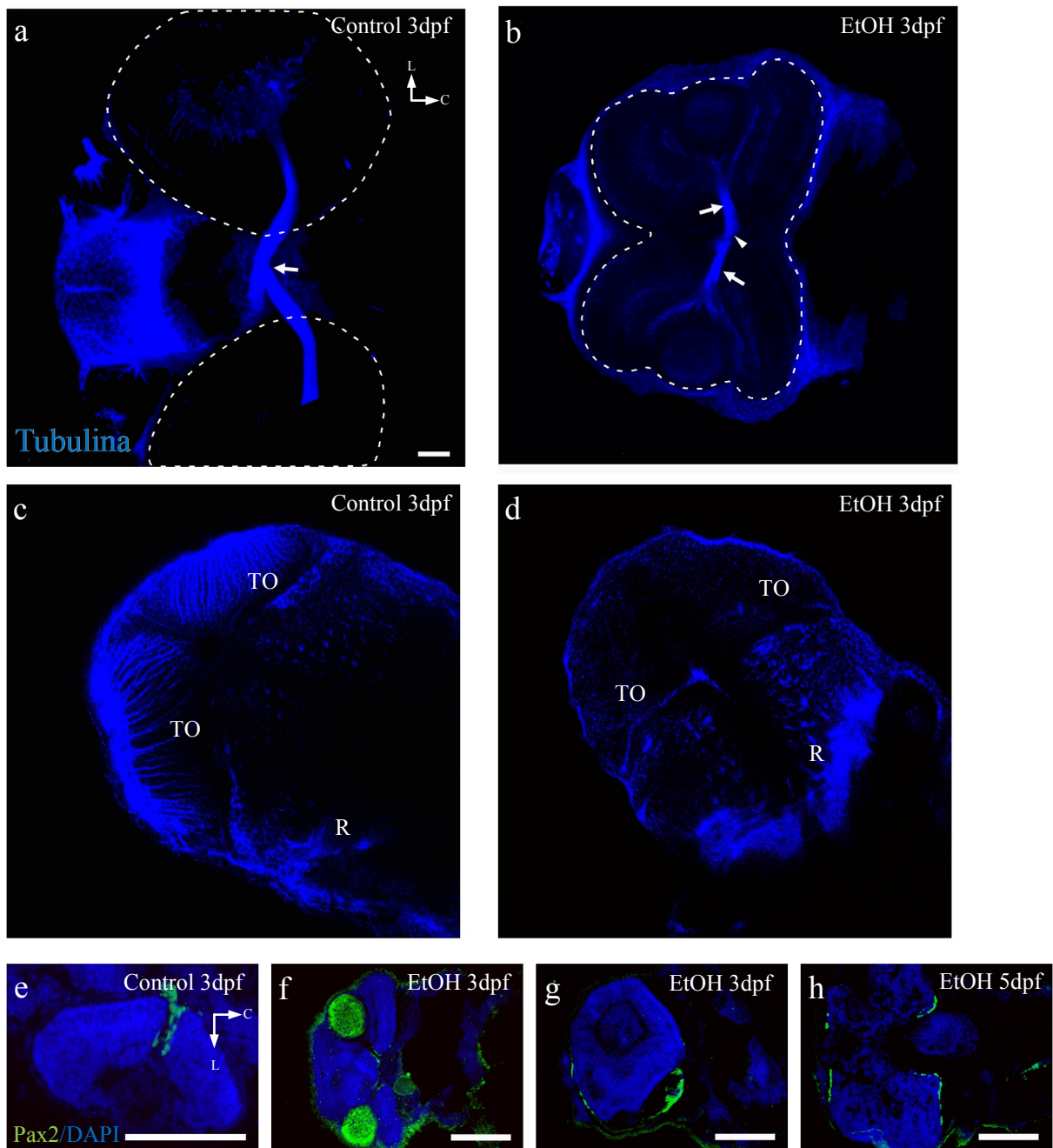
Los ejemplares ciclópeos parece que no presentan alteraciones en el inicio de la diferenciación de la retina, aunque sí existe un retraso en su proceso de organización. Además, *six3a* se expresa menos en la retina de las larvas ciclópeas, mientras que en otras regiones no se modifica su expresión.

### **4.3.2 Nervio óptico**

Para analizar la organización y estructura del nervio óptico realizamos una inmunohistoquímica contra Tubulina acetilada y contra Pax2.

En los ejemplares control (Fig. 46a) cada retina presenta un nervio óptico saliendo de la misma y ambos se unen en el quiasma óptico, donde se decusan para dirigirse a centros superiores. Sin embargo, en los ejemplares ciclópeos (Fig. 46b), aunque cada hemirretina presenta un nervio óptico, éstos son más delgados y se fusionan en el interior de la retina, saliendo únicamente un nervio óptico. Analizando secciones seriadas no encontramos ninguna decusación del nervio óptico. Al analizar el marcaje para Tubulina acetilada en las regiones dorsales de los ejemplares control (Fig. 46c), se ven numerosas proyecciones en el TO, sobre todo en la región posterior y en la ZBS, así como en las paredes laterales del rombencéfalo. Sin embargo, el marcaje observado en los animales ciclópeos (Fig. 46d) es mucho menor, casi inexistente en la ZBS y en la región posterior del TO. Las proyecciones del rombencéfalo no presentan una organización clara.

Las células Pax2 positivas son muy importantes para el empaquetamiento y organización del nervio óptico y, a los 3 dpf, en los ejemplares control (Fig. 46e) se localizan en la parte externa del nervio y en su salida de la retina. En cada uno de los nervios ópticos de los organismos ciclópeos también hay células Pax2 positivas (Fig. 46f), pero es frecuente observar algunas células ectópicas localizadas alrededor de la retina (Fig. 46g), región en la que nunca se observan en los ejemplares control. Además, estas células se ven en estadios posteriores (Fig. 46h).



**Fig. 46: Distribución de Tubulina acetilada y Pax2.** a, b) Nervios ópticos marcados con Tubulina acetilada, su fusión da lugar al quiasma óptico (flecha en a). Los animales ciclopes presentan un nervio óptico en cada hemirretina (flechas en b) y ambos se fusionan en el interior de la retina (cabeza de flecha en b). c, d) Vista dorsal del encéfalo donde se observa la distribución de Tubulina. Proyecciones positivas en el TO y R de los ejemplares control (c). Los animales ciclopes tienen menos proyecciones positivas para Tubulina y están desorganizadas (d). e-h) En los ejemplares control (e), las células Pax2 positivas se localizan alrededor del nervio óptico y en la región de la cabeza del mismo. En los animales ciclopes hay células positivas en las mismas localizaciones (f), y además, alrededor de la retina (g). Estas células persisten, al menos, hasta el final de la organogénesis (h). C: caudal; L: lateral; R: rombencéfalo; TO: techo óptico. Barras de escala: a-d = 50  $\mu$ m; e-h = 100  $\mu$ m.

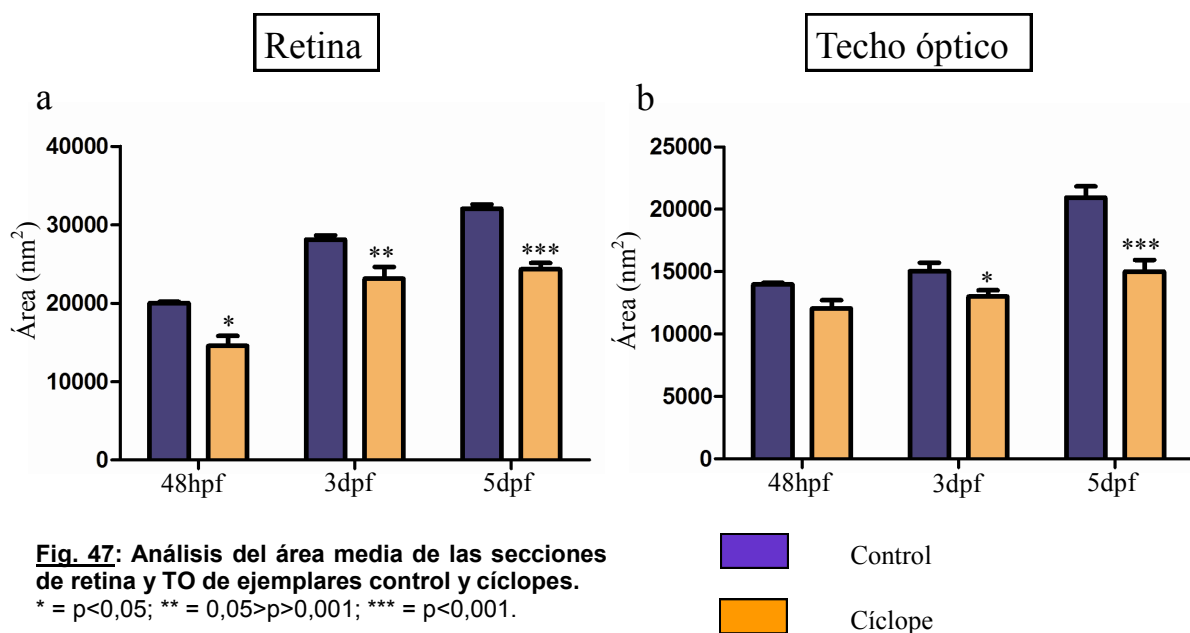
## Resultados

### 4.3.3 Tamaño de la retina y del techo óptico

Para cuantificar el tamaño medio de la retina de los ejemplares ciclópeos, medimos el área de regiones centrales de la retina de los ejemplares control y de una de las dos hemirretinas de los animales ciclópeos. También medimos el área de uno de los dos hemisferios del TO de cada grupo. Siempre escogimos regiones anatómicamente comparables entre ambos grupos y las mismas en las que posteriormente contaríamos el número de células positivas para cada marcador analizado.

En todos los estadios analizados (48 hpf, 3 y 5 dpf), el tamaño medio de la retina fue significativamente inferior en los ejemplares ciclópeos (Fig. 47a). Aunque entre las 48 hpf y los 3 dpf hay un aumento del tamaño de la retina en ambos grupos de ejemplares, esta tendencia se mantiene en los animales control entre los 3 y 5 dpf. Hay que tener en cuenta que la variabilidad en los datos de los ejemplares ciclópeos fue siempre mayor que en los controles.

En el caso del TO los resultados son similares (Fig. 47b). El TO de los ejemplares control es mayor que en los ciclópeos, aunque a las 48 hpf los resultados no son significativos. En el TO el aumento de tamaño más llamativo se produce entre los 3 y 5 dpf en los ejemplares control, mientras que en los animales ciclópeos el área media del TO permanece más constante y no sufre un aumento tan acusado.



**Fig. 47:** Análisis del área media de las secciones de retina y TO de ejemplares control y ciclópeos. \* = p < 0,05; \*\* = 0,05 > p > 0,001; \*\*\* = p < 0,001.

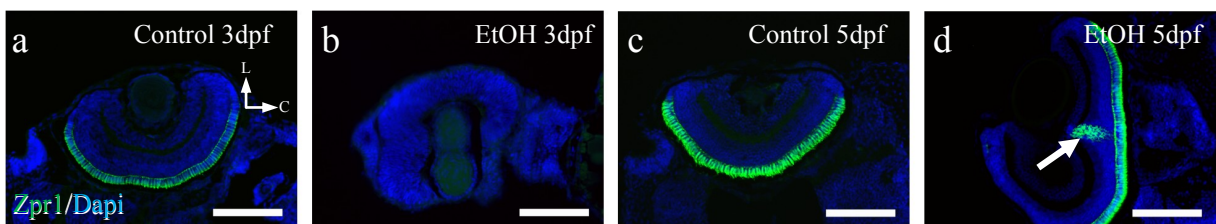
#### 4.3.4 Diferenciación de la retina

Hemos estudiado la distribución de una batería de marcadores que nos permite comprobar la diferenciación celular en la retina y el TO. Pretendemos cuantificar el número de células positivas en cada caso y evaluar si la diferenciación global de la retina y el TO están afectadas. Debido a las diferencias observadas en el área media de la retina y el TO hemos analizado la densidad relativa de células positivas para cada marcador (número de células por unidad de superficie).

##### Zpr1

Hemos estudiado la presencia o ausencia de los dos tipos de fotorreceptores de la retina. En los ejemplares control, en el estadio de 3 dpf se observaron células positivas para Zpr1, conos, distribuidos por toda la extensión de la retina (Fig. 48a), mientras que en los animales ciclópeos no se ve ninguna célula positiva (Fig. 48b). A los 5 dpf, se encontraron gran cantidad de conos tanto en los ejemplares control como en los ciclópeos y con una distribución similar (Fig. 48c, d), desde la región central hasta la lateral pero nunca en el margen ciliar (MC). En los animales ciclópeos la inmunorreactividad está algo menos extendida, lo cual es consecuente con el retraso en el desarrollo general inducido por el etanol. Además, en los ejemplares ciclópeos a los 5 dpf (Fig. 48d) se ven células positivas para Zpr1 en la región donde se fusionan las vesículas ópticas, región que carece de organización laminar.

Al cuantificar la densidad de conos en las retinas de ambos grupos (Fig. 56a), vemos una ausencia total en los animales ciclópeos a los 3 dpf, mientras que en los controles hay 3 conos/1000micras<sup>2</sup>. A los 5 dpf, hay un ligero aumento en la densidad de conos en los ejemplares control y el aumento es mayor en los ciclópeos, igualándose la densidad en ambos dos grupos.



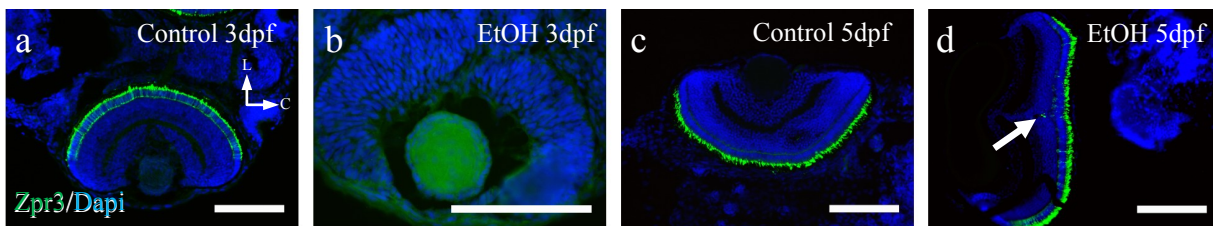
**Fig. 48: Distribución de Zpr1.** Sólo los ejemplares control muestran células positivas para Zpr1 a los 3 dpf (a, b). A los 5 dpf, la distribución de células positivas en ambos tipos de grupos es similar (c, d). Se ven numerosos conos positivos en la región de fusión de ambos ojos en los ejemplares ciclópeos (flecha en d). C: caudal; Lateral. Barras de escala: 100  $\mu$ m.

## Resultados

### Zpr3

El marcador Zpr3 es exclusivo de bastones. A los 3 dpf se ven células positivas para Zpr3 en las retinas de los animales control, mientras que en los animales ciclópeos no se observó ninguna (Fig. 49a, b). A los 5 dpf, los bastones están distribuidos a lo largo de toda la retina excepto en el MC, tanto en los ejemplares control como en los ciclópeos (Fig. 49c, d). Además, hay bastones en la región de fusión de los ojos, aunque son menos abundantes que los conos.

Al cuantificar la densidad de bastones en ambos tipos de retinas (Fig. 56b) no encontramos células positivas en la retina de los ejemplares ciclópeos a los 3 dpf, mientras que en los ejemplares control hay más de 2 bastones/1000micras<sup>2</sup>. A los 5 dpf, la densidad de bastones aumenta considerablemente en los ejemplares control alcanzando un valor superior a 4 bastones/1000micras<sup>2</sup>. También aumenta en los animales ciclópeos, pero la densidad de bastones es significativamente mayor en los ejemplares control que en los cíclopes.



**Fig. 49: Distribución de Zpr3.** Sólo los ejemplares control muestran células positivas para Zpr3 a los 3 dpf (a, b). A los 5 dpf, hay células positivas en ambos tipos de ejemplares (c, d). También se ven bastones positivos en la región de fusión de ambos ojos en los ejemplares ciclópeos (flecha en h). C: caudal; L: lateral. Barras de escala: 100  $\mu$ m.

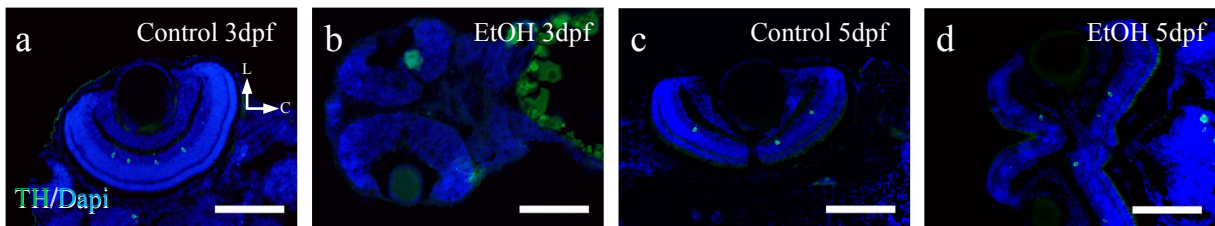
### TH

Las células TH positivas se observan a los 3 dpf en la retina de los ejemplares control (Fig. 50a), concentradas en la región central de la CNI. Sin embargo, no se encuentran estas células en la retina de los animales ciclópeos (Fig. 50b). A los 5 dpf las células TH positivas se encuentran distribuidas por toda la retina de los ejemplares control, excepto en el MC (Fig. 50c), y también en las larvas ciclópeas, aunque concentradas en la región central de ambas hemirretinas (Fig. 50d).

Al cuantificar las células TH positivas, encontramos que en los ejemplares control la densidad era siempre baja (Fig. 56c) y se mantenía bastante constante entre los 3 y los 5 dpf. En los animales ciclópeos, aunque no se encontraron células positivas para este marcador a los 3 dpf, su densidad aumentaba de tal manera a



los 5 dpf que era significativamente superior a la observada en los ejemplares control.



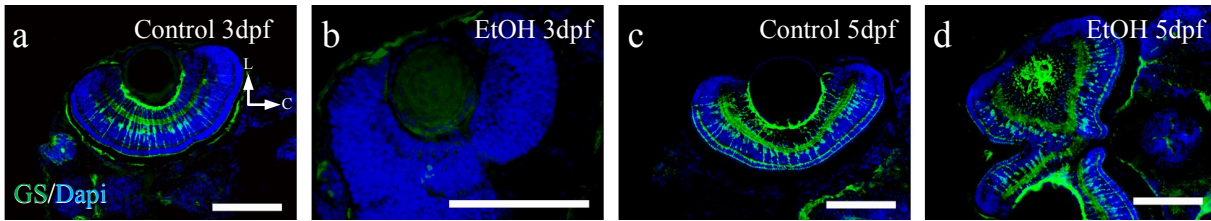
**Fig. 50: Distribución de TH.** En la retina de los ejemplares control hay pocas células positivas para TH (a) pero no se ve ninguna en los ejemplares ciclópeos (b). A los 5 dpf se ven células positivas para TH en la región vitreal de la CNI, tanto en los ejemplares control como en los ciclópeos (c, d). C: caudal; L: lateral. Barras de escala: 100  $\mu\text{m}$ .

### GS

La proteína GS se encuentra, entre otras, en las células de Müller, células de morfología alargada cuyo soma se localiza en la CNI y extienden sus proyecciones hacia la CPI y la CPE. Dichas células son fácilmente reconocibles a los 3 dpf en la retina de los ejemplares control (Fig. 51a), pero no en la de los ciclópeos (Fig. 51b). A los 5 dpf el marcaje para GS aumenta considerablemente en los ejemplares control (Fig. 51c), encontrándose células positivas para este marcador distribuidas por toda la CNI. También se observa gran cantidad de células positivas para GS en la retina de los animales ciclópeos (Fig. 51d). La distribución es similar, abundantes somas en la CNI con prolongaciones que se extienden hacia la CPE y la CPI, así como elementos positivos en la región más vitreal de la CCG. La diferencia más importante entre la retina de ambos grupos es que los elementos positivos que se observan en el margen escleral de la CNE son más evidentes en los ejemplares control que en los ciclópeos (Fig. 51c, d).

Al cuantificar la densidad de las células positivas para GS se encontró una célula por 1000 micras<sup>2</sup> en los ejemplares control, pero ninguna en los cíclopes a los 3 dpf (Fig. 56d). La densidad de estas células se mantiene constante entre los 3 y los 5 dpf en los ejemplares control pero aumenta mucho en los ejemplares ciclópeos, de manera que las densidades de las células positivas para este marcador se igualan en ambos casos.

## Resultados



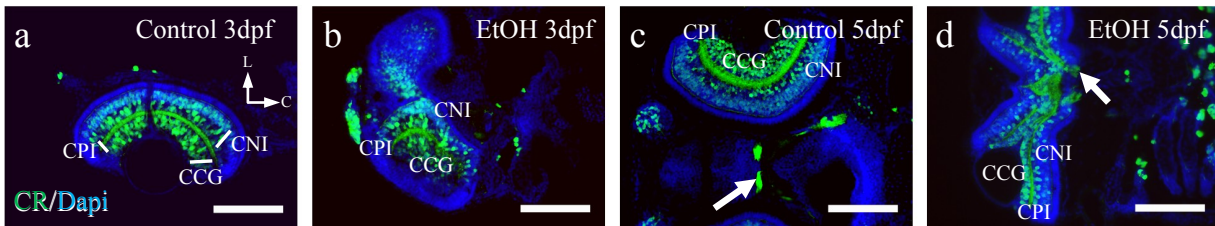
**Fig. 51: Distribución de GS.** Células positivas para GS en la región central de la retina control a los 3 dpf (a). No hay ninguna célula positiva en la retina de los animales ciclópeos (b). A los 5 dpf las células están distribuidas por toda la CNI (c) y una distribución similar se ve también en los ejemplares ciclópeos (d). C: caudal; L: lateral. Barras de escala: 100  $\mu$ m.

### CR

La CR es una de las proteínas ligantes de calcio más abundantes del sistema visual de teleósteos y se encuentra en varios tipos celulares a los 3 dpf (Fig. 52a). Las células positivas para CR se encuentran distribuidas en la CNI. Son células de pequeño tamaño y menos teñidas en la región escleral de dicha capa y células de mayor tamaño y más intensamente teñidas en la parte vitreal de la misma. También hay elementos positivos en toda la extensión de la CCG y proyecciones en la CPI. Todos estos elementos se encuentran también en las retinas de los ejemplares ciclópeos (Fig. 52b), aunque su distribución no es tan clara debido a la irregular laminación en las mismas.

En los ejemplares control a los 5 dpf (Fig. 52c) se ven los mismos elementos positivos que a los 3 dpf y, además, células positivas en la CPE. El nervio óptico también es positivo para este marcador. En este estadio, la distribución de elementos positivos a CR se ve perfectamente en los ejemplares ciclópeos (Fig. 52d), observándose también marcaje en la CPE y en el nervio óptico .

La densidad de somas positivos para CR (Fig. 56e) es elevada en ambos tipos de ejemplares a los 3 dpf y aumenta ligeramente a los 5 dpf. Aunque la densidad de células positivas a CR es superior en los ejemplares control en los estadios analizados, las diferencias no son significativas.



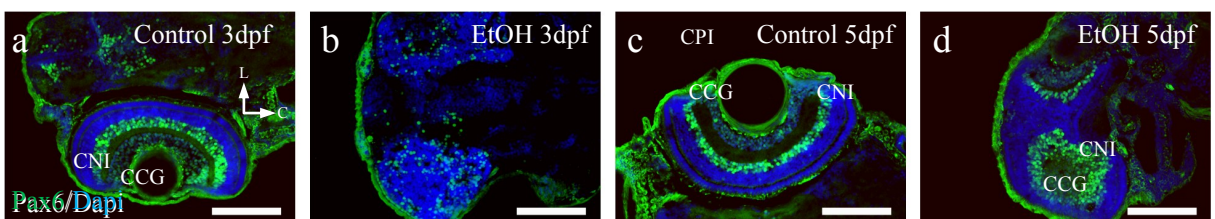
**Fig. 52: Distribución de CR.** Tanto en los animales control (a) como en los ciclópeos (b) hay somas positivos para CR en la CCG y la CNI, así como proyecciones en la CPI a los 3 dpf. A los 5 dpf el marcaje es similar en ambos tipos de larvas (c, d). En este estadio, el nervio óptico es positivo para CR (flechas en c, d). C: caudal; CCG: capa de las células ganglionares; CNI: capa nuclear interna; CPI: capa plexiforme interna; L: lateral. Barras de escala: 100  $\mu$ m.

### Pax6

Este factor de transcripción se encuentra a los 3 dpf tanto en los ejemplares control (Fig. 53a) como en los ciclópeos (Fig. 53b). Sin embargo, mientras que en los primeros se localiza en las células de la región vitreal de la CNI, de la CPI y de la CCG, en los ejemplares ciclópeos no se pueden localizar con exactitud debido a la ausencia de una correcta laminación.

A los 5 dpf (Fig. 53c, d) la distribución de Pax6 es similar al estadio anterior en los ejemplares control (Fig. 53c), aunque la región vitreal de la CNI en la que se expresa es algo más estrecha. El patrón de distribución de Pax6 se reconoce en los animales ciclópeos en este estadio (Fig. 53d).

Al analizar la densidad de células Pax6 positivas en ambos grupos se observa que a los 3 dpf es significativamente mayor en los ejemplares control (Fig. 56f). Mientras que en los ejemplares control hay unas 6 células\1000micras<sup>2</sup>, en los ciclópeos sólo hay 3 células\1000micras<sup>2</sup>. A los 5 dpf la densidad relativa de células positivas disminuye en los ejemplares control mientras que aumenta en los ciclópeos de manera que resulta mayor en estos últimos aunque de manera no significativa.



**Fig. 53: Distribución de Pax6.** Células positivas a Pax6 en la CNI, CPI y CCG en animales control a los 3 dpf (a). En los ejemplares ciclópeos (b) las células Pax6 positivas no presentan una distribución clara. A los 5 dpf la distribución de Pax6 es similar al estadio anterior en los animales control (c). La distribución es similar en los animales ciclópeos (d). C: caudal; CCG: capa de las células ganglionares; CNI: capa nuclear interna; CPI: capa plexiforme interna; L: lateral. Barras de escala: 100  $\mu$ m.

## *Resultados*

---

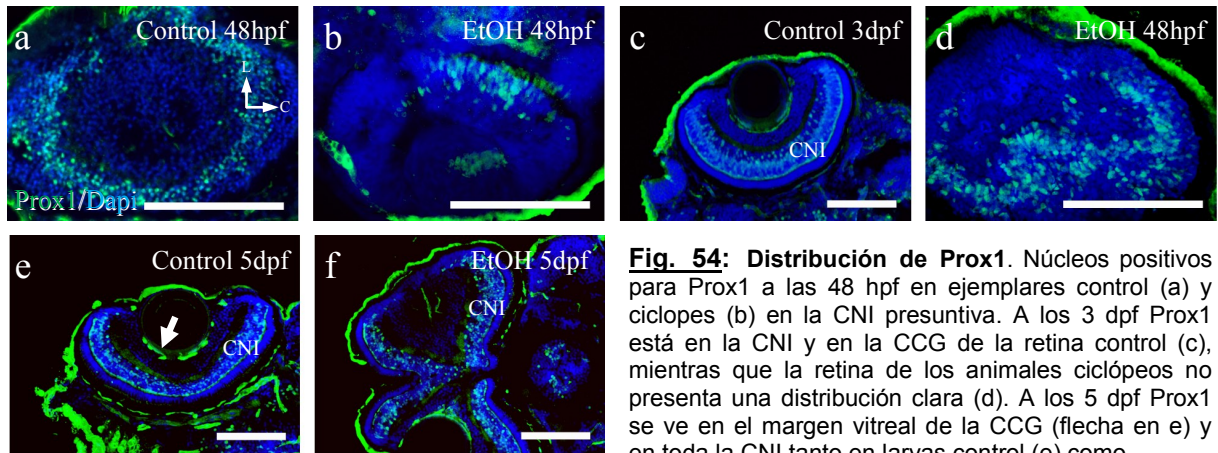
### Prox1

A las 48 hpf, el factor de transcripción Prox1 se encuentra en la CNI presuntiva en ambos grupos de animales. En los ejemplares control (Fig. 54a) está distribuido por toda la extensión de la capa, mientras que en los ciclópeos sólo se encuentra en la región central (Fig. 54b).

A los 3 dpf, en los animales control (Fig. 54c) Prox1 se encuentra en células de la CNI distribuidas en dos bandas: una más vitreal con núcleos más separados y otra más ancha y escleral, en la que los núcleos están más próximos. En la región vitreal de la CPE también encontramos células de morfología alargada que, por su morfología y localización, identificamos como células horizontales (Fig. 54c). Además, se ven núcleos positivos en la región más vitreal de la CCG. En los ejemplares ciclópeos no encontramos ni esta distribución ni tanta variabilidad de tipos celulares positivos, aunque en este estadio Prox1 está distribuido por toda la CNI presuntiva (Fig. 54d).

En el siguiente estadio analizado, 5 dpf, la distribución de Prox1 se mantiene constante en los ejemplares control (Fig. 54e) y los elementos localizados en la CCG son más evidentes. En los animales ciclópeos (Fig. 54f) se reconocen los mismos elementos que en los ejemplares control y la distribución de Prox1 es prácticamente idéntica a la observada en las larvas control, incluyendo las células horizontales y las células positivas en la CCG.

Al cuantificar la densidad de células positivas para Prox1, a las 48 hpf y 5 dpf, ésta es significativamente mayor en los ejemplares control, mientras que es prácticamente idéntica a los 3 dpf (Fig. 56g). En los ejemplares control la densidad se mantiene constante entre las 48 hpf y los 3 dpf, pero en los animales ciclópeos aumenta. Sin embargo, entre los 3 y 5 dpf sucede lo contrario: la densidad de células aumenta en las larvas control y se mantiene en las larvas ciclópeas, lo que resulta en una densidad significativamente mayor en los primeros.



**Fig. 54:** Distribución de Prox1. Núcleos positivos para Prox1 a las 48 hpf en ejemplares control (a) y ciclopes (b) en la CNI presuntiva. A los 3 dpf Prox1 está en la CNI y en la CCG de la retina control (c), mientras que la retina de los animales ciclópeos no presenta una distribución clara (d). A los 5 dpf Prox1 se ve en el margen vitreal de la CCG (flecha en e) y en toda la CNI tanto en larvas control (e) como

ciclópeos (f). C: caudal; CCG: capa de las células ganglionares; CNI: capa nuclear interna; L: lateral. Barras de escala: 100  $\mu$ m.

### BrdU

Para analizar la proliferación celular diseñamos experimentos de incorporación de BrdU, cuya localización determinamos posteriormente mediante una técnica inmunohistoquímica. A las 48 hpf, las células proliferativas de la retina de los ejemplares control están situadas en los márgenes laterales, aunque es frecuente ver células positivas en la región central (Fig. 55a). En los ejemplares ciclópeos las células BrdU positivas se distribuyen por toda la retina, principalmente en las regiones laterales (Fig. 55b).

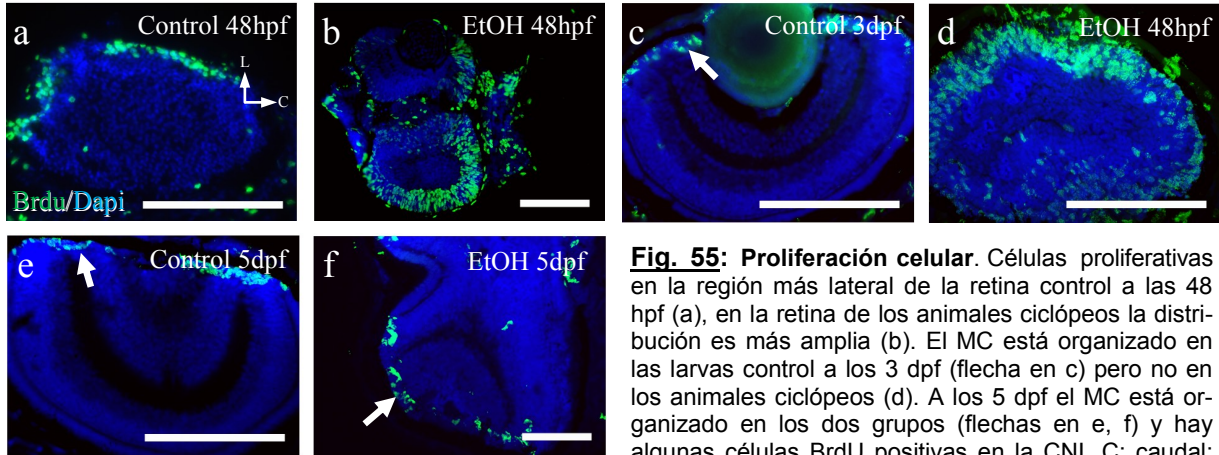
A los 3 dpf el MC de los ejemplares control está perfectamente organizado (Fig. 55c). Aunque la mayoría de las células proliferativas están situadas en esta región lateral, también se observan algunas en la retina central, sobre todo en la CNI. A los 3 dpf, el MC no está organizado en los animales ciclópeos (Fig. 55d), aunque sí observamos el inicio de su formación, se ven muchas células BrdU positivas en la retina central.

A los 5 dpf, el MC está totalmente constituido tanto en los ejemplares control (Fig. 55e) como en los ciclópeos (Fig. 55f). La distribución de células proliferativas es la misma que a los 3 dpf en los animales control y similar en las larvas ciclópeas. En estas últimas hay un MC organizado en cada hemirretina.

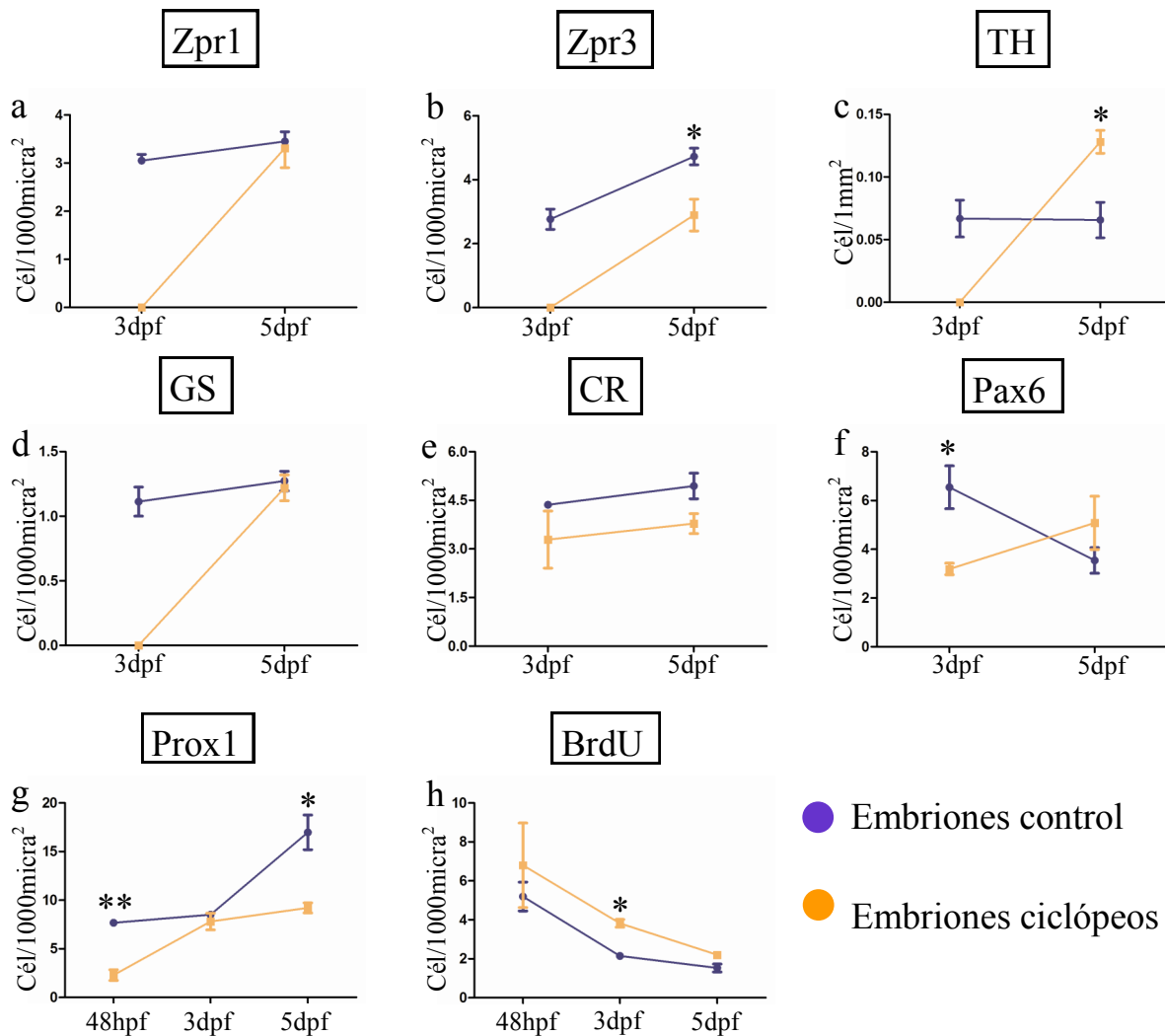
Al cuantificar la densidad de células proliferativas, hemos comprobado que siempre es mayor en las larvas ciclópeas (Fig. 56h), aunque con una variabilidad elevada. El único valor estadísticamente significativo se encuentra a los 3 dpf, cuando las células proliferativas son más abundantes en los animales ciclópeos que

## Resultados

en los controles. Sin embargo, a los 5 dpf los valores son prácticamente idénticos. Además, encontramos el mismo patrón de descenso de la actividad proliferativa en ambos grupos experimentales.



**Fig. 55: Proliferación celular.** Células proliferativas en la región más lateral de la retina control a las 48 hpf (a), en la retina de los animales ciclópeos la distribución es más amplia (b). El MC está organizado en las larvas control a los 3 dpf (flecha en c) pero no en los animales ciclópeos (d). A los 5 dpf el MC está organizado en los dos grupos (flechas en e, f) y hay algunas células BrdU positivas en la CNI. C: caudal; CNI: capa nuclear interna; L: lateral; MC: margen celular. Barras de escala: 100  $\mu$ m.



**Fig. 56: Cuantificación de la densidad de células positivas para los marcadores Zpr1 (a), Zpr3 (b), TH (c), GS (d), CR (e), Pax6 (f), Prox1 (g) y BrdU (h) en la retina.** \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $0,05 > p > 0,001$

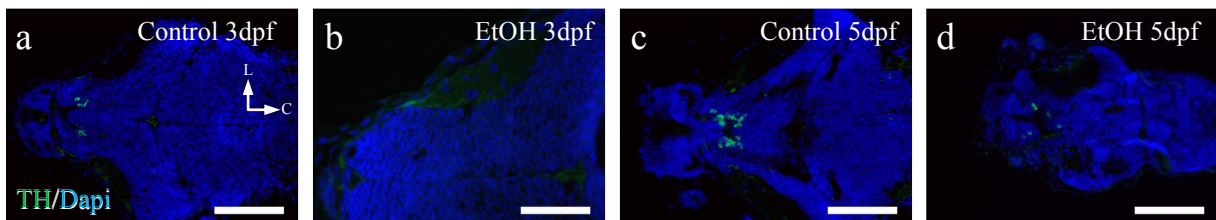
### 4.3.5 Diferenciación del techo óptico

#### TH

En el TO no detectamos células positivas a TH pero sí en el pretectum, otra región mesencefálica a la que llegan los axones del nervio óptico antes de alcanzar el TO.

A los 3 dpf se ven células positivas para TH en el pretectum de animales control y ciclópeos (Fig. 57a, b) y, al final de la organogénesis, 5 dpf, las células TH positivas se encuentran en la misma disposición (Fig. 57c, d).

En este caso, y debido a que sólo encontramos un número pequeño de células TH positivas en cada embrión, al menos en los estadios utilizados, cuantificamos el número total de células positivas en el pretectum (Fig. 63a). Así, encontramos el mismo número de células TH positivas a los 3 dpf en los dos grupos experimentales. En los ejemplares control aumenta el número hasta triplicarse a los 5 dpf, pero en los ciclópeos se mantiene constante. El número de células positivas a TH es significativamente mayor en los animales control.



**Fig. 57:** Distribución de TH. Células positivas a TH a los 3 dpf en el pretectum de ejemplares control (a) y ciclópeos (b) y a los 5 dpf (c, d). C: caudal; L: lateral. Barras de escala: 100  $\mu$ m.

#### GS

La GS se encuentra en somas celulares y en numerosas fibras en el TO, que provienen tanto del interior del mismo como de otras regiones del SNC.

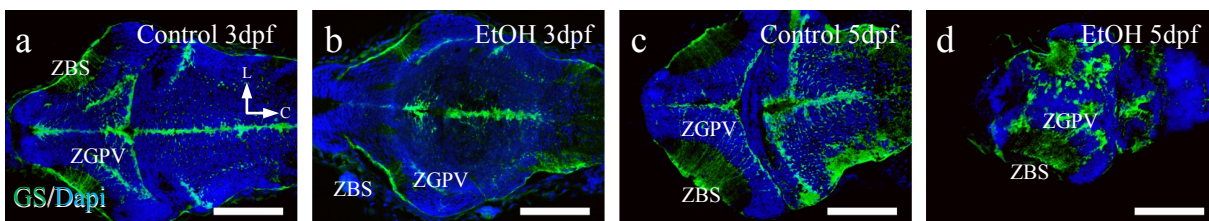
A los 3 dpf, en los ejemplares control (Fig. 58a) se ven somas positivos a GS en todo el rombencéfalo. En el TO los somas positivos se concentran en la ZGPV, pero mezclados con proyecciones positivas, lo que dificulta su conteo. La línea media, que recorre todo el embrión en el eje antero-posterior, así como la regiones central y posterior del TO presentan una alta expresión de GS. También es frecuente observar proyecciones que se dirigen a través de la ZBS hacia la región más externa del TO, el EM, donde hay una importante acumulación de fibras

## Resultados

positivas. En los ejemplares ciclópeos (Fig. 58b) destaca una reducción en el marcaje de la línea media, así como en la ZBS del TO.

En los ejemplares control no hay muchas variaciones en la distribución de GS en el TO a los 5 dpf (Fig. 58c). La línea media expresa GS aunque ahora se ve rota por la organización del cerebelo. En el TO la expresión de GS es más evidente en la región posterior y en el límite entre ambos hemisferios. Además, el número de fibras positivas en la ZBS parece que aumenta. Aunque a esta edad GS también se expresa en los ejemplares ciclópeos (Fig. 58d), no es posible distinguir la organización tan regular de las fibras positivas. Hay una clara desorganización de la distribución de GS que no se localiza en el margen posterior del TO ni en la separación de los hemisferios, y las fibras positivas de la ZBS están más desorganizadas.

Dado que los somas positivos están mezclados con proyecciones también positivas a GS, no es fácil distinguirlos y no hemos podido cuantificarlos.



**Fig. 58: Distribución de GS.** A los 3 dpf hay GS en fibras de la línea media y de la región posterior y medial del TO, tanto en ejemplares control (a) como ciclópeos (b). Fibras positivas cruzan también la ZBS hasta el EM (a, b) en mayor número en los animales control. A los 5 dpf, en las larvas control aumenta el número de fibras en la ZBS y en la región posterior del TO (c). En los animales ciclópeos las fibras positivas están desorganizadas (d). C: caudal; L: lateral; TO: techo óptico; ZGPV: zona gris periventricular; ZBS: zona blanca superficial. Barras de escala: 100  $\mu$ m.

## CR

En el TO hay somas celulares y proyecciones positivas a CR. Las proyecciones positivas pertenecen a células del mismo TO y también de otras regiones, como por ejemplo la retina, y otros centros de información sensorial.

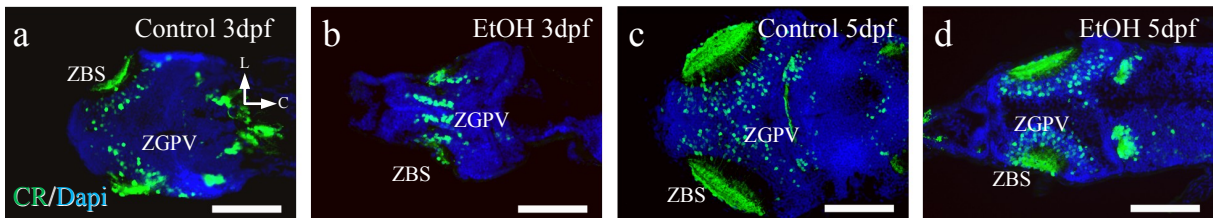
La distribución de los somas celulares positivos a CR en el TO es similar en ejemplares control y ciclópeos a los 3 dpf (Fig. 59a, b), encontrándose en la ZGPV y en la ZBS, aunque en menor número en esta última región. Sin embargo, sólo los ejemplares control muestran proyecciones marcadas en la ZBS.

A los 5 dpf el marcaje aumenta en el TO de los dos grupos experimentales



(Fig. 59c, d). Los somas se ven principalmente en la ZGPV y algunos en la ZBS y en el EM, aunque sólo en las larvas control. La mayor diferencia la encontramos en las proyecciones marcadas, en la ZBS de los animales control son abundantes y en los ejemplares ciclópeos ocupan menor extensión.

Cuando cuantificamos la densidad de células positivas a CR (Fig. 63b), vemos que, a los 3 dpf, los ejemplares control tienen mayor número de células positivas para CR aunque las diferencias no son significativas. La densidad aumenta entre los 3 y los 5 dpf, pero el aumento es especialmente importante en los ejemplares ciclópeos, de manera que en el estadio de 5 dpf el número de células es mayor en el TO de larvas ciclópeas. Sin embargo, las diferencias tampoco son significativas.



**Fig. 59: Distribución de CR.** Somas positivos a CR a los 3 dpf en animales control (a) y cíclopes (b) en la ZGPV y la ZBS del TO. Los ejemplares ciclópeos no presentan fibras en la ZBS. A los 5 dpf (c, d), la distribución de CR es similar en ambos tipos de ejemplares y hay fibras en la ZBS de animales ciclópeos aunque no son tan abundantes como en las larvas control. C: caudal; L: lateral; TO: techo óptico; ZBS: zona blanca superficial; ZGPV: zona gris periventricular. Barras de escala: 100  $\mu$ m.

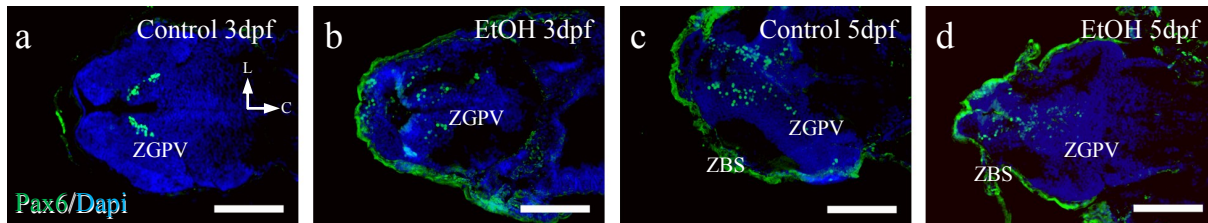
### Pax6

El factor de transcripción Pax6 se expresa en una pequeña población celular de la región ventro-medial de la ZGPV del TO en los ejemplares control de 3 dpf (Fig. 60a). Sin embargo, en los animales ciclópeos de la misma edad, la distribución no es tan homogénea y las células se encuentran más dispersas en el TO (Fig. 60b). A los 5 dpf, en las larvas control (Fig. 60c), Pax6 se ve en células con la misma localización y además en células de la región más anterior. La región de la ZGPV cercana a la ZBS no presenta células positivas a Pax6. En los ejemplares ciclópeos (Fig. 60d) las células positivas para este factor de transcripción ocupan una localización similar, pero están más dispersas e incluso se ven células positivas cercanas a la ZBS.

Al igual que en el caso de las células positivas para TH, hemos contado el número total de células ya que eran poco abundantes (Fig. 63c). A los 3 dpf, el

## Resultados

número total de células Pax6 positivas es igual en ambos grupos. A los 5 dpf, el número aumenta en los ejemplares control y disminuye en las larvas ciclópeas, lo que resulta en que el número de células Pax6 positivas es significativamente mayor en los animales control.

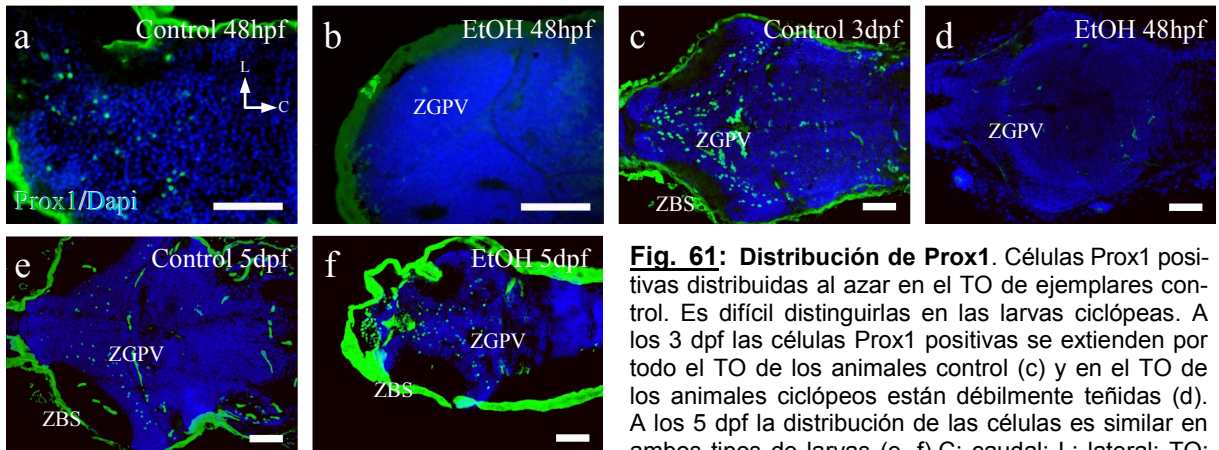


**Fig. 60:** Distribución de Pax6. Células positivas a Pax6 en el TO ventro-medial en los ejemplares control (a) y ciclópeos (b) a los 3 dpf. A los 5dpf el patrón de distribución de Pax6 es similar y hay células en la región anterior del TO. La distribución de células Pax6 positivas es más amplia en los ejemplares ciclópeos. C: caudal; L: lateral; TO: techo óptico; ZBS: zona blanca superficial; ZGPV: zona gris periventricular. Barras de escala: 100  $\mu$ m.

### Prox1

A las 48 hpf, las células Prox1 positivas están ampliamente distribuidas por todo el TO de los animales control (Fig. 61a); sin embargo, son prácticamente inexistentes en los animales ciclópeos (Fig. 61b). A los 3 dpf, hay células Prox1 positivas por toda la ZGPV del TO de los ejemplares control (Fig. 61c). También se observan estas células en los ejemplares ciclópeos, aunque débilmente teñidas (Fig. 61d). A los 5 dpf, la distribución de Prox1 no experimenta variaciones en los ejemplares control (Fig. 61e) y es muy similar en las larvas ciclópeas (Fig. 61f).

Al cuantificar las células Prox1 positivas (Fig. 63d), observamos que hay un número significativamente mayor en los ejemplares control a las 48 hpf (casi no encontramos células positivas en los ejemplares ciclópeos) y también a los 3 dpf. Sin embargo, entre los 3 y 5 dpf, en las larvas control el número de células positivas disminuye mientras que en los ejemplares ciclópeos aumenta, lo que resulta en un número similar de células positivas a Prox1 en el TO de ambos grupos.



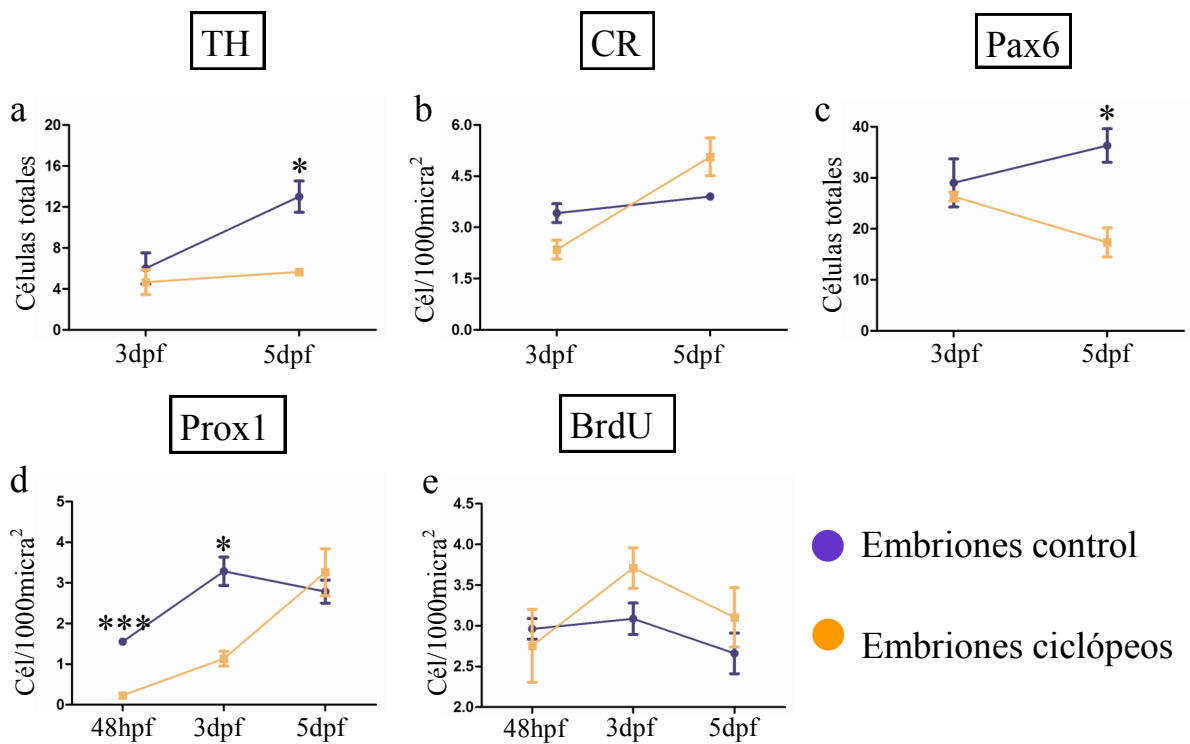
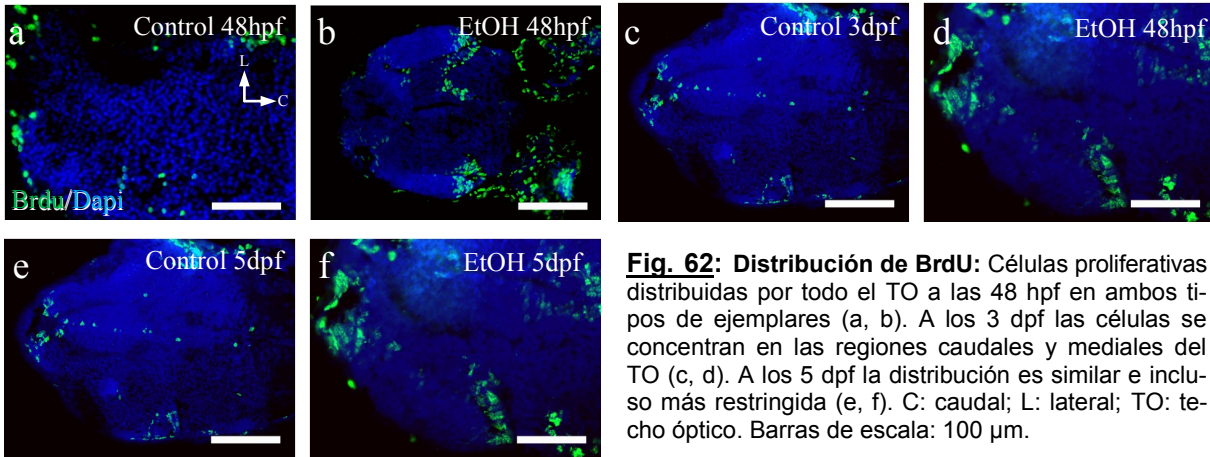
**Fig. 61: Distribución de Prox1.** Células Prox1 positivas distribuidas al azar en el TO de ejemplares control. Es difícil distinguirlos en las larvas ciclopeas. A los 3 dpf las células Prox1 positivas se extienden por todo el TO de los animales control (c) y en el TO de los animales ciclopeos están débilmente teñidas (d). A los 5 dpf la distribución de las células es similar en ambos tipos de larvas (e, f). C: caudal; L: lateral; TO: techo óptico; ZBS: zona blanca superficial; ZGPV: zona gris periventricular. Barras de escala: 100  $\mu$ m.

### BrdU

Las regiones proliferativas del TO coinciden en ambos grupos en todos los estadios analizados. A las 48 hpf (Fig. 62a, b) vemos células proliferativas distribuidas por todo el TO, pero con una mayor concentración en la región caudal. A los 3 dpf la distribución de células BrdU positivas en los ejemplares control (Fig. 62c) y ciclopeos (Fig. 62d) alcanza su configuración final. Aunque hay células positivas en toda la extensión del TO, la mayoría se encuentran en la región caudal y en la región medial, cerca del ventrículo. La distribución de las células proliferativas es similar a los 5 dpf en ambos tipos de larvas (Fig. 62e, f).

El número de células que incorporan BrdU en los dos grupos experimentales es similar a las 48 hpf y sigue el mismo patrón en los siguientes estadios (Fig. 63e). En ambos grupos hay un aumento de la proliferación entre las 48 hpf y los 3 dpf pero principalmente en los ejemplares ciclopeos, resultando en una densidad de células BrdU positivas mayor en este grupo. Entre los 3 y 5 dpf hay un descenso de la proliferación celular en ambos grupos, por lo que se mantienen las diferencias en densidad que nunca llegan a ser significativas.

## Resultados



**Fig. 63:** Cuantificación de la densidad de células positivas para los marcadores TH (a), CR (b), Pax6 (c), Prox1 (d) y BrdU (e) en el techo óptico. \* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$

### 4.3.6 Resumen

La organización y diferenciación de la retina y el TO de los ejemplares ciclópeos no parece muy alterada, aunque sí algo retrasada. Varios de los marcadores utilizados muestran patrones de distribución y valores similares a los animales control. Sin embargo, otros marcadores siguen mostrando densidades distintas a los 5 dpf. Estos datos parecen sugerir que el efecto del etanol es

específico de cada tipo celular. Por otro lado, el efecto del etanol sobre el TO es distinto que sobre la retina. El TO podría presentar modificaciones en su diferenciación no sólo debido al retraso en el desarrollo general sino también a la falta de conexiones procedentes, al menos, de la retina.

# Discusión

---

El pez cebra constituye un buen modelo para describir el desarrollo del sistema visual (Arenzana *et al.*, 2011) y cómo se ve éste afectado por la exposición a distintas sustancias (revisado en Parng, 2005 y en Tierney, 2011). Los primeros estudios que utilizaban el pez cebra como modelo para el estudio de los efectos del etanol datan de principios del siglo XX (Stockard, 1910) y desde los años 70 es un modelo sólido que abarca desde estudios de comportamiento hasta estudios genéticos (Laale, 1971; Bilotta *et al.*, 2002; Arenzana *et al.*, 2006b; Kashyap *et al.*, 2007; Loucks *et al.*, 2007). El etanol afecta a diversos procesos durante el desarrollo del embrión, incluyendo la expresión génica, la distribución de proteínas, la apoptosis, la proliferación y la migración celular (Blader y Strähle, 1998; Polifka y Friedman, 2002; Kumada *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010). Sin embargo, las distintas poblaciones celulares parecen mostrar una sensibilidad diferencial al etanol (Matsui *et al.*, 2006; Kashyap *et al.*, 2007) y, por tanto, los procesos del desarrollo están afectados de manera desigual. Por otra parte, algunos de los resultados más relevantes sobre la teratogenia ética se han obtenido a partir de ejemplares de pez cebra ciclópeos (Blader y Strähle, 1998; Loucks *et al.*, 2007).

### 5.1 EFECTOS DEL ETANOL DURANTE LA GASTRULACIÓN

Los primeros momentos del desarrollo son, quizás, los más importantes. La gastrulación es un proceso bastante complicado durante el cual las células se mueven grandes distancias, cambian su morfología y organizan estructuras complejas como las tres hojas embrionarias. Casi todos los mutantes de pez cebra (y de otras especies) con fenotipos ciclópeos presentan deficiencias en su gastrulación, lo que revela una cierta relación entre dicho proceso y la morfogénesis de las vesículas ópticas. Sin embargo, se desconoce cuál es dicha relación. Nosotros hemos estudiado las alteraciones que induce el etanol durante la gastrulación y para ello hemos utilizado un protocolo en el cual los ejemplares sólo eran tratados con etanol al comienzo de la formación del escudo embrionario, en el inicio de la organización de las tres hojas embrionarias.

## Discusión

---

Se ha descrito que la exposición de embriones de pez cebra a concentraciones elevadas de etanol al inicio de la gastrulación, induce fallos en la migración de la placa precordial, quedando ésta situada en una posición más posterior de lo que debería (Blader y Strähle, 1998). Este defecto se ve acompañado por modificaciones en la expresión de determinados genes implicados en el establecimiento del eje del organismo. Así, se ha observado una expresión ectópica y deslocalizada del gen *gsc*, marcador específico de la placa precordial, y una reducción en la expresión de *pax2*, tanto en pez cebra (Blader y Strähle, 1998) como en *Xenopus* (Yelin *et al.*, 2005), y de *pax6* también en *Xenopus* (Peng *et al.*, 2004). Estos cambios son similares a los que ocurren en modelos genéticos de alteración de la placa precordial que, al igual que los embriones tratados con etanol, también presentan fenotipos ciclópeos, como los mutantes *cyc* (Hatta *et al.*, 1994), *sbl* (Heisenberg y Nüsslein-Volhard, 1997) y *tri* (Marlow *et al.*, 1998).

Las diferentes estirpes de pez cebra presentan distintas sensibilidades al etanol (Arenzana *et al.*, 2006b). Los primeros experimentos realizados referentes a la influencia del etanol sobre la gastrulación fueron llevados a cabo en estirpes de pez cebra distintas a la utilizada por nosotros, por ello hemos comprobado si los efectos son reproducibles. Para ello realizamos una doble HIS contra *hgg1*, que marca exclusivamente la región anterior de la placa precordial, y contra *ntl* que marca la notocorda. Hemos observado una dispersión del marcaje de *hgg1* y la presencia de grupos ectópicos de células, todo ello acompañado de fallos en la migración de la placa precordial. Sin embargo no hemos detectado una alteración del patrón de expresión de *ntl*. Por tanto, el tratamiento y la estirpe utilizados por nosotros son comparables con los modelos previamente utilizados (Blader y Strähle, 1998). Además, el efecto del etanol no es general sobre todo el embrión sino que parece más específico de la placa precordial.

La teratogenia ética tiene relación con las alteraciones de la placa precordial. Algunos autores postulan que los defectos observados en el tubo neural son consecuencia de ellas y no un efecto directo del etanol (Blader y Strähle, 1998). Sin embargo, este hecho no es tan claro, tal y como veremos en el apartado que hace referencia a la evaginación del campo visual (Loucks *et al.*, 2007). Aunque no se conoce exactamente cómo se altera la migración de la placa precordial, los



progenitores que la forman migran hacia el polo animal en grupo e individualmente (revisado en Tada y Kai, 2009), para lo cual es necesaria la correcta interacción de las células entre sí (Kai *et al.*, 2008). Se ha descrito que el etanol es capaz de alterar la migración celular durante la gastrulación (Zhang *et al.*, 2010), impidiendo de manera específica los movimientos de convergencia y extensión y la migración de la placa precordial (Blader y Strähle, 1998; Yelin *et al.*, 2005). En consecuencia, no sólo se altera la morfogénesis del sistema visual sino que surgen otros fenotipos, como por ejemplo un acortamiento del eje antero-posterior del organismo (Loucks *et al.*, 2007) o la división de este eje en las regiones más caudales (Zhang *et al.*, 2010).

Las rutas de transducción de señales que regulan la gastrulación del pez cebra han sido ampliamente estudiadas, aunque no se conocen en totalidad. Se ha descrito que el etanol es capaz de alterar la señalización de algunas de las rutas más importantes, como por ejemplo la señalización de *wnt11* (Zhang *et al.*, 2010), *shh* (Li *et al.*, 2007; Loucks *et al.*, 2009) o ácido retinoico (Marrs *et al.*, 2010), y que la inyección del RNAm de *shh* (Loucks *et al.*, 2009) o el tratamiento con ácido retinoico (Marrs *et al.*, 2010) pueden recuperar, al menos parcialmente, los fenotipos inducidos por el etanol, incluyendo la ciclopia. No hay consenso sobre si la alteración de dichas rutas es un efecto directo del etanol o es una consecuencia de la verdadera causa (Blader y Strähle, 1998). Por otro lado, estudios realizados en cultivos celulares indican que las moléculas que regulan la adhesión celular como por ejemplo RhoA y RhoE (Guasch *et al.*, 2003; Joshi *et al.*, 2003) sí son dianas directas del etanol.

Mediante HIS hemos analizado el patrón de expresión de *snail1a*, factor de transcripción muy importante en la regulación de los movimientos de la placa precordial (Liu *et al.*, 2009). Este gen y su duplicado, *snail1b*, se expresan en el mesodermo paraxial adyacente a la notocorda y subyacente a la placa precordial (Blanco *et al.*, 2007), y actúan sobre las células de la placa precordial de una manera que no se conoce con exactitud. Nosotros hemos observado que la expresión de *snail1a* disminuye progresivamente al incrementar la concentración de etanol, hasta prácticamente desaparecer cuando los embriones se exponen a 2,4% de etanol. Nuestros resultados tras el tratamiento con etanol coinciden con lo

## Discusión

---

mostrado previamente al realizar el *knockdown* de *snail1a* y *snail1b* (Blanco *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009), en los que se produce una clara expansión de las células de la placa precordal y no llegan a alcanzar el polo animal del embrión. Se ha propuesto que las células que expresan *snail1a*, que avanzan por delante de la placa precordal, regulan la migración de ésta (Blanco *et al.*, 2007; Yamashita *et al.*, 2004). Por tanto, el etanol afectaría a la expresión de *snail1a*, lo que llevaría a un fallo en la migración de la placa precordal.

Tras el tratamiento con etanol hemos comprobado la alteración de los niveles de expresión de las GTPasas *rhoAa* y *rnd1like* en el estadio de 75% epibolia, momento en el cual la placa precordal alcanza el polo animal. No hay muchos trabajos sobre el papel de estas GTPasas *in vivo*; sin embargo, la bibliografía en cultivos celulares es abundante. Así, por ejemplo, en cultivos celulares se ha descrito que el etanol disminuye la expresión de *rhoA* (Guasch *et al.*, 2003) y aumenta la expresión de antagonistas como *rhoE* (Guasch *et al.*, 2007). En nuestro modelo experimental hemos observado un aumento en la expresión de todas las GTPasas tras la exposición a etanol. *rhoA* aumenta más al utilizar concentraciones bajas de etanol, concentraciones que no inducen fenotipos ciclópeos ni graves alteraciones de la migración de la placa precordal. Nuestros resultados coinciden con lo descrito previamente en cultivos de células de cerebelo donde el etanol activa la función de RhoA, lo que inhibe la formación de nuevas neuritas (Joshi *et al.*, 2006) e induce la muerte celular por apoptosis (Miñambres *et al.*, 2006). Sin embargo, en astrocitos el etanol produce el efecto contrario (Guasch *et al.*, 2003). El aumento de la expresión de *rhoA* descrito por nosotros, aunque significativo, no es tan importante como el descrito para *rnd1* y *rnd1like* y no parece guardar relación con la concentración de etanol utilizada. El aumento en la expresión de *rhoA* puede que no tenga efecto sobre el desarrollo del embrión, ya que los mecanismos de regulación más importantes de la actividad de RhoA son postraduccionales por medio de la unión de distintas moléculas (revisado en Wennerberg y Der, 2004).

Hemos descrito un aumento de la expresión de *rnd1* y *rnd1like* que, hasta la concentración de 1,5% de etanol, es dosis dependiente. En las concentraciones de etanol más altas (2% y 2,4%) el aumento de la expresión es algo menor, pero

todavía altamente significativo. Este descenso puede deberse a la toxicidad del etanol a dichas concentraciones y a la elevada muerte celular inducida (Carvan *et al.*, 2004). Es la primera vez que se describe una relación entre *rnd1* y *rnd1like* y el etanol, aunque se ha descrito que, en cultivos de astrocitos, éste es capaz de aumentar la expresión de *rhoE*, una molécula perteneciente a la misma subfamilia y que también antagoniza a RhoA (Guasch *et al.*, 2007). Los cambios en la expresión de *rnd1* y *rnd1like* son muy importantes ya que carecen de mecanismos postraduccionales de regulación y las proteínas están constitutivamente activas. De hecho su regulación más importante es la modulación de su transcripción (Nobes *et al.*, 1998; Wünnenberg-Stapleton *et al.*, 1999).

El aumento de la expresión de *rhoAa*, *rnd1* y *rnd1like* podría parecer contradictorio, pero ambos efectos conducen a alteraciones en el citoesqueleto que impiden la formación y destrucción rápida de contactos celulares, en definitiva al paso de célula ameboide a mesenquimal, proceso fundamental durante la migración de las células de la placa precordial (revisado en Heisenberg y Tada, 2002; Weiser *et al.*, 2009). De hecho, en pez cebra, se ha demostrado que el aumento de la expresión de *rhoA* produce una inhibición excesiva de la miosina fosfatasa 1 (*mypt1*) lo que, durante la gastrulación, induce que las células tengan una actividad protrusiva mayor y un menor movimiento. Como resultado de esta inhibición se producen alteraciones en la migración de la placa precordial similares a los mostrados por nosotros, e incluso embriones con fenotipos ciclópeos (Weiser *et al.*, 2009)

Nuestros resultados indican que el aumento de la expresión de *rnd1* y *rnd1like* o la disminución de *snail1a*, o el conjunto de ambas, podrían inducir los fallos en la migración de la placa precordial. Por ello nos propusimos comprobar si la inhibición de la traducción del RNAm de *rnd1* y de *rnd1like* podrían proteger, en cierta medida, del efecto del etanol. La inyección de cualquiera de los dos morfolinós por separado induce una menor migración de las células de la placa precordial. La exposición a etanol de los embriones inyectados agrava todavía más el problema. La inyección de ambos morfolinós a la vez conduce al cese de la epibolia y a la muerte del embrión al inicio de la gastrulación. Por tanto, no observamos ningún efecto protector del *knockdown* de estos genes, aunque

## *Discusión*

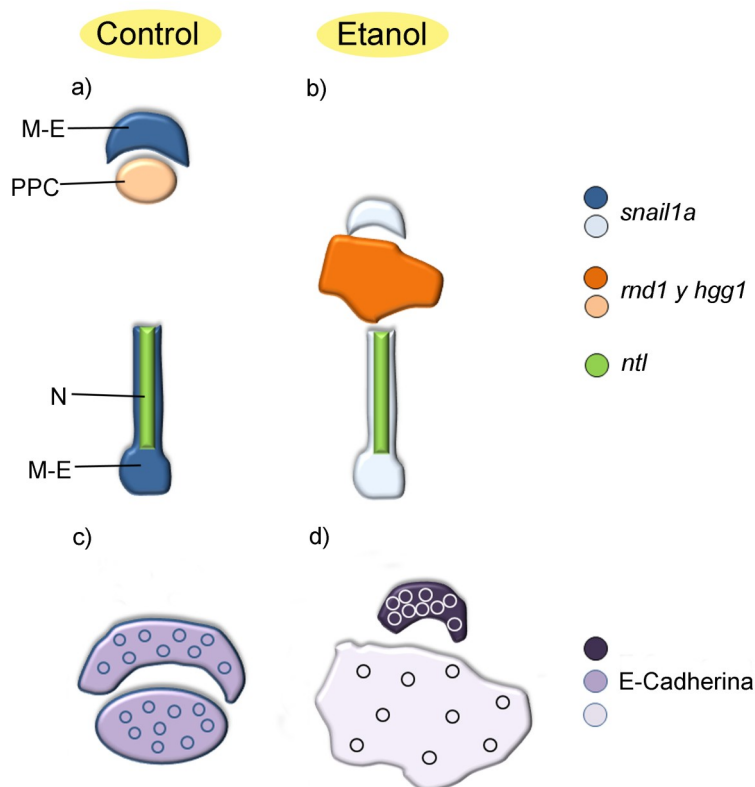
---

nuestros resultados demuestran que *rnd1* y *rnd1like* juegan un papel importante durante la migración de la placa precordial.

Hay que tener en cuenta que durante el proceso de migración de la placa precordial en el pez cebra, hay distintos procesos que son más o menos independientes entre si: la convergencia celular, la extensión celular, la adhesión celular dentro de la placa precordial, la unión de las células de la placa precordial con el epiblasto suprayacente, la transición entre célula epitelial y mesenquimal, etc... (Babb y Marrs, 2004; Montero et al., 2005; revisado en Tada y Kai, 2009). De esta manera, puede ser que la inyección de un morfolino no recupere todo el fenotipo inducido por el etanol pero sí alguno de sus efectos. De todos los procesos que intervienen durante la gastrulación, el que está más regulado por las GTPasas es la cohesión celular. La inyección del morfolino de *rnd1*, por si sola, no induce ningún efecto sobre la separación entre las células Gsc:GFP de la placa precordial. Sin embargo, el hecho de que su duplicado, *rnd1like*, presente un patrón de expresión similar hace plausible que, en ausencia de *rnd1*, *rnd1like* sea suficiente para una correcta migración. Por otro lado, *rnd1* no es el único responsable de la migración de las células de la placa precordial, sino que también intervienen otras moléculas como *rhoA* (Zhu et al., 2006), cadherina-E (Montero et al., 2005) y *snail1* (Blanco et al., 2007). El conjunto de estas moléculas podría actuar de mecanismo de seguridad y ser suficiente para una migración correcta de la placa precordial. La inyección del morfolino de *rnd1* en los embriones que posteriormente son tratados con etanol suprime parcialmente el efecto de este teragógeno. De hecho, la distancia entre las células de la placa precordial es significativamente menor que en los ejemplares control. Aunque estos resultados son preliminares, parecen sugerir que el etanol altera la cohesión celular mediante la regulación de la expresión de *rnd1*.

Los resultados obtenidos para *rnd1*, *rnd1like* y *snail1a* sugieren que el etanol afectaría de distinta manera a cada tipo celular, tal y como ocurre en etapas posteriores del desarrollo (Kashyap et al., 2007). En un proceso tan complejo como es la migración de la placa precordial, que requiere muchos factores simultáneamente, este hecho cobra vital importancia, ya que el etanol podría inducir efectos totalmente distintos en poblaciones celulares vecinas.

Teniendo en cuenta nuestros resultados, proponemos que el aumento de la expresión de *rnd1* y *rnd1like* induciría, tras la exposición de los embriones a etanol, una disminución de la adhesión de las células de la placa precordial, igual que sucede en *Xenopus* (Wünnenber-Stapleton *et al.*, 1999). Por otro lado, en las células situadas anteriormente y subyacentes a la placa precordial el etanol reduciría la expresión de *snail1a*, fenómeno que se ha relacionado con el aumento de la adhesión celular de esta población (Blanco *et al.*, 2007) que, en consecuencia, no puede guiar correctamente a las células de la placa precordial. Ambos efectos se sumarían, resultando en una migración defectuosa de la placa precordial que expandiría su dominio (Fig. 64).



**Fig. 64:** Esquema de la posible alteración de la expresión de *snail1a* y *rnd1* sobre la placa precordial. a y c son esquemas de la situación en condiciones normales y b y d en condiciones inducidas por el etanol. En los dibujos c y d sólo aparecen representados la PPC y el M-E anterior. La expresión relativa de *snail1a*, *rnd1* y *E-Cadherina* se muestra en una gradación de colores azul, naranja y morado respectivamente y la de *ntl*, que no varía, se muestra en verde. M-E: mesodermo-endodermo; N: notocorda; PPC: placa precordial. (Modificado de Blanco *et al.*, 2004).

Los efectos de *snail1a* y *rnd1* podrían estar mediados por la *cadherina-E*, ya que ambos son reguladores negativos de su expresión (Blanco *et al.*, 2007; Ogata *et al.*, 2007), aunque en regiones distintas. La Cadherina-E interviene en la formación de las uniones celulares (uniones estrechas y adherentes) que mantienen cohesionadas las células de la placa precordial. De hecho, durante la migración de las células de la placa precordial se produce un aumento de la expresión de *cadherina-E* en ellas, lo que facilita el cambio a una morfología fusiforme y

a la formación de extensiones celulares (Ulrich *et al.*, 2003). Si no se produce un aumento de la expresión de *cadherina-E*, las células no son capaces de modificar su morfología, quedando la gastrulación detenida (Montero *et al.*, 2005) en un

## *Discusión*

---

fenotipo muy similar al ocasionado por la exposición a etanol. Además, en los embriones inyectados con el morfolino de *cadherina-E* se inducen fenotipos similares a los mostrados por nosotros tras el tratamiento con etanol (Babb y Marrs, 2004).

Una hipótesis similar a la propuesta por nosotros, en parte ha sido demostrada en *Xenopus*, donde el aumento en la expresión de *rnd1* reduce la adhesión celular mediada por Cadherinas (en ese caso Cadherina-C, otra Cadherina del mismo tipo), induciendo fallos en la gastrulación (Ogata *et al.*, 2007). Los mismos autores describen que *rnd1* aumenta su expresión en respuesta a moléculas pertenecientes a la superfamilia TGF- $\beta$  y, en cultivos celulares se ha demostrado que el tratamiento de células con TGF- $\beta$ 1 o etanol tiene un efecto similar sobre las proteínas de unión celular (Miller *et al.*, 2006). Además, fallos en la señalización de TGF- $\beta$  conducen a casos de holoprosencefalia en humanos (revisado en Bertrand y Dahmane, 2006) o de ciclopia en pez cebra (Hatta *et al.*, 1994; Heisenberg y Nüsslein-Volhard, 1997).

No podemos descartar que la propia Cadherina-E sea una diana directa del etanol. En cultivos celulares se ha demostrado que este teratógeno es capaz de inhibir la adhesión celular mediada por otras proteínas de adhesión, como por ejemplo la proteína L1 (Ramanathan *et al.*, 1996; Wilkemeyer *et al.*, 2000; revisado en Greenberg, 2003), proteína relacionada con la aparición de fenotipos similares al SAF en humanos (Wong *et al.*, 1995). Además, el etanol puede unirse a sitios específicos en algunas proteínas reguladoras de adhesión celular, modificando su actividad o incluso su plegamiento (revisado en Dwyer y Bradley, 2000; revisado en Harris *et al.*, 2008). Son necesarios más estudios para determinar cuál o cuáles son las dianas específicas del etanol, como por ejemplo analizar qué ocurre con la expresión de *cadherina-E* en la placa precordial y en las células del mesodermo adaxial.

## 5.2 ALTERACIÓN DE LA SEPARACIÓN DE LAS VESÍCULAS ÓPTICAS

Una vez terminada la gastrulación y formado el tubo neural da comienzo la división del mismo en distintos compartimentos. La división del campo visual en dos vesículas ópticas se produce al principio de este periodo, aunque es necesaria la exposición a etanol durante los estadios de blástula tardía y gástrula temprana para inducir fenotipos ciclópeos (vesículas ópticas fusionadas) (Blader y Strähle, 1998). Varios autores han propuesto que la fusión de las dos vesículas ópticas es sólo una consecuencia de fallos en la gastrulación (Blader y Strähle, 1998). Sin embargo, estos estudios obvian el hecho de que un embrión tarda, al menos, 180 minutos en eliminar el etanol de su organismo, aunque posiblemente se necesite más tiempo (Bradfield *et al.*, 2006). Por tanto, si mantenemos los embriones en una solución alcohólica hasta las 8 o 9 hpf, seguirá habiendo etanol en ellos por lo menos hasta las 11 o 12 hpf, cuando la evaginación ya se encuentra iniciada.

Hay que tener en cuenta que los procesos que subyacen a la ausencia de separación de las vesículas ópticas pueden ser muy complejos. No se puede descartar que incluso los mutantes de pez cebra que más se parecen a nuestro modelo, mutantes *cyc* y *oep*, ambos ocasionados por la alteración en la señalización TGF $\beta$ /Nodal y ambos con problemas similares durante la gastrulación (Carmany-Rampey y Schier, 2001), desarrollen fenotipos ciclópeos por mecanismos distintos.

Para estudiar el proceso de la división del campo visual y la evaginación de las vesículas ópticas, observamos el comportamiento de las membranas celulares mediante *time-lapse*. Para ello inyectamos una construcción llamada membrana-GFP, por la cual la proteína GFP se traduce junto con una secuencia de miristoilación que hace que la maquinaria celular la coloque en la membrana. Esta construcción nos permitió observar el proceso de división del campo visual *in vivo*, aunque no pudimos conseguir los mismos resultados en los animales expuestos a etanol. Ello pudo deberse a varias causas:

1. El etanol altera la integridad de la membrana lipídica (Goldstein y Chins, 1981) y, por tanto, es difícil distinguir el contorno celular.

2. El etanol disminuye la fluorescencia de los tejidos. De hecho el nivel de fluorescencia de los embriones al día siguiente es mayor que en el momento de retirar el etanol.
3. El etanol modifica el citoesqueleto celular (Chmielewski *et al.*, 1997) y, por tanto, puede ser que el transporte de la proteína GFP a la membrana se vea dificultado.

### 5.2.1 El etanol altera el patrón de expresión de algunos genes

Cuando analizamos el patrón de expresión de algunos genes implicados en la morfogénesis de las vesículas ópticas, dos de ellos (*otx2*, *zic2*) no muestran una alteración importante tras el tratamiento con etanol. Otro (*pax6*) está alterado, pero no en el campo visual; y otros tres (*six3*, *rx3* y *rx1*) muestran una clara disminución de su expresión, así como un patrón de expresión aberrante.

*otx2* es uno de los genes responsables de iniciar la especificación del campo morfogénico visual (Kenyon *et al.*, 2001; Zuber *et al.*, 2003), aunque en estadios posteriores el aumento en la expresión de *rx3* induce la reducción de su expresión en el campo visual, quedando limitado al cerebro medio (Andreazzoli *et al.*, 1999). Aunque parece que juega un papel en la migración de las células que deben conformar el campo visual antes del inicio de la evaginación (Kenyon *et al.*, 2001), no se ha demostrado que tenga alguna función durante la misma. La única alteración de *otx2* que muestran los ejemplares expuestos a etanol es un retraso en su expresión, que también ha sido descrito por otros autores (Loucks *et al.*, 2007).

El hecho de que sólo haya un retraso en la expresión de *zic2a* es más llamativo. En principio, este gen es un candidato ideal a ser diana del etanol ya que no sólo regula positivamente la proliferación (Dodou *et al.*, 2004), sino también la formación del patrón antero-posterior del cerebro anterior mediante la modulación de la expresión de *shh* (Sanek *et al.*, 2009). Tanto la proliferación como la señalización por *shh* están alteradas por la exposición embrionaria a etanol (Kashap *et al.*, 2007; Loucks *et al.*, 2009). Además, mutaciones en *zic2* han sido directamente relacionadas con casos de holoprosencefalia en humanos (Brown *et al.*, 1998), y los mutantes de ratón para este gen presentan fallos en la migración de la placa precordial y cese del desarrollo durante la gastrulación similares a los



ocasionados por el etanol (Warr *et al.*, 2008). Las diferencias entre lo observado por nosotros en el pez cebra y los casos descritos en humanos y ratones pueden deberse a varias razones: que la función de *zic2a* no esté conservada durante la filogenia (Sanek *et al.*, 2009); que el mecanismo por el cual el etanol induce ciclopia sea distinto, o que las duplicaciones en el genoma del pez cebra hagan que varios genes *zic* actúen redundantemente (Sanek y Grinblat, 2008). De hecho, en pez cebra, *zic2a* parece tener un papel más importante en el establecimiento del patrón dorso-ventral de la retina que en la evaginación del campo visual (Sanek *et al.*, 2009). Sería necesario analizar la expresión de *zic1*, que regula positivamente la señalización de *nodal* y *hedgehog* y negativamente la señalización del ácido retinoico, ya que la inyección del morfolino contra este gen conduce a fenotipos ciclópeos (Maurus y Harris, 2009).

El desarrollo del sistema visual está estrechamente ligado a las proteínas Pax. En concreto, Pax6 es una de los responsables del mantenimiento del campo visual y de la diferenciación de los distintos tipos retinianos (Zaghloul y Moody, 2007). No se ha descrito ningún papel concreto para *pax6* en la evaginación de las vesículas ópticas, pero durante este proceso su expresión disminuye, a la vez que aumenta la de *pax2* en el pedúnculo óptico. La ausencia de modificaciones en el patrón de expresión de los genes *pax* durante dicho proceso conduce a que el tejido que debiera convertirse en pedúnculo óptico permanezca como retina y las vesículas permanecen fusionadas, tal y como ocurre en los mutantes *cyc* (Macdonald *et al.*, 1995). Tras la exposición a etanol se produce el descenso de la expresión de *pax6a* en el campo visual, quedando limitada al diencéfalo y a las regiones posteriores del SNC. Además, en etapas posteriores apreciamos evidencias del pedúnculo óptico y de la expresión de Pax2 en esta región.

En etapas más tardías (10 somitos), la extensión de la expresión de *pax6a* por la región ventral del tubo neural es un reflejo de la migración anterior del hipotálamo presuntivo, que subyace al campo visual y acaba emergiendo por delante de éste (England *et al.*, 2006). En los embriones expuestos a etanol no hemos visto la extensión del marcaje de *pax6a*, aunque el hipotálamo sí está especificado. Por tanto, el hipotálamo presuntivo no se desplaza anteriormente, bien porque sus mecanismos de migración son defectuosos o bien porque las

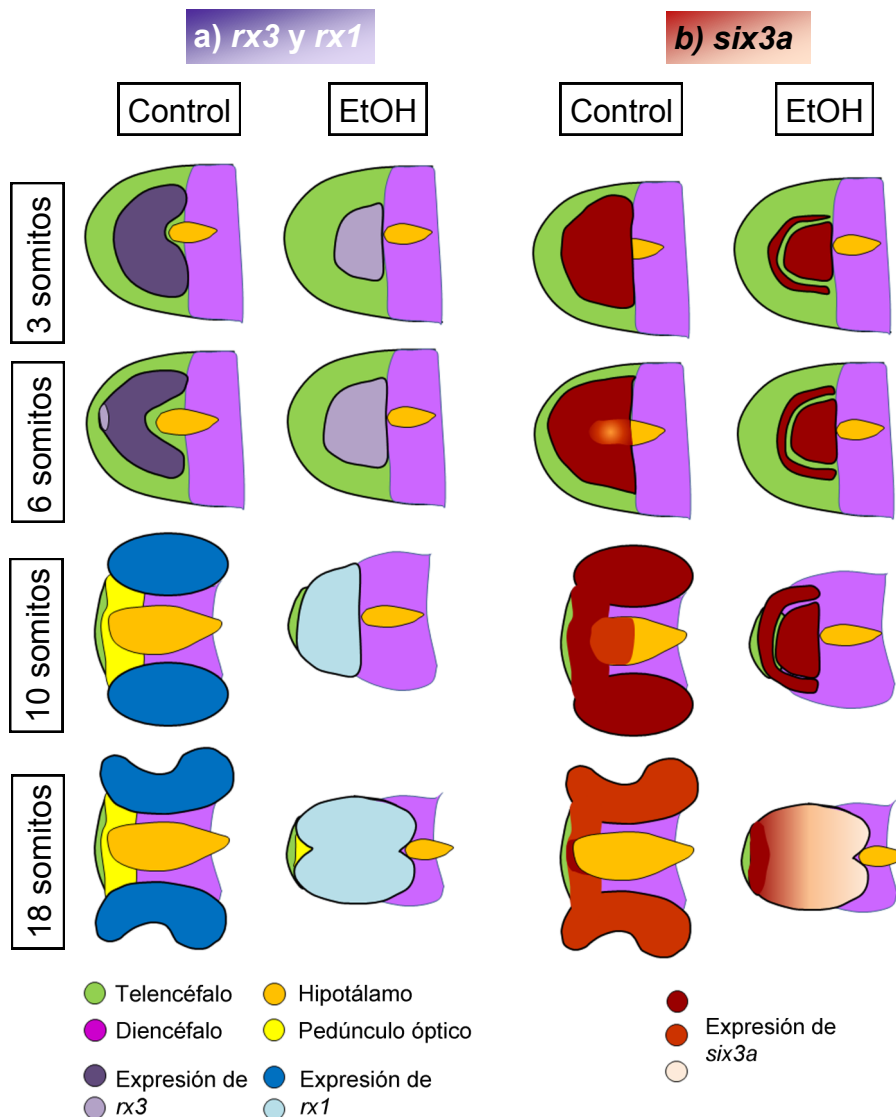
## *Discusión*

---

vesículas ópticas permanecen en la región ventral y no le dejan espacio. En cualquier caso, se ha demostrado que el diencéfalo no es el responsable directo de la división del campo visual (England *et al.*, 2006; Rembold *et al.*, 2006). Por todo ello, la ciclopia inducida por etanol no es similar a la que presentan los mutantes *cyc* (MacDonald *et al.*, 1995; England *et al.*, 2006) y podría ser una consecuencia de la permanencia en una posición medial de los progenitores retinianos, tal y como ocurre en los mutantes *sbl* (England *et al.*, 2006), y no por la ausencia de cambios en la expresión de *pax6a* y *pax2*.

El efecto más evidente del etanol sobre la expresión de *pax6a* es que conduce a su paulatina desaparición en el cerebro posterior y en la cola, a concentraciones crecientes de etanol. Pax6 es uno de los factores de transcripción implicados en la formación del patrón metamérico del rombencéfalo y en su ausencia se producen graves malformaciones (Moens *et al.*, 1996). En la regulación de la división del cerebro posterior, Pax6 podría actuar a través de la regulación de la expresión de la *cadherina-4* y, por tanto, modular las uniones celulares (Liu *et al.*, 2001). El etanol altera gravemente la formación del rombencéfalo y de los somitos en el pez cebra (Loucks y Ahlgren, 2009), y en mamíferos reduce la expresión de *pax6* en células indiferenciadas (Aronne *et al.*, 2008). La alteración de la expresión de *pax6a* puede constituir el mecanismo a través del cual el etanol produce fallos en el desarrollo del cerebro posterior y de la cola.

Hemos encontrado variaciones importantes en la expresión de tres de los marcadores utilizados, *rx3*, *rx1* y *six3a*. En los tres casos, el etanol altera su patrón normal de expresión y reduce la intensidad del marcaje (Fig. 65). Las alteraciones descritas por nosotros coinciden con las observadas en trabajos previos realizados en embriones de una estirpe distinta expuestos a etanol, y también con embriones expuestos a foscolina, otro teratógeno que induce ciclopia (Loucks *et al.*, 2007).



**Fig. 65:** Esquema de la expresión de *rx3* y *rx1* (a) y de *six3a* (b) durante la morfogénesis de las vesículas ópticas. Las distintas regiones del cerebro se muestran con los mismos colores en ambas figuras. La expresión relativa de *rx3*, *rx1* y *six3a* en el campo visual y las vesículas ópticas se muestra con una gradación de colores morado, azul y rojo, respectivamente.

En el pez cebra hay tres genes *rx* que presentan patrones de expresión superpuestos. En los ejemplares control, según va avanzando la división del campo visual se pierde el marcaje de *rx3* en la línea media, como consecuencia del movimiento de las células del campo visual hacia las regiones laterales (Varga *et al.*, 1999; England *et al.*, 2006; Rembold *et al.*, 2006). En los embriones expuestos a etanol el marcaje en la línea media se mantiene, lo que refleja la dificultad de las células para desplazarse.

Tras la exposición embrionaria a etanol hemos observado una reducción en la extensión e intensidad del marcaje para *rx3* y *rx1*. *rx3* está implicado en la migración activa de las células del campo visual (Rembold *et al.*, 2006) y a partir de los 10 somitos su expresión es sustituida por la de *rx1*. Al final, las células que expresan *rx1* se diferenciarán a retina en lugar de a pedúnculo óptico o telencéfalo.

## *Discusión*

---

En mutantes *eyl* de medaka y en mutantes *chk* de pez cebra, que carecen de expresión de *rx3*, el campo visual se especifica correctamente pero la evaginación no comienza, desaparece este dominio y surgen fenotipos anoftálmicos (Loosli *et al.*, 2001; Kennedy *et al.*, 2004). El fenotipo anoftálmico, en el cual la evaginación de las vesículas ópticas ni siquiera comienza, se debe a un exceso de convergencia celular hacia la línea media, debida posiblemente a la falta de degradación de la molécula de adhesión NICam (Brown *et al.*, 2010). Algo similar ocurre en los mutantes de ratón para el gen *rx* (en ratones sólo hay un gen) (Mathers *et al.*, 1997), donde las células no son capaces de adquirir morfologías alargadas ni tampoco contribuir a la formación de la retina (Medina-Martínez *et al.*, 2009). *rx3* podría jugar un doble papel en la evaginación de las vesículas ópticas, por un lado controlando la proliferación celular y el tamaño de las vesículas ópticas (Loosli *et al.*, 2001), y por otro regulando la convergencia y migración lateral de las células del campo visual (Rembold *et al.*, 2006).

Es difícil comparar los embriones expuestos a etanol con los mutantes de *rx3* ya que los primeros presentan expresión de este gen, aunque reducida. En los organismos ciclópeos inducidos por exposición a etanol, la evaginación comienza pero la división de las dos vesículas no termina por lo que permanecen fusionadas. En otros modelos, la sobreexpresión de *rx2* mediante inyección ha conducido a resultados algo contradictorios, ya que induce la aparición de fenotipos ciclópeos (Chuang y Raymond, 2001). Sin embargo, no se puede descartar que esta inyección esté induciendo la transformación del pedúnculo óptico en retina, en lugar de dificultar la división final del campo visual.

El otro gen en el que hemos encontrado diferencias tras la exposición a etanol es *six3a*. Hemos visto una reducción del marcaje para este gen en las vesículas ópticas, mientras que su expresión en el pedúnculo óptico y en la región anterior del hipotálamo se mantiene similar a los controles. *six3* se ha descrito como uno de los genes alterados en casos de holoprosencefalia en humanos (Chiang *et al.*, 1996; Wallis *et al.*, 1999) y en pez cebra (Domené *et al.*, 2008). Aunque el mecanismo a través del cual las mutaciones de *six3* inducen holoprosencefalia es controvertido, algunos estudios apuntan hacia un fallo en la activación de la señalización *shh* (Geng *et al.*, 2008; Sanek *et al.*, 2009). Sin embargo, en pez cebra

se ha propuesto que este morfógeno no es el responsable de los fenotipos ciclópeos inducidos por etanol (Blader y Strähle, 1998). Por otro lado, en *Xenopus*, *six3* regula la correcta expresión de *zic2*, lo cual es necesario para el establecimiento de la placa neural anterior y por tanto del campo visual (Gestri *et al.*, 2005). Además, *six3* es necesario para inhibir la actividad de *wnt1*, permitiendo la formación del prosencéfalo (Lagutin *et al.*, 2003).

La mayoría de los estudios sobre la función de *six3* se han realizado en mutantes nulos o tras la inyección del morfolino, por lo que carecen de la expresión del mismo (Geng *et al.*, 2008). Algunos estudios proponen que las mutaciones en *six3* que finalmente producen holoprosencefalia conducen a mutantes hipomorfos, que presentan una expresión reducida o una menor actividad (Domené *et al.*, 2008). Además, en medaka se ha demostrado que la inyección de una dosis media de una proteína inhibidora del ciclo celular llamada Geminina que se une y bloquea a Six3, o la inyección de dosis medias del morfolino de *six3a* en pez cebra, inducen fenotipos ciclópeos (Carl *et al.*, 2002; del Bene *et al.*, 2004). La disminución de la expresión de *six3* podría también estar relacionada con la reducción del tamaño de las vesículas ópticas tras el tratamiento con etanol, tanto en nuestro modelo como en modelos de microftalmia (Kashyap *et al.*, 2007), ya que se ha descrito que dicho gen es un importante inductor de la proliferación celular (Gestri *et al.*, 2005).

Nuestros resultados indican que podrían existir ciertas similitudes en los mecanismos moleculares que subyacen a la holoprosencefalia y a la ciclopia inducida por etanol. No obstante, dado que se necesitan concentraciones elevadas para obtener ésta última, que están alteradas numerosas rutas de señalización, y que la ciclopia en los casos de holoprosencefalia es un caso extremo poco frecuente, es difícil extrapolar datos de una sobre la otra.

### 5.2.2 El etanol altera la citoarquitectura del campo visual

Hemos analizado la citoarquitectura del campo visual durante la evaginación de las vesículas ópticas, prestando especial atención a la forma de las células y a las uniones entre ellas. En los animales control se produce un cambio de morfología sustancial entre los 3 y 6 somitos, pasando las células de una forma redondeada a

## *Discusión*

---

una fusiforme y se orientan todas ellas radialmente hacia la región central. En embriones de 10 somitos las células se encuentran totalmente orientadas y polarizadas, tal y como queda reflejado en las imágenes de microscopía electrónica y en la distribución de Zo1, y los progenitores retinianos se configuran como un epitelio. La proteína Zo1 se localiza en la región latero-apical de las células en diversos tipos de uniones celulares, como las uniones estrechas, las zónulas ocluyentes y las zónulas adherentes (Ciolofan *et al.*, 2006). En este mismo estadio la región central de la vesícula óptica se cavita y el eje del embrión se empieza a curvar. En el último estadio estudiado por nosotros, 18 somitos, las células de la región dorsal de la copa óptica se alargan, quedando su núcleo alejado de la lente en formación, mientras que las células de la región ventral adquieren un aspecto más cúbico. Este cambio en la morfología ya fue descrito por Scmitt y Dowling en 1994 y es similar al que sucede en ratón (Svoboda y O'Shea, 1987), donde se ha descrito y cuantificado el alargamiento paulatino de las células del campo visual, mayor que el de las células de tejidos adyacentes, y el incremento de uniones celulares en la región latero-apical. Se ha propuesto que dicho cambio debe ser inducido por modificaciones en el citoesqueleto celular y que debe ser muy importante para la correcta evaginación de las vesículas ópticas. De hecho, los estudios realizados en *Drosophila* revelan la importancia de la polarización celular para la correcta formación de la retina (Ma y Moses, 1995).

En los embriones expuestos a etanol no todas las células son capaces de orientarse radialmente y aún menos a concentraciones elevadas de etanol. Además, las células que se polarizan no lo hacen en la misma dirección. Las células del campo visual tienen núcleos más redondeados, citoplasmas con gran cantidad de vacuolas y un menor número de ribosomas. Sin embargo, tal y como hemos visto por microscopía electrónica, las células se alargan en cierta medida, aunque su núcleo mantiene una morfología más circular. También presentan uniones celulares en su región latero-apical; pero las células, aunque están unidas y con sus membranas paralelas, no se unen de forma ordenada. En general todo el proceso está retrasado y no sólo la distribución de Zo1 está alterada sino que también está disminuida su expresión. La alteración de la disposición de las uniones celulares, la expresión y distribución de Zo1 y la falta de elongación celular pueden estar directamente relacionadas. El *knockdown* de *zo1* conlleva un retraso en la

formación y maduración de las uniones estrechas (McNeil *et al.*, 2006) y, sin Zo1 ni Zo2, las células epiteliales aunque sí se alargan no son capaces de establecer uniones entre ellas (Umeda *et al.*, 2006). Por tanto, los cambios, que son importantes durante la evaginación normal de las vesículas ópticas (Rembold *et al.*, 2006), están impedidos por la exposición embrionaria a etanol.

Hemos descrito que los progenitores retinianos de los animales tratados con etanol presentan gran cantidad de vacuolas, mitocondrias con morfologías aberrantes, y en ocasiones próximas al núcleo, y menor cantidad de ribosomas. Alteraciones similares fueron descritas en células del intestino delgado de ratas adultas alimentadas con etanol (Rossi y Zucoloto, 1977) y también en el nervio óptico de embriones de rata (Pinazo-Duran *et al.*, 2003). Tanto el sistema de vacuolas como las mitocondrias intervienen en la detoxificación del alcohol (revisado en Manzo-Avalos y Saavedra-Molina, 2010) y no es de extrañar que ante una situación tóxica aumente su número. Por otro lado, el etanol altera la morfología y funcionalidad de las mitocondrias. De hecho, el etanol aumenta la liberación de radicales libres desde las mitocondrias (Robin *et al.*, 2005), reduce la funcionalidad de sus complejos respiratorios y la síntesis de ATP, posiblemente mediante la depleción de las proteínas estructurales y funcionales de los ribosomas (Weiser *et al.*, 2011).

En relación con la evaginación de las vesículas ópticas, como explicamos en la introducción, se han propuesto dos teorías. Una de ellas postula que el movimiento de las células del campo visual es consecuencia de las fuerzas generadas por otras regiones del prosencéfalo (England *et al.*, 2006). La otra propone que las células emiten filopodios y lamelipodios y se mueven activamente por si mismas (Rembold *et al.*, 2006). No tenemos datos suficientes para apoyar o descartar una u otra teoría. Nuestros resultados indican que podría ocurrir una mezcla de los dos. Los movimientos del telencéfalo y del diencefalo probablemente generen presiones sobre el campo visual, lo que desplazaría a las células del mismo (England *et al.*, 2006). Por su parte, los progenitores retinianos cambian de morfología orientándose rápidamente, lo que favorecería el movimiento activo (Rembold *et al.*, 2006).

Durante la evaginación de las vesículas ópticas, los progenitores retinianos

## *Discusión*

---

sufren un cambio de morfología desde mesenquimal hasta epitelial. La transición mesénquima-epitelio ha sido descrita durante la formación de los somitos del pez cebra (Barrios *et al.*, 2003; revisado en Holley, 2007) y el proceso opuesto, la transición epitelio-mesénquima ha sido descrito durante la gastrulación (revisado en Shook y Keller, 2003; Ozdamar *et al.*, 2005) y la formación de la copa óptica (Martínez-Morales *et al.*, 2009). Durante la transición mesénquima-epitelio, en un tejido se producen cambios a nivel celular que incluyen la acumulación de complejos de adhesión en la región latero-apical, la disposición del núcleo en la región basal y la recolocación del centrosoma en la zona apical (Barrios *et al.*, 2003). Si suponemos que es necesaria la migración activa de las células Rx3 para una correcta evaginación, es posible que un mismo progenitor sufra sucesivos cambios mesénquima-epitelio-mesénquima que le permitan desplazarse y contribuir a la formación de los primordios ópticos. Tras el tratamiento con etanol los progenitores retinianos no alcanzan una morfología totalmente epitelial, a lo cual puede contribuir el descenso en la expresión de *zo1*, lo que conduciría a la imposibilidad en la maduración de las uniones apicales.

La transición mesénquima-epitelio y epitelio-mesénquima se ha estudiado, sobre todo, en el marco de los procesos cancerígenos, ya que durante ellos las células pierden sus características epiteliales para poder desplazarse a otros tejidos (metástasis), donde vuelven a adquirir ciertas características epiteliales (revisado en Chaffer *et al.*, 2007). En cultivos celulares se ha demostrado que la transición mesénquima-epitelio podría ser iniciada por la localización de Cadherina-E en la regiones apicales (Auersperg *et al.*, 1999) y que la señalización FGF juega un papel importante (Chaffer *et al.*, 2006). También en cultivos celulares se ha demostrado que el bloqueo de la señalización TGF $\beta$  es necesario para inducir la transformación de la célula mesenquimal en epitelial (Li *et al.*, 2010). Durante el desarrollo, la transición mesénquima-epitelio se ha estudiado sobre todo durante la formación de los somitos, donde se ha demostrado que en parte está regulada por GTPasas (Nakaya *et al.*, 2004) y por las efrinas (Barrios *et al.*, 2003), moléculas cuya expresión se altera por la exposición a etanol (Arenzana, 2006).

El fenotipo ciclópeo se puede deber a distintos procesos, e incluso ejemplares de pez cebra con similares problemas durante la gastrulación como los mutantes



*cyc* y los *sbl*, desarrollan ciclopia por mecanismos distintos (England *et al.*, 2006). Tras el análisis del patrón de distribución de Zo1, hemos demostrado que los mutantes en la señalización *shh* (*smo* y *syu*) no presentan problemas de polarización celular, aunque en los mutantes *smo* se hayan detectado fenotipos ciclópeos (Barresi *et al.*, 2000).

Tanto en los mutantes *cyc* como en los *oep* hemos encontrado indicios de ciclopia. Sin embargo, el patrón de expresión de Zo1 en los mutantes *cyc* no se parece al que hemos descrito tras la exposición a etanol. La ciclopia en estos mutantes tiene su origen en una falta de especificación de las regiones diencefálicas (England *et al.*, 2006), mientras que tras el tratamiento con etanol sí se especifican estas regiones aunque con algunas alteraciones. El patrón de distribución de Zo1 es bastante similar entre los embriones expuestos a etanol y los mutantes *oep*. No se ha estudiado en profundidad a qué se debe la ciclopia en estos animales, pero durante la gastrulación sus células presentan una mayor adhesión entre ellas y una menor adhesión con el vitelo sobre el que se desplazan, y por tanto una menor velocidad de desplazamiento, mientras que ésta es normal en los mutantes *cyc* (Warga y Kane, 2003). Estos mismos autores proponen que la proteína Oep regula de alguna forma las uniones celulares y, de hecho, en mamíferos las proteínas de la familia EGF-CFC, a la cual pertenece Oep, modulan la degradación de la  $\beta$ -Catenina (proteína reguladora de la formación de uniones celulares) e intervienen en la transición epitelio-mesénquima (revisado en Saloman *et al.*, 2000).

Puede que la falta de separación de las vesículas ópticas producida por la exposición a etanol sea consecuencia de la incorrecta migración de la placa precordial (Blader y Strähle, 1998). Sin embargo, nunca se ha determinado por qué el campo visual es una de las regiones más afectadas, ni que relación mantienen la placa precordial y la división del campo visual. Las alteraciones en los patrones de expresión de determinados genes y proteínas, el descenso en la expresión de proteínas de adhesión, las deficiencias en la transición mesénquima-epitelio, y la similitud con modelos genéticos de ciclopia que se relacionan directamente con adhesión celular, hacen plausible la existencia de un mecanismo intrínseco en el campo visual.

### 5.3 EFECTO DEL ETANOL A LARGO PLAZO

Para analizar el efecto del etanol en la diferenciación del sistema visual hemos utilizado el protocolo previamente puesto a punto en nuestro laboratorio (Arenzana *et al.*, 2006b). El periodo del tratamiento fue elegido para alterar todo el desarrollo temprano del ojo del pez cebra (Schmitt y Dowling, 1994). El tiempo de tratamiento, la concentración de etanol usada y la estirpe de pez cebra (AB) han sido utilizados previamente por varios grupos para estudiar distintos procesos del desarrollo del sistema visual (Arenzana *et al.*, 2006b, Loucks *et al.*, 2007; Fan *et al.*, 2010; Irons *et al.*, 2010; Sylvain *et al.*, 2010).

La retina y el TO de los ejemplares ciclópeos presentan las dos vesículas fusionadas con menor superficie que una retina normal. Por ello hemos cuantificado el número de células por unidad de superficie. Las razones de que la retina ciclópea sea más pequeña no se conocen suficientemente bien; pero sí se sabe que el etanol reduce la proliferación celular (Kashyap *et al.*, 2004) y aumenta la muerte celular (Reimers *et al.*, 2006), lo que conduciría a un menor número de células. Además, el etanol reduce la diferenciación celular (revisado Polifka y Friedman, 2002), lo que dificulta la aparición de proyecciones celulares impidiendo, por tanto, el aumento del volumen de las áreas visuales (Matsui *et al.*, 2006; Kashyap *et al.*, 2007).

#### 5.3.1 El etanol altera la formación del nervio óptico

Los ejemplares ciclópeos presentan un nervio óptico en cada hemirretina y ambos se unen en la línea media, por lo que un único nervio se dirige al TO. El número de proyecciones que alcanzan el TO es menor en los animales ciclópeos que en los controles, pero ambos hemisferios del TO presentan aferencias en proporción similar. Este fenotipo es similar al observado en mutantes *cyc* (Karlstrom *et al.*, 1996), en los que sólo se observan las proyecciones ipsilaterales y anteriores, habiendo desaparecido las proyecciones contralaterales que son las más abundantes (Burrill y Easter, 1994). No hemos realizado estudios de trazado que nos permitieran identificar las proyecciones que se pierden; pero, teniendo en

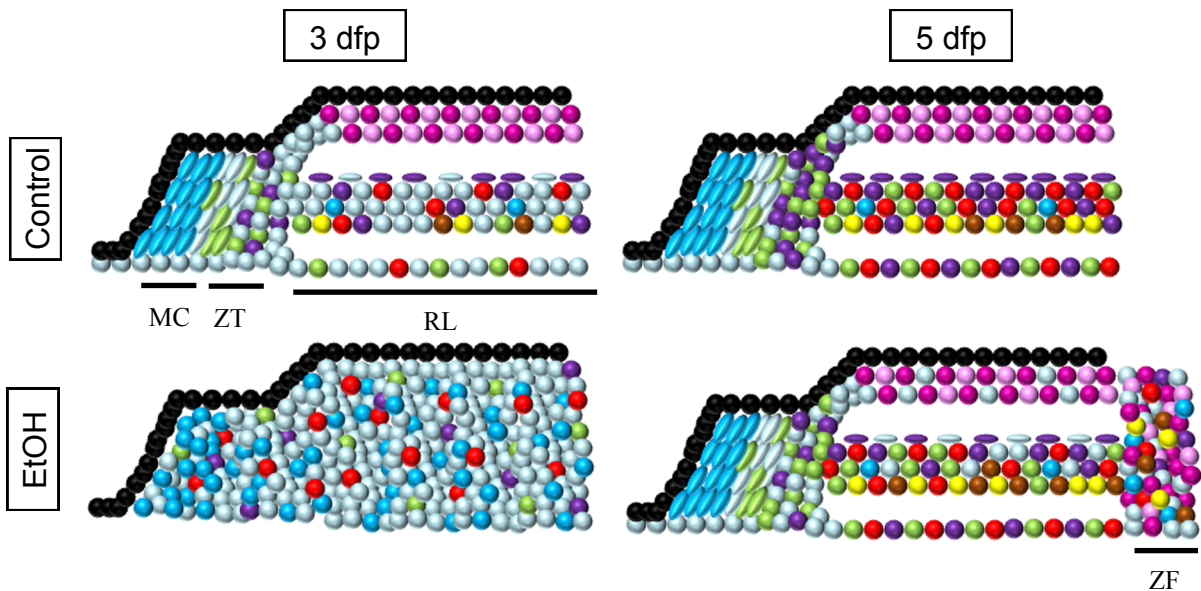
cuenta la gran reducción en el marcaje de Tubulina y CR, cabe pensar que algo similar ocurre en los embriones ciclópeos inducidos por etanol.

El menor grosor del nervio óptico en los embriones ciclópeos es consistente con estudios previos, en los que se ha visto que el etanol es capaz de inducir hipoplasia del nervio óptico en embriones de pez cebra (Parng *et al.*, 2007) y pollo (Chmielewski *et al.*, 1997). La hipoplasia del nervio óptico puede explicarse de diversas formas: el etanol podría alterar las poblaciones gliales que intervienen en el correcto empaquetamiento y orientación del nervio óptico (Strömmland y Pinazo-Durán, 1994); la alteración de los filamentos intermedios impediría la correcta arborización del nervio y también el transporte de moléculas a lo largo del mismo (Hassler y Moran, 1986; Chmielewski *et al.*, 1997); y, además, el etanol produce desórdenes en la membrana plasmática al hacer la matriz lipídica más fluida (Goldstein y Chins, 1981). Todo ello, en conjunto, dificultaría la correcta formación del nervio óptico.

En los ejemplares ciclópeos, Pax2 no sólo se expresa en las células presentes en el tallo óptico, tal y como ocurre en los ejemplares control, sino también alrededor de la retina. Se ha descrito que células Pax2 positivas son parte de la glía responsable del cierre de la fisura coroidea y de dirigir el nervio hacia centros superiores durante el desarrollo (MacDonald *et al.*, 1997). Numerosos autores han descrito la vulnerabilidad de la población de células gliales al etanol, aunque los datos son contradictorios. Dependiendo de la edad, animal y tejido, el etanol es capaz de inducir una fuerte gliosis reactiva (Baydas y Tuzcu, 2005), acompañada del aumento de la expresión de proteínas gliales como GFAP (Taléns-Visconti *et al.*, 2011). También se ha descrito el efecto contrario, dificultando la formación de nuevas células gliales (revisado en Guerri y Renau-Piqueras, 1997; Uban *et al.*, 2010). Por tanto, no podemos afirmar que el aumento de células Pax2 positivas sea consecuencia directa del etanol. Podría ser una consecuencia de la organización aberrante de la región ventral del embrión, que en vez de sustentar la salida de los nervios ópticos y la formación del quiasma, sustenta tejido retiniano.

### 5.3.2 Tipos celulares retinianos y etanol

A los 3 dpf la retina de los ejemplares ciclópeos no está correctamente laminada (Arenzana *et al.*, 2006b), al igual que no es posible distinguir las dos capas principales del TO. La laminación en los ejemplares ciclópeos no se consigue hasta los 5 dpf (Santos-Ledo, 2007), aunque aún en este estadio, las capas nucleares tienen un grosor menor que en los ejemplares control. Lo mismo ocurre en modelos de microftalmia inducida por etanol (Dlugos y Rabin, 2007). Este retraso en la correcta laminación es similar a lo que ocurre con la mayoría de los marcadores que hemos utilizado para analizar la diferenciación. En la Fig. 66 se representa un resumen de los marcadores presentes en la retina a los 3 y 5 dpf en ambos grupos experimentales.



**Fig. 66:** Representación de la inmunorreactividad para los distintos marcadores en la retina. Las diferencias en el tamaño entre la retina control y ciclópea no se muestran. MC: margen ciliar; RL: retina laminada; ZF: zona de fusión de las hemi-retinas ciclópeas; ZT: zona de transición.



Nuestros datos apoyan la teoría de que el efecto del etanol es específico del tipo celular (Matsui *et al.*, 2006; Kahsyap *et al.*, 2007). Los conos (Zpr1 positivos) y las células de Müller (GS positivas) tras la exposición a etanol se comportan de modo similar: presentan un retraso severo en su diferenciación, aunque a los 5 dpf la densidad de células marcadas es similar a la observada en los ejemplares control, lo que concuerda con el retraso general inducido por el etanol. Sin

embargo, los bastones (Zpr3 positivos) no llegan a recuperarse en ese estadio, aunque se observa cierto incremento en su densidad en los ejemplares ciclópeos. La formación de los bastones está directamente inducida por el ácido retinoico (Hyatt *et al.*, 1996). Dado que las enzimas que sintetizan el ácido retinoico son las mismas que se utilizan para detoxificar el etanol (Yelin *et al.*, 2005), el exceso de etanol podría reducir los niveles de ácido retinoico, lo que finalmente conduciría a un retraso de la diferenciación de los bastones. En el caso de los conos debería ocurrir lo contrario (Hyatt *et al.*, 1996), cosa que no sucede, revelando que el efecto del etanol es más fuerte sobre los bastones.

Hemos encontrado gran cantidad de fotorreceptores en la región de fusión de ambos ojos. Estas células han sido identificadas también en los mutantes *cyc* formando estructuras en roseta en esa misma localización (Fulwiler *et al.*, 1997). Estas estructuras se originan, probablemente, por la ausencia de epitelio pigmentario en la región de fusión de ambos ojos. No se conoce por qué esas células se diferencian a fotorreceptores, aunque quizás tenga que ver con el mantenimiento de la expresión de *rx1* en dicha región, ya que este factor de transcripción regula la formación de fotorreceptores (Chuang y Raymond, 2001).

La densidad de células interplexiformes (TH positivas) es mayor en los ejemplares ciclópeos que en las larvas control a los 5 dpf. Estos resultados coinciden con trabajos previos que indican que el etanol estimula la expresión de TH (Bowers *et al.*, 2006) y la liberación de dopamina (Guardia *et al.*, 2000; Sobrian *et al.*, 2005). Otros estudios, por el contrario, indican que no produce ningún efecto (Choi *et al.*, 2008) o, incluso, que disminuye el número de células positivas a TH ya que el etanol aumenta su sensibilidad a la toxicidad mediada por receptores NMDA (Crews *et al.*, 1999). Estos estudios se llevaron a cabo en distintas regiones del SNC y en distintos momentos del desarrollo, lo que indica que el efecto del etanol sobre las células TH positivas depende de varios factores.

En la retina de teleósteos hay diversos tipos de células amacrinas en la CNI, y de células ganglionares y amacrinas desplazadas en la CCG, que son positivas para Pax6 y CR. En cuanto a las células CR positivas siempre hay un número menor en los animales ciclópeos, aunque no es significativo. La alteración de las células CR positivas depende de la edad de exposición del embrión, ya que se ha

## *Discusión*

---

descrito que en roedores ya nacidos o adultos el etanol no modifica su número (Kril *et al.*, 1997) o incluso lo aumenta (Granato, 2006). Sin embargo, la exposición a etanol durante el desarrollo reduce su número y esto se asocia con las alteraciones de la visión, aprendizaje y memoria de las personas nacidas con FAS (Marshall *et al.*, 2009). En cuanto a las células Pax6 positivas, en los ejemplares control se produce una pérdida de estas células entre los 3 y 5 dpf, lo que no sucede en los ejemplares ciclópeos. Esto coincide con lo demostrado en modelos de microftalmia en pez cebra, donde el etanol retrasa el descenso en el número de células positivas para Pax6 que ocurre normalmente en la retina (Kashyap *et al.*, 2007). A este efecto hay que sumar el que, en cultivos celulares, el etanol aumenta la diferenciación de neuronas glutamatérgicas que son Pax6 positivas (Kim *et al.*, 2010), también presentes en la retina del pez cebra. Por otro lado, en la retina de rata el etanol reduce la densidad de células Pax6 positivas (Aronne *et al.*, 2008).

Prox1 se encuentra en gran variedad de tipos celulares: amacrinas, interplexiformes, amacrinas desplazadas, horizontales, bipolares y células de Müller (Cid *et al.*, 2010). Tras el tratamiento con etanol hemos encontrado diferencias respecto a los controles a los 2 y 5 dpf, pero no a los 3 dpf. Las diferencias observadas a los 2 dpf se pueden relacionar con el retraso general observado en los embriones tras la exposición a etanol (Kashyap *et al.*, 2007). Entre los 3 y 5 dpf, el número de células Prox1 positivas aumenta considerablemente en los animales control pero no en los ejemplares ciclópeos lo que conduce a la menor densidad de estas células al final a los 5 dpf.

Las alteraciones observadas en los bastones y en las interneuronas que expresan CR y Prox1 contribuirán a los déficits visuales que se han descrito tras la exposición embrionaria a etanol, tanto en pez cebra (Bilotta *et al.*, 2002; Matsui *et al.*, 2006) como en humanos (Paul *et al.*, 2010). Una posible explicación al retraso en la diferenciación inducida por la exposición a etanol y al hecho de que algunos marcadores se encuentran aumentados y otros disminuidos podría sustentarse en el concepto de competencia celular. Los progenitores celulares pasan por una serie de periodos en los cuales son capaces de responder a ciertos estímulos y generar una subpoblación celular concreta. Pasada esta ventana temporal las células ya no son capaces de responder a estos estímulos y adquieren competencia frente a

otros factores (revisado en Livesey y Cepko, 2001). El etanol podría retrasar la diferenciación de los progenitores retinianos hacia las primeras células maduras (células ganglionares e interplexiformes que son positivas a CR y Prox1). En este caso, quedaría un remanente de células proliferativas que, más tarde, respondería a los estímulos de diferenciación hacia otros tipos celulares, como células interplexiformes positivas para TH o Pax6, lo que resultaría en la mayor densidad de estos tipos celulares que hemos observado en los ejemplares ciclópeos. Esta hipótesis se ve sustentada por el retraso en la organización del MC y la mayor densidad de células proliferativas observado a los 3 dpf en los ejemplares ciclópeos.

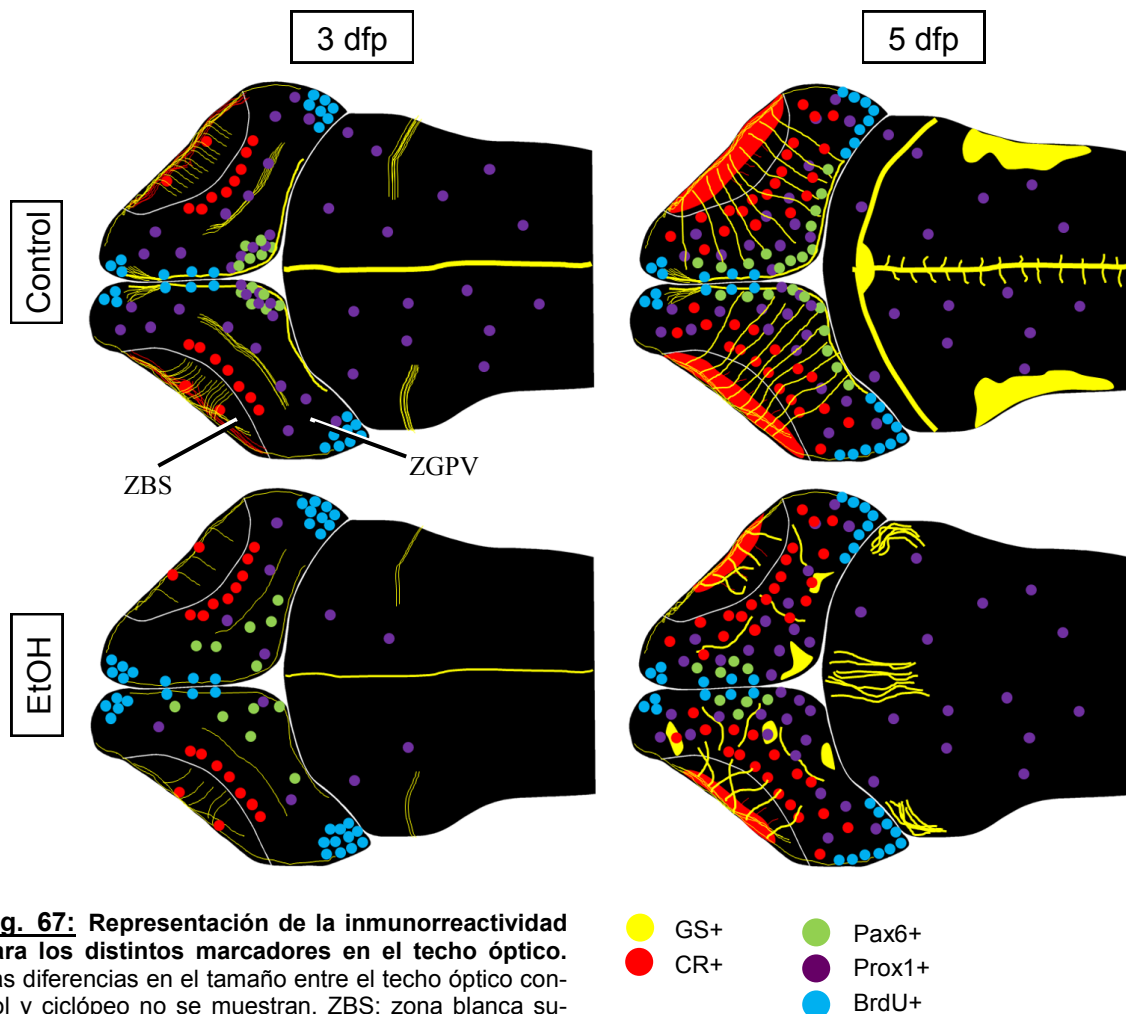
### 5.3.3 Alteraciones en el techo óptico de los ejemplares ciclópeos

Hasta donde sabemos nuestro trabajo es el primero que analiza la diferenciación y la distribución de proyecciones en el TO de ejemplares ciclópeos. Nuestros datos indican que el efecto del etanol sobre el TO está, en gran parte, relacionado con la disminución de proyecciones que lo inervan. De hecho, hemos detectado una reducción del neuropilo, caracterizado por el marcaje con Tubulina y CR, y de procesos gliales, caracterizados por ser positivos a GS. Para determinar el verdadero papel del nervio óptico en la formación del TO y, en concreto, sobre las poblaciones celulares positivas para los marcadores que hemos utilizado (TH, Pax6, Prox1 y CR) sería conveniente realizar estudios en mutantes de pez cebra *chk*, que carecen de ojos y por tanto de nervios ópticos (Winkler *et al.*, 2000), o realizar la inyección del morfolino de *ath5*, gen responsable de la formación de las células ganglionares (Kay *et al.*, 2004).

La citoarquitectura del TO está afectada por la exposición a etanol de forma similar a lo que ocurre en la retina. No es posible distinguir las dos capas iniciales (ZBS y ZGPV) a los 3 dpf (Arenzana *et al.*, 2006b), pero sí a los 5 dpf (Santos-Ledo, 2007). Esto se puede relacionar con el retraso generalizado en el desarrollo del embrión descrito por nosotros y otros autores (Blader y Strähle, 1998; Arenzana *et al.*, 2006b; Kashyap *et al.*, 2007). A los 5 dpf, aun se observa que la ZBS es más delgada que en los ejemplares control y no se ve claramente el EM. Estas

## Discusión

alteraciones, junto con las observadas en la retina, se relacionan con fallos en el procesamiento visual de embriones tratados con etanol (Bilotta *et al.*, 2002). Las personas nacidas con SAF también presentan déficits neurosensoriales, debido posiblemente a la incorrecta formación de los centros visuales (Strömland, 2004). En la Fig. 67 se representa un resumen de los marcadores presentes en el TO a los 3 y 5 dpf en ambos grupos experimentales.



Prox1 regula la diferenciación y funcionalidad celular en varias regiones del pez cebra, como la retina (Cid *et al.*, 2010) o la línea lateral (Pistocchi *et al.*, 2009). En este trabajo hemos descrito por primera vez la distribución de Prox1 en el TO del pez cebra. Así, las células positivas a Prox1 están presentes en toda la ZGPV y son más abundantes en las regiones media y posterior, próximas a las regiones proliferativas del TO. Por tanto, en el TO, Prox1 también podría contribuir a la transición entre proliferación y diferenciación, como ocurre en otras regiones del



SNC (Pistocchi *et al.*, 2009; Cid *et al.*, 2010).

Con respecto a las células gliales del TO (positivas a GS), hemos descrito no sólo una reducción en el marcaje sino también una desorganización del mismo tras el tratamiento con etanol. La distribución de GS en el TO coincide con la disminución de la diferenciación glial que se ha descrito previamente (Uban *et al.*, 2010). El hecho de que las células gliales de la retina y del TO que expresan GS se comporten de manera distinta tras el tratamiento con etanol, es un dato más que apoya la hipótesis del efecto diferente del etanol sobre distintas poblaciones celulares (Matsui *et al.*, 2006; Kashyap *et al.*, 2007). Las células gliales positivas a Pax2 en el pedúnculo óptico y las células gliales positivas a GS son dos poblaciones distintas, ya que Pax2 regula la diferenciación de algunas células gliales (MacDonald *et al.*, 1995), y GS sólo se expresa en las células gliales maduras (Grupp *et al.*, 2010).

### 5.3.4 La proliferación no está alterada en los animales ciclópeos

El efecto del etanol sobre la proliferación celular, estudiada mediante la incorporación de BrdU, es muy similar en el TO y en la retina. En ambos grupos se produce una disminución paulatina de la densidad de células proliferativas al completarse la organogénesis y se reducen las regiones con alta actividad proliferativa. No hemos encontrado diferencias significativas en la densidad de células que incorporan BrdU, excepto en la retina a los 3 dpf. Ello es debido, posiblemente, al retraso en el desarrollo de los embriones ciclópeos, ya que en este estadio, el MC de la retina ya se ha formado completamente en los animales control pero no en los ejemplares ciclópeos.

Se ha descrito una disminución de la proliferación celular tras la exposición de diversos tejidos al etanol. Sin embargo, no queda claro cómo el etanol es capaz de alterar la división celular. Se sabe que el etanol es capaz de inhibir algunos mitógenos como los agonistas muscarínicos (Costa y Guizzetti, 2002) y la Proteína Quinasa C (Kumada *et al.*, 2006), incluso esta proteína presenta dominios de unión para el etanol (Slater *et al.*, 2003). En nuestro modelo, un día después de retirar el etanol, y considerando el menor tamaño de las áreas visuales del pez cebra, la

## ***Discusión***

---

proliferación celular es bastante normal. En modelos de microftalmia en pez cebra, se ha visto que el etanol disminuye la tasa de proliferación (Kahsyap *et al.*, 2007), pero las diferencias no son muy significativas. Dicho modelo fue diseñado para alterar específicamente el periodo de mayor proliferación en la retina del pez cebra entre las 24 y las 36 hpf (Schmitt y Dowling, 1994).

En todos los estadios analizados, la proliferación es ligeramente superior tras el tratamiento con etanol en las larvas ciclópeas. Ello podría ser consecuencia de la elevada muerte celular inducida por el etanol que se ha descrito previamente (Carvan *et al.*, 2004; Reimers *et al.*, 2006; Santos-Ledo, 2007). La elevada muerte celular podría contribuir a la reducción del tamaño de las áreas visuales de los ejemplares ciclópeos, así como también a la hipoplasia de las proyecciones celulares (Chmielewski *et al.*, 1997). Aunque el etanol altere la proliferación celular, nuestros datos apuntan a que, tras su retirada, se vuelven a alcanzar niveles normales de proliferación.

### **5.3.5 Los embriones ciclópeos se recuperan parcialmente**

En este estudio en el pez cebra hemos comprobado que los distintos tipos celulares y las distintas regiones del cerebro se comportan de manera diferente tras la exposición a etanol; y se ha descrito que ocurre lo mismo en humanos (Matsumoto, 2009). Aunque la diferenciación y la laminación de la retina y el TO estén parcialmente alteradas en los embriones expuestos a etanol (Matsui *et al.*, 2006; Kashyap *et al.*, 2007), nuestros datos demuestran que se recuperan en gran medida a los 5 dpf. Una posible explicación sería que las cascadas de señalización celular, como por ejemplo Shh (Ahlgren *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2007), FGF8 (Chrisman *et al.*, 2004) o FGF1 (Bartlett *et al.*, 1994), implicadas en el desarrollo, parcelación y diferenciación del sistema visual y que están alteradas por la exposición a etanol podrían, tras la retirada del teratógeno, recuperar su expresión con gran rapidez, al menos parcialmente.

En ejemplares de pez cebra expuestos a dosis bajas de etanol, que no llegan a inducir ciclopia pero sí alteraciones oculares (Dlugos y Rabin, 2007), se han descrito resultados similares a los observados por nosotros. Estas coincidencias

con diferentes tratamientos indican que se puede producir un mecanismo de compensación en etapas tardías. Parece claro, pues, que la plasticidad del sistema visual del pez cebra tras la exposición embrionaria a etanol, constituye a este teleósteo como un buen modelo para testar distintos productos químicos, drogas y nuevos tratamientos farmacológicos que ayuden a definir nuevas dianas moleculares del etanol.

# Conclusiones

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

- I. La exposición a etanol durante el desarrollo induce cambios en los niveles y en los patrones de expresión de los genes implicados en la migración de los progenitores de la placa precordial (*rhoA*, *rnd1*, *rnd1like* y *snail1a*), impidiendo que este proceso suceda con normalidad.
- II. El etanol disminuye la cohesión celular de los progenitores de la placa precordial. Ya que el bloqueo de la traducción de *rnd1* recupera parcialmente este fenotipo, el efecto del etanol podría estar mediado por la sobre-expresión de este gen.
- III. La exposición a etanol conduce a cambios en la expresión de algunos genes que intervienen en la especificación y morfogénesis del sistema visual (*pax6a*, *six3a*, *rx3* y *rx1*).
- IV. Durante la división del campo visual los progenitores retinianos adquieren morfología fusiforme, disponiendo sus dominios apicales hacia la región central del embrión. Este proceso está impedido por la exposición a etanol y podría estar mediado por el descenso en la expresión de *zo1*.
- V. El efecto del etanol sobre la diferenciación del sistema visual de las larvas depende del tipo celular y también de la región, ya que la alteración de los marcadores celulares es diferente en la retina y en el techo óptico. Sin embargo, las alteraciones observadas en este último podrían ser consecuencia de la reducción del número de proyecciones retinotectales.
- VI. Aunque la diferenciación de los centros visuales está retrasada por efecto del etanol, algunos marcadores celulares recuperan patrones de distribución y densidades normales a los 5 dpf.

# Abstract

---



VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA

DEPARTMENT OF CELL  
BIOLOGY AND PATHOLOGY



INSTITUTO DE  
NEUROCIENCIAS  
CASTILLA Y LEÓN

COMPARATIVE  
NEUROBIOLOGY LAB.

DOCTORAL THESIS

Development and differentiation of the optic vesicles in  
normal conditions and in cyclopic models

Adrián Santos Ledo

2011

VNiVERSiTAS  
STVDII  
SALAMANTIiNI  


## INTRODUCTION

The zebrafish provides a good model for studying the development of the visual system of vertebrates. The primordium of the eyes, the eye field, is specified at 8 hours post-fertilisation (hpf) (75% epiboly stage or mid-gastrula) as a single, bilateral domain. The splitting of this domain in two begins at around 11.5 hpf (3 somites stage) and by 13 hpf (9 somites stage) the optic vesicles are evident as flattened lateral evaginations from the prospective diencephalon. The differentiation of the retina starts at around 36/40 hpf, and from 3 days post-fertilisation (dpf) the eyes are fully functional and the retinal layers and the establishment of a topographical map of retinotectal projections is easily observable (Schmitt y Dowling, 1994; Karlstrom *et al.*, 1996). Several studies have shown that zebrafish constitute an effective genetic (Dasmahapatra *et al.*, 2001; Loucks and Carvan, 2004), anatomical (Arenzana *et al.*, 2006b; Blader and Strähle, 1998) and physiological (Bilotta *et al.*, 2002; Bilotta *et al.*, 2004; Matsui *et al.*, 2006) *in vivo* model system for the analysis of the teratogenic effect of ethanol on visual system development.

Early exposure of zebrafish embryos to ethanol results in the impairment of the differentiation of ventral regions of the Central Nervous System (CNS), and as a consequence leads to the incomplete separation of the optic vesicles, a phenotype known as cyclopia (Blader and Strähle, 1998; Arenzana *et al.*, 2006). Nonetheless, the specific effect of the early exposure to ethanol on signaling pathways involved in the differentiation of the visual areas is still un-known. Ethanol not only induces alterations in zebrafish but also in mouse (Hirabayashi *et al.*, 2004) and rat (Crews *et al.*, 2006). Moreover, the consumption of ethanol by pregnant women results in Foetal Alcohol Syndrome (FAS), a syndrome involving complex anatomical and metabolic alterations including visual system alterations (Ribeiro *et al.*, 2007).

Development is a well orchestrated process and appropriate cellular coherence and motility is very important for the cell rearrangements that happen during gastrulation. These processes are controlled by the cytoskeleton (Kai *et al.*, 2008) and also by the activity of the small GTPases Rho and Rnd. These proteins control the establishment of the cellular junctions (Weiser *et al.*, 2009) and the stability of the cytoskeleton (Ridley y Hall, 1992; Nobes *et al.*, 1998). In cell cultures, it has been shown that the GTPases are molecular targets of the ethanol (Guasch *et al.*, 2003; Martínez *et al.*, 2007). Moreover,



some of the proteins involved in cytoskeleton dynamics, such as PKC, present hydrophobic pockets where ethanol can bind and modify the activity of the protein (Slater *et al.*, 2003). Other proteins involved in the migration of the prechordal plate that also control cytoskeleton rearrangements are the Snail family of transcription factors. Loss of function of *snail* leads to altered migration of the prechordal plate similar to the phenotype observed after ethanol exposure (Blanco *et al.*, 2007).

One of the most severe phenotypes induced by ethanol exposure is cyclopia. Some authors have proposed that the cyclopia is a secondary effect of the aberrant migration of the prechordal plate which never reaches the animal pole of the embryo (Blader and Strähle, 1998). Indeed, defective cell movements during gastrulation have often been found associated with cyclopic phenotypes (Rebaglianti *et al.*, 1998; Gritsman *et al.*, 1999). Other authors have postulated that specific effects cannot be ruled out (Loucks *et al.*, 2007).

The splitting of the eye field is a complex process that leads to the formation of two lateral optic anlagen from a single domain. How this happens is poorly understood, but it has been proposed that the surrounding tissues (telencephalon and diencephalon) generate forces that displace the retinal progenitor cells (England *et al.*, 2006). Retinal progenitors have also been proposed to actively move towards more lateral positions during morphogenesis (Rembold *et al.*, 2006). Both, passive forces and active movements, seem to play an important role in the splitting of the eye field and lack of them could lead to anophthalmia (Rembold *et al.*, 2006). There are several zebrafish mutants in which the evagination of the eye field starts but the optic vesicles never separate and remain fused, leading to cyclopic phenotypes. Some of these mutants present mutations in components of the TGF $\beta$  pathway, such as Cyclops (*cyc*) (Sampath *et al.*, 1998), Squint (*squ*) (Feldman *et al.*, 1998) or One-eyed pinhead (*oep*) (Hammerschmidt *et al.*, 1996). Some others are independent to this pathway, for example Silberblick (*sbl*), which encodes to Wnt11 (Heisenberg *et al.*, 2000) or Trilobite (*tlb*) which encodes to VgL2 (Hammerschmidt *et al.*, 1996).

There is more than one mechanism involved in cyclopia. Zebrafish mutants with similar defects during gastrulation lead to this phenotype by different mechanisms (England *et al.*, 2006). In *cyc* mutants, the eye field is properly specified but the hypothalamus is absent. This fact impairs cell movements within the telencephalon and the diencephalon which, eventually, results in the region between both optic vesicles not

receiving the signals required to acquire proximal (optic stalk) fates, and remains as retina. In *sbl* mutants, the hypothalamus is specified but the movement of the neural keel is much reduced and the hypothalamic and optic stalk cells remain in a posterior and medial position instead of moving anteriorly.

The analysis of the cyclopic phenotype is very difficult since the mutants not only have problems in the separation of the optic vesicles but also in the establishment of the antero-posterior axis. In fact, mutations in some genes such as *six3* or *zic2* which are involved in body patterning lead to similar phenotypes both in humans and zebrafish. These phenotypes include holoprosencephaly, a phenotype where the two brain hemispheres do not split properly and can also include cyclopia (Brown *et al.*, 1998; Wallis *et al.*, 1999; Domené *et al.*, 2008; Sanek *et al.*, 2009). Nonetheless, the role of these genes during the splitting of the eye field has not been deeply studied. Moreover, if these genes are involved in the ethylic teratology remains un-clear.

The effect of exposure to ethanol has been studied, overall, from 48 hpf onwards. It has been shown that the effect of ethanol on the zebrafish visual system depends on several factors: strain, sex, dose and time of administration (Arenzana *et al.*, 2006a; Blader and Strähle, 1998; Dlugos *et al.*, 2010; Gerlai *et al.*, 2008; Kashyap *et al.*, 2007), producing a wide range of effects. Previous work by our group demonstrated that ethanol produces a delay in the lamination of the retina and the optic tectum (OT) in cyclopic larvae at 3 dpf (Arenzana *et al.*, 2006a) that could be related with the alterations in the processing of visual information previously described (Bilotta *et al.*, 2004). It has been also shown that the effect of ethanol is different on each retinal cell type (Matsui *et al.*, 2006; Kashyap *et al.*, 2007) and includes a reduction of the proliferation rate (Guizzetti *et al.*, 1997) and an increase of the apoptosis (Carvan *et al.*, 2004). Nonetheless, the progression of the differentiation of the visual areas in the cyclopic larvae has not been studied and it is un-clear whether this process can partially recover at later stages. Morphology and gene expression patterns of cyclopic zebrafish larvae at late development stages have not been analysed and might be useful to further the knowledge of the effects of ethanol in visual system development.

In this work, we studied the teratogenic effects of ethanol exposure on the cytoarchitectonic and neurochemical differentiation of the zebrafish visual pathway at three different moments: gastrulation, splitting of the eye field and visual system differentiation. We have used this approach in the cyclopic zebrafish visual system to

provide valuable neuroanatomical data regarding the nature of teratogenic and neurotoxic effects of ethanol. We propose some targets of ethanol and some altered mechanisms that can be applied to all teratogenic models.

# OBJECTIVES

The general objective of this work is to contribute to the study of the teratogenic effects of ethanol during embryonic development. Ethanol effect is cell-type selective but also disrupts different processes depending on the developmental stage. For this reason, our particular objectives will focus on the different effects of ethanol in three different moments of the visual system development.

## 1. During gastrulation:

1.1 To analyse the expression patterns of makers of the prechordal plate and quantify the delay induced by exposure to ethanol.

1.2 To analyse the expression patterns and levels of the proteins involved in cell adhesion during gastrulation.

1.3 To carry out a quantitative analysis of cell adhesion within the prechordal plate.

## 2. During the splitting of the eye field:

1.1 To examine the expression patterns of the genes involved in the morphogenesis and the splitting of the eye field after exposure to different ethylic concentrations.

1.2 To check the cell rearrangements and cell polarity alterations induced by ethanol exposure within the eye field.

## 3. During retinal differentiation:

3.1 To check retinal patterning and the first steps of retinal differentiation in control and exposed conditions.

3.2 To analyse the effect of ethanol on optic nerve formation and projection into the optic tectum.

3.3 To quantify the progression of the differentiation in the retina.

3.4 To quantify the progression of the differentiation in the optic tectum.

## MATERIALS AND METHODS

Most of the experiments were carried out in AB strain zebrafish embryos. They were staged and reared according to standard procedures (Westerfield, 1995). We have also used some transgenic lines reared at University College London (UK), as part of a collaboration with Prof. Steve Wilson and Prof. Masazumi Tada .

All procedures and experimental protocols were in accordance with the guidelines of the European Communities Directive (86/609/EEC and 2003/65/EC) and the current Spanish legislation for the use and care of animals in research (RD 1201/2005, BOE 252/34367-91, 2005) and conformed to NIH guidelines.

Embryos were treated following the protocol previously described (Arenzana *et al.*, 2006; Loucks *et al.*, 2007), where a dose-dependent response of ethanol was assessed. Embryos were exposed to different concentrations of ethanol during different periods of time.

1. For the experiments carried out during gastrulation, embryos were treated with different ethylic concentrations (0.5%, 1%, 1.5%, 2% and 2.4%) from 50% epiboly (early gastrulation) to tailbud (100% epiboly, late gastrulation). Embryos were collected at 75% epiboly (mid-gastrulation) and tailbud.
2. To analyse the splitting of the eye field, embryos were exposed to different ethylic concentrations (0.5%, 1%, 1.5%, 2% and 2.4%) from dome/30% epiboly (late blastula) to tailbud. Embryos were collected at 3 (11 hpf, onset of eye morphogenesis), 6 (12 hpf, mid-eye morphogenesis), 10 (14 hpf, finish of eye morphogenesis/onset of eye vesicle stage) and 18 somites (18 hpf, optic cup stage).
3. To examine the effects in the differentiation of the visual system, embryos were exposed to 1.5% ethanol from dome/30% epiboly to 24 hpf. Just cyclopic embryos were collected at 48 hpf, 3 and 5 dpf.

Un-treated embryos were used as control specimens.

To assess the different objectives we used several experiment procedures that include:

1. Morpholino injection.
2. Semithin sections stained with toluidine blue and transmission electron microscopy.
3. Wholemount *in situ* hybridisation using riboprobes (HIS).

4. *In toto* immunohistochemistry.
5. Immunohistochemistry in cryo-sections.
6. BrdU incorporation assays.
7. Quantitative Real Time PCR.
8. Image analysis using different types of microscopy.

We also carried out different quantitative measurements using either Volocity (Imporvision) or ImageJ programs and Prism 4.0 (GrapPad) for the statistical analysis:

1. Migration of the prechordal plate using *hlx1* as specific marker in embryos un-treated and exposed to ethanol and also in *rnd1* and *rnd1like* morphants.
2. Distance between the cells of the prechordal plate in embryos un-treated and exposed to ethanol and also in *rnd1* morphants.
3. Quantification of the number of positive cells for different markers in the visual areas. As the visual areas of cyclopic embryos were smaller than in control animals, retinal and tectal surfaces were measured. Most of the data were expressed as density (cells per surface unit).

## RESULTS

### Effects of ethanol during gastrulation

As already described using other fish strains (Blader and Strähle, 1998), migration of the prechordal plate in AB embryos is delayed upon ethanol exposure (Fig. 1c, d). Exposure to ethanol induced the expansion of *hgg1*, a specific marker of the anterior prechordal plate, but the expression of *ntl* (notochord) remained un-altered (Fig. 1a, b).

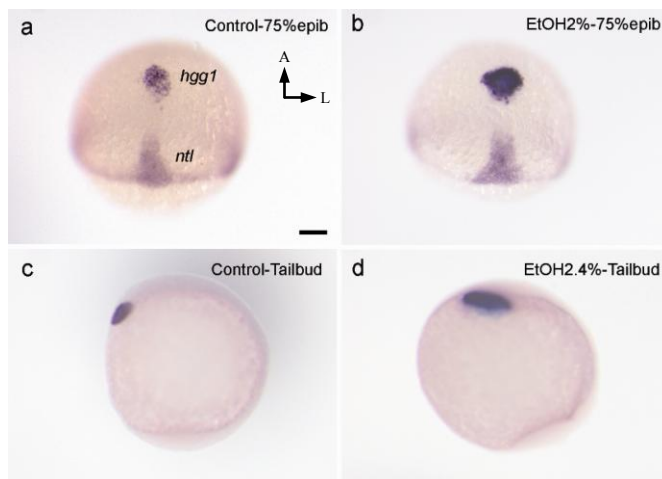
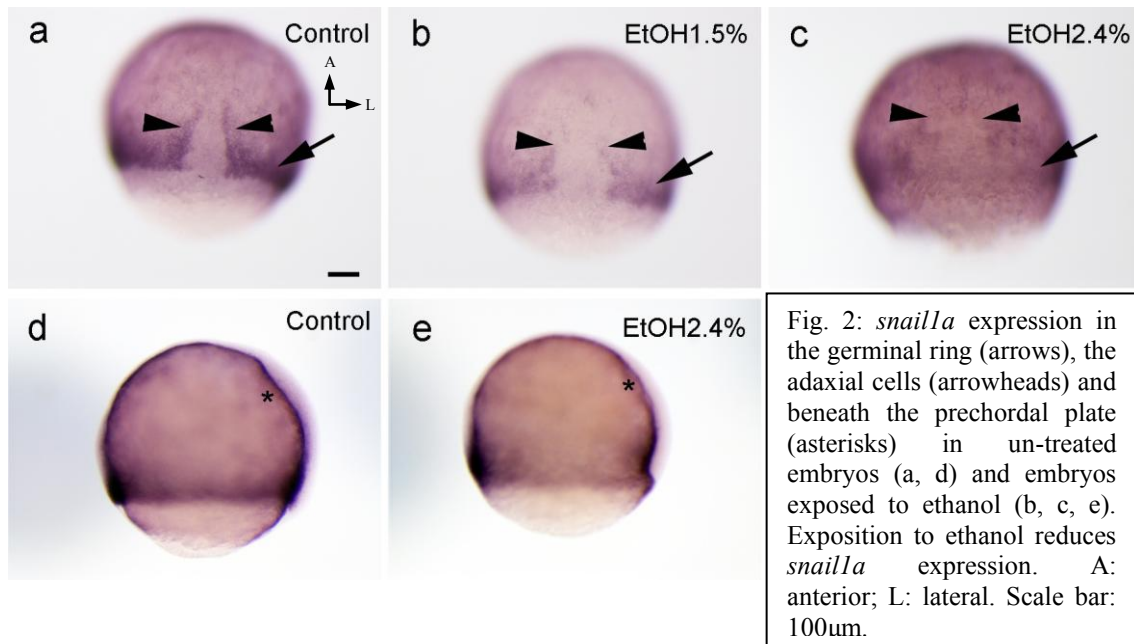


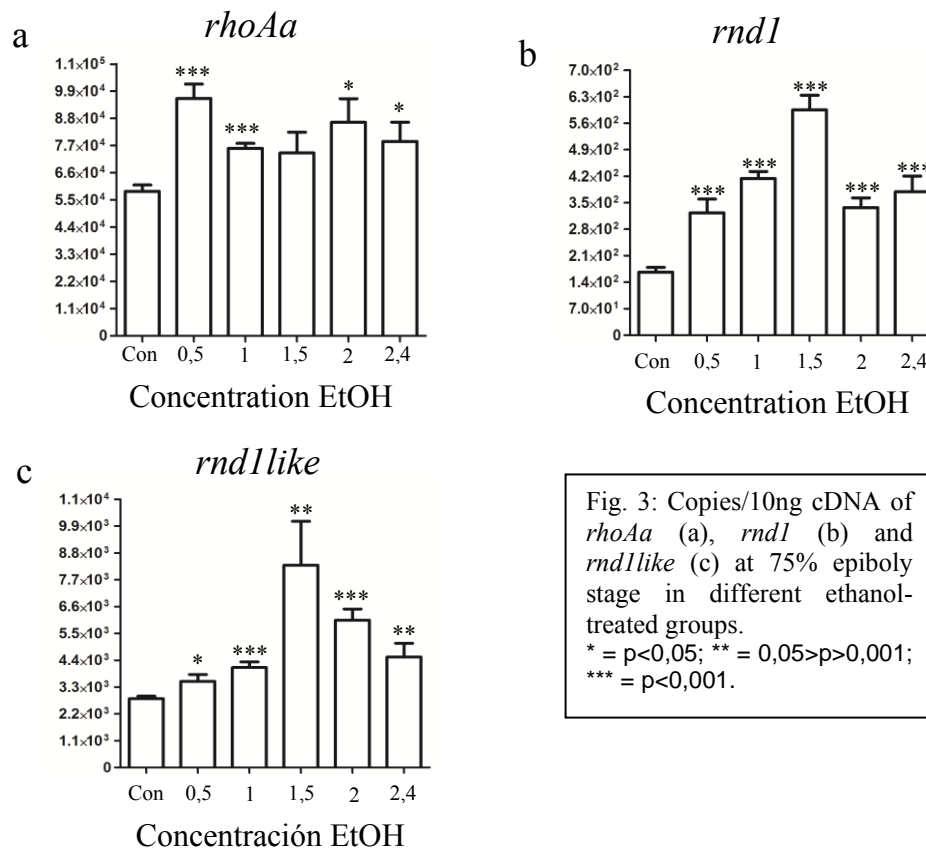
Fig. 1: Expression of *hgg1* and *ntl* in control animals (a, c) and embryos exposed to ethanol (b, d). A: anterior; L lateral. Scale bar: 100 $\mu$ m.

Previous reports have shown the importance of *snail1a* for a correct migration of the prechordal plate (Blanco *et al.*, 2007), so we analysed its expression at mid-gastrula stage. In control embryos *snail1a* was expressed in the germinal ring, the adaxial cells (Fig. 2a) and in a subset of cells that migrate beneath and ahead of the prechordal plate (Fig. 2d). Ethanol exposure reduced the expression of *snail1a* in all the domains in a dose-dependent manner: the reduction was more important in those embryos exposed to 2.4% of ethanol (Fig. 2b, c, e).

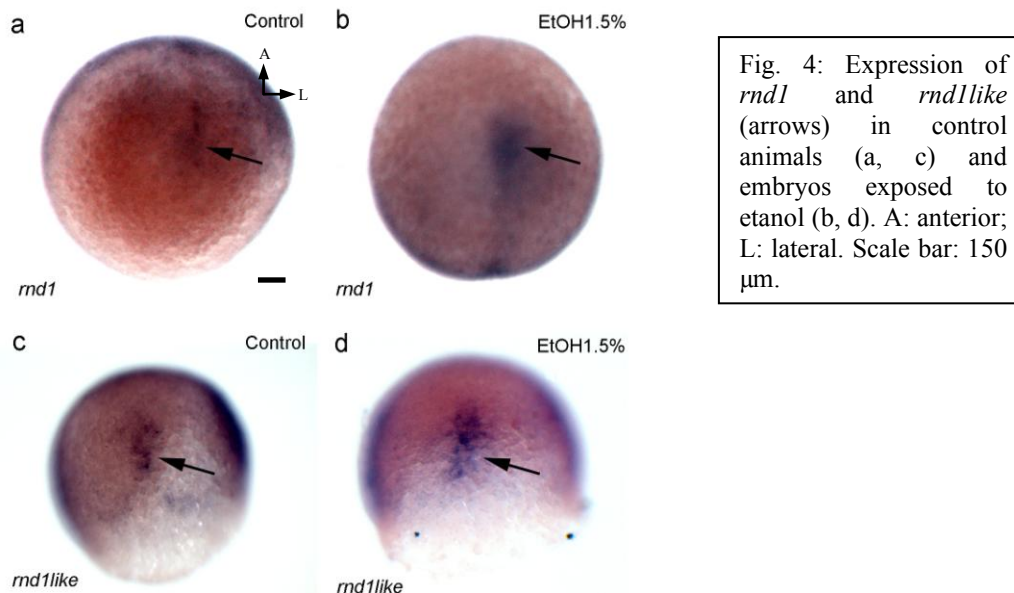


Small GTPases are very important during the migration of the prechordal plate (Matsui *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2006). Among them, RhoA is either up-regulated or down-regulated by ethanol depending on the cell type (Guasch *et al.*, 2003; Joshi *et al.*, 2006), and some of the GTPases antagonists are also down-regulated by exposure to ethanol. We wondered if the expression of *rhoA* and their antagonists *rnd1* and *rnd1like* was also modified *in vivo*. We quantified their expression levels at mid-gastrulation, when the prechordal plate is supposed to reach the animal pole by QRT-PCR. Ethanol exposure significantly increased the expression of *rhoA*, *rnd1* and *rnd1like* (Fig. 3). Moreover, the up-regulation of *rnd1* and *rnd1like* is dose-dependent.



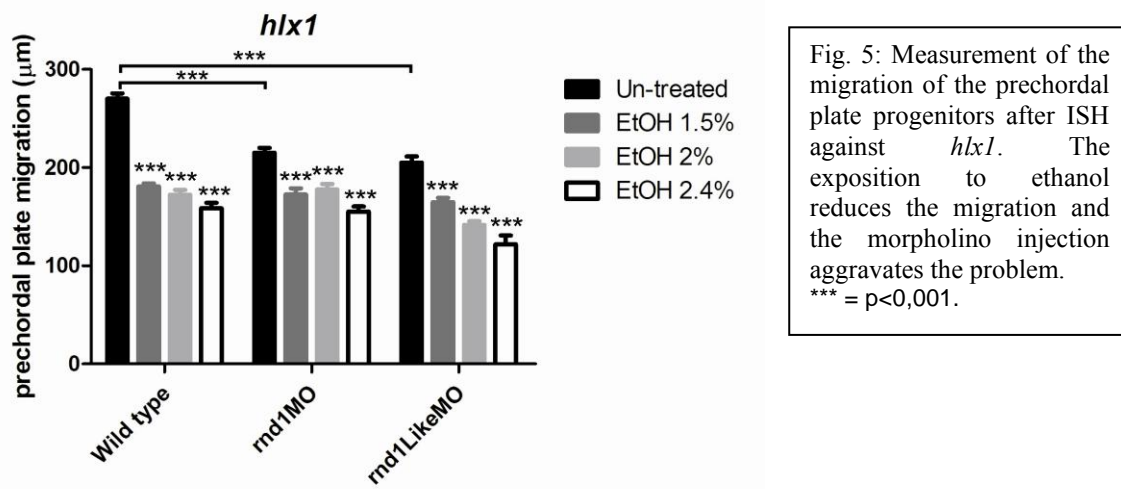


Then, we analysed the expression patterns of the GTPases *rnd1* and *rnd1like* by ISH. They were expressed in the prechordal plate and in the notochord (Fig. 4a, c). We observed an up-regulation of its expression after exposure to ethanol (Fig. 4b, d).



These results suggest that the problems in the migration of the prechordal plate in ethanol exposure conditions may be due to altered expression levels of GTPases. To test this hypothesis, we blocked the translation of these proteins by morpholino injection in

ethanol treated embryos. We reasoned that if our hypothesis was correct, the defect in migration promoted by ethanol exposure should be alleviated by morpholino injection. However, this was not the case. We carried out an ISH against *hlx1*, a specific marker of the posterior prechordal plate that allowed us to measure the distance migrated by these cells. As expected, exposure to ethanol led to reduced migration (Fig. 5). Rather than alleviate this phenotype, injection of one morpholino at a time followed by ethanol treatment exacerbated the phenotype (Fig. 5), and the injection of both morpholinos together produced the death of the embryos at the beginning of the gastrulation.



Prechordal plate migration is determined by different factors such as motility, persistence and coherence (Kai *et al.*, 2008ref). It is likely that ethanol alters these parameters by different mechanisms. We made use of the transgenic line Tg{Gsc:GFP}, which labels all prechordal plate cells, to measure the distance between cells in different conditions, as an indication of cohesion in this territory. After exposure to ethanol prechordal plate cells were more separated. Injection of *md1MO* did not affect the distance between cells but when the morpholino injected embryos were exposed to ethanol we observed a significant reduction of the distance between cells as compared to un-injected ethanol exposed embryos (Fig. 6).

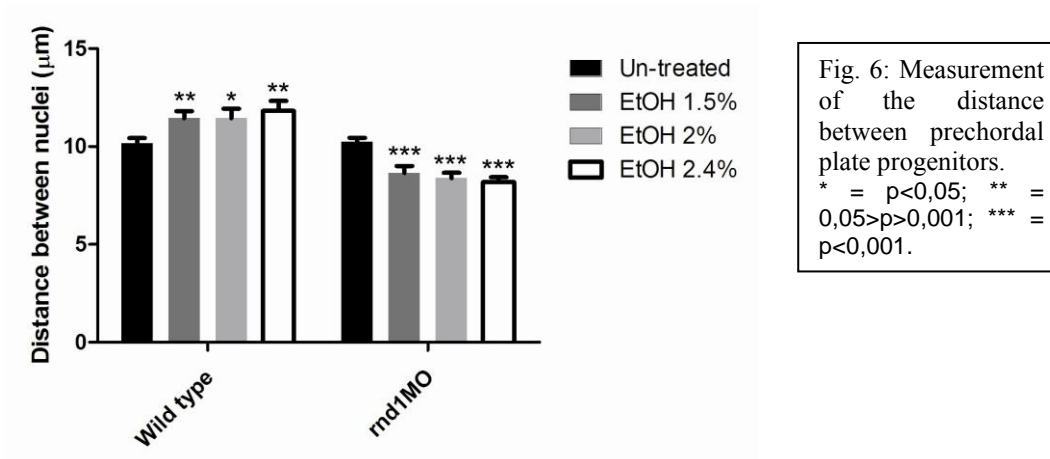


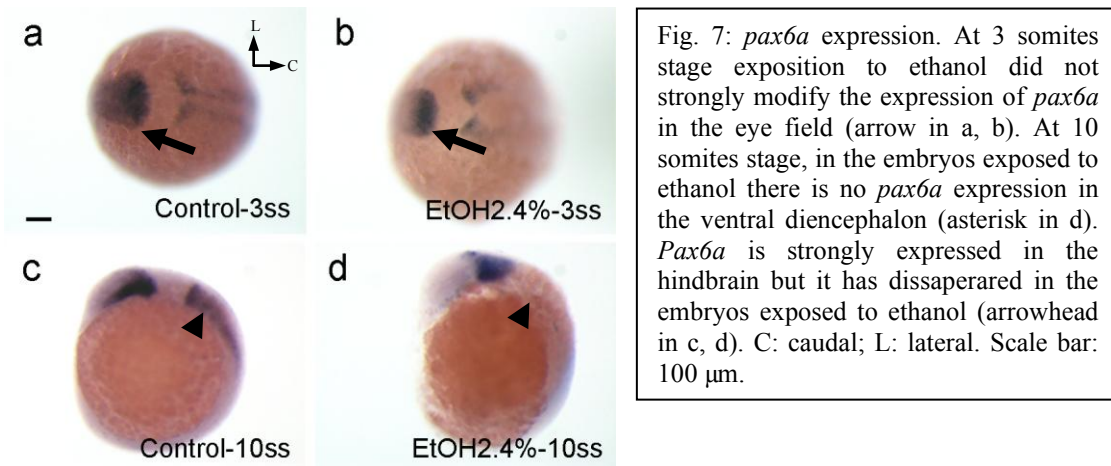
Fig. 6: Measurement of the distance between prechordal plate progenitors. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $0,05 > p > 0,001$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

## Effects of ethanol in the splitting of the eye field

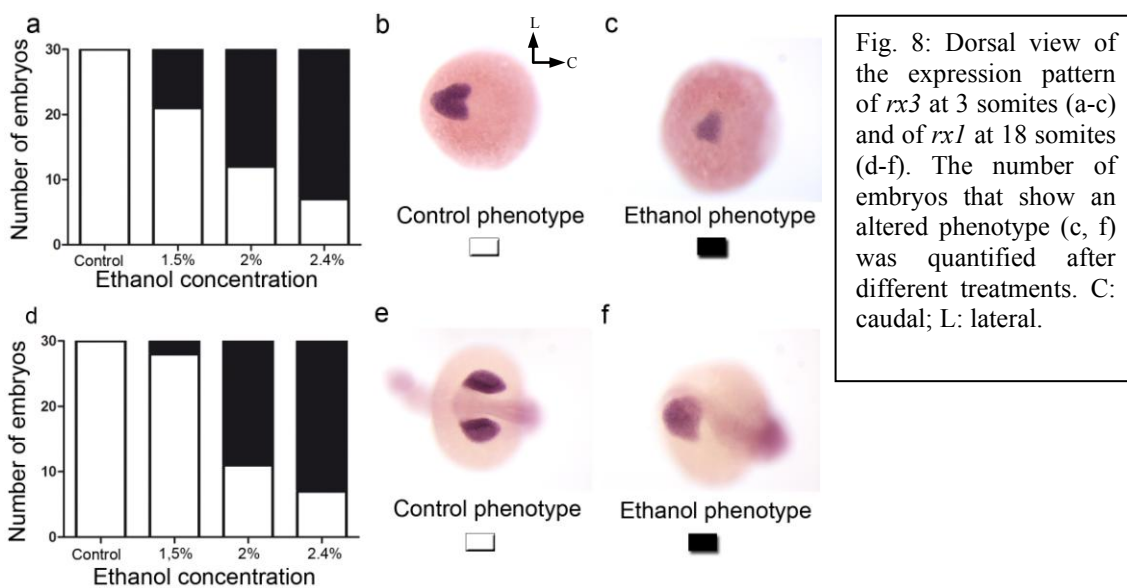
One of the most conspicuous phenotypes induced by ethanol exposure is cyclopia, although it is un-clear whether this phenotype is a secondary effect of the failure in the migration of the prechordal plate or a direct effect of the exposure to ethanol.

We analysed the expression pattern of genes involved in the morphogenesis and the splitting of the eye field. Amongst them, *zic2*, *six3* and *pax6* have been associated with cyclopic phenotypes and *rx3* with anophthalmic phenotypes. The effect of ethanol exposure in their expression is different. Whereas, ethanol down-regulates the expression of *rx3*, *six3* and *pax6*, the only effect observed on *otx2* and *zic2* expressions were a delay and a slight expansion of their domains, which was recovered at 10 somites stage.

*Pax6a* is a transcription factor involved in the development of the visual system from eye field establishment to retinal differentiation (Zaghloul y Moody, 2007). During the splitting of the eye field it is down-regulated in the eye field but remains in the diencephalon, which migrates beneath this domain (Fig 7a, c). Ethanol exposure did not produce important alterations in the expression of *pax6a* in the eye field (Fig. 7b, d), although the diencephalon did not properly migrate in these conditions. At 10 somites stage, the strong expression of *pax6a* normally observed in the hindbrain and the tail (Fig. 7c) was lost after ethanol exposure (Fig. 7d).



*rx3* is expressed in the eye field and diencephalon during the splitting but then its expression is replaced by *rx2* and *rx1*. The number of affected embryos is very variable after ethanol exposure. At 3 somites stage, *rx3* is expressed in a bi-lobulated domain with a caudal indentation (Fig. 8b). This shape was not observed after exposure to ethanol (Fig. 8c). The numbers of embryos that showed this altered phenotype increased in a dose-dependent manner (Fig. 8a). The altered expression pattern and the proportion of embryos that showed it were maintained at 6 and 10 somites. We obtained similar proportions of affected embryos with *rx1* at 18 somites (Fig. 8d-f).



The expression pattern of *six3a* also presented differences after exposure to ethanol. At 3 somites, this transcription factor is expressed in the most anterior part of the embryo, including the eye field (Fig. 9b). Embryos exposed to ethanol showed an aberrant pattern expression in similar proportions as the ones described for *rx3* (Fig. 9a, c). At 18 somites, *six3a* was expressed in the optic cup, the optic stalk and the anterior part of the hypothalamus (Fig 9e). After exposure to ethanol, we detected a down-

regulation of *six3a* expression in the optic cup but the expression in the optic stalk remained un-altered (Fig. 9f). The quantification gave us similar results as in previous stages (Fig. 9d),

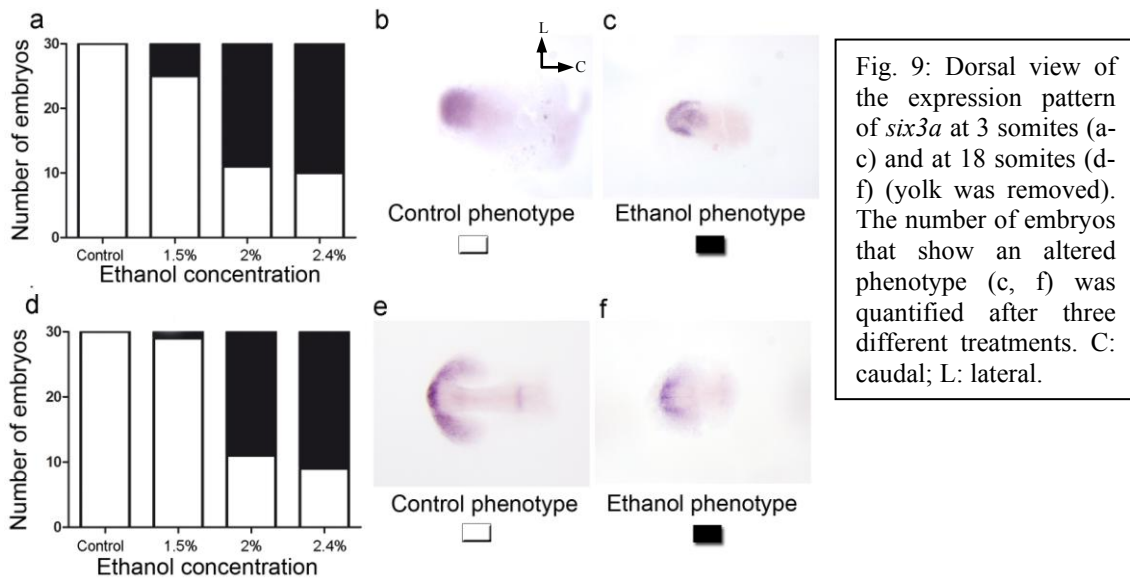


Fig. 9: Dorsal view of the expression pattern of *six3a* at 3 somites (a-c) and at 18 somites (d-f) (yolk was removed). The number of embryos that show an altered phenotype (c, f) was quantified after three different treatments. C: caudal; L: lateral.

We were also interested in analysing the changes in cellular arrangements that accompany eye field splitting. We obtained semi-thin sections from un-treated embryos and embryos exposed to different concentrations of ethanol. At 3 somites stage the retinal progenitors in the eye field had rounded morphology (Fig. 10a) that, at 6 somites changed to fusiform (Fig. 10b). Later on, the elongated morphology is even more evident (Fig. 10c). At 18 somites stage, the formation of the optic cup is well advanced (Fig. 10d). In the embryos exposed to ethanol, the change in shape of the eye field cells was not evident (Fig. 10e, f). At 10 somites stage some of them eventually elongate but not in an organised pattern (Fig. 10g). At the last stage analysed there was no evidence of the splitting of the eye field and the optic vesicles remained fused just in the midline (fig. 10h).

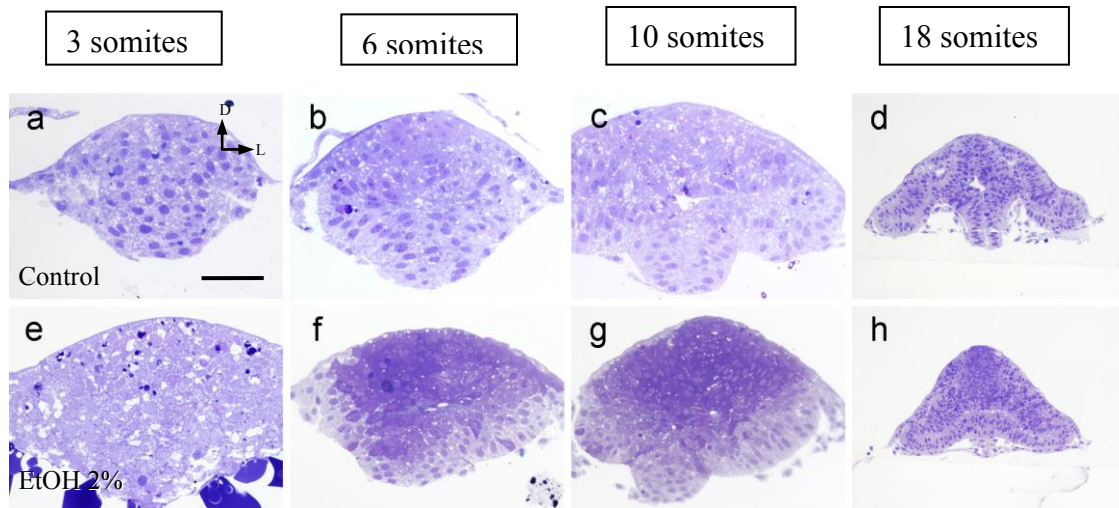


Fig. 10: Frontal view of the eye field at different stages. A progressive change in morphology was observed in control animals. The cell shape was altered in the embryos exposed to ethanol; most of the cells did not change from rounded to fusiform shape. In embryos exposed to ethanol, eventually two optic cups form but remained fused in the midline. D: dorsal; L: lateral. Scale bar: 50µm.

In the next figure the differences between the cell shapes can be better observed at two different stage s. Most of the retinal progenitors have an elongated shape at 10 somites stage (Fig. 11a) and also at 18 somites, when the formation of the lens could be observed (Fig. 11b). In the embryos exposed to ethanol cells were smaller and not all of them elongate (Fig. 11c), showing a round un-polarised appearance even at 18 somites stage (Fig. 11d).

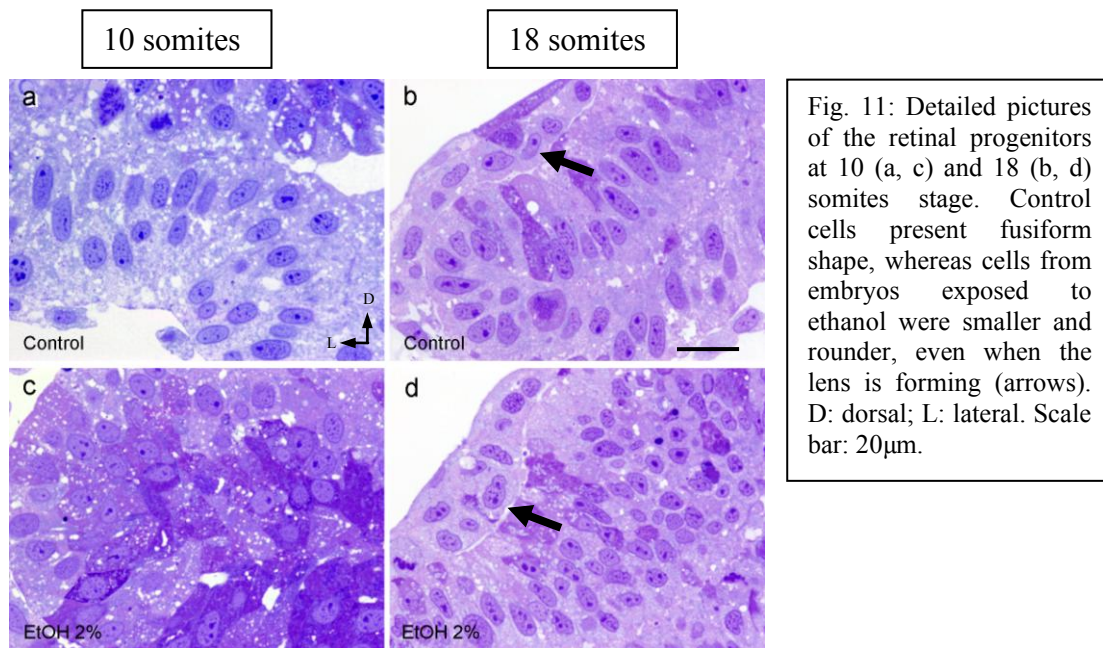


Fig. 11: Detailed pictures of the retinal progenitors at 10 (a, c) and 18 (b, d) somites stage. Control cells present fusiform shape, whereas cells from embryos exposed to ethanol were smaller and rounder, even when the lens is forming (arrows). D: dorsal; L: lateral. Scale bar: 20 $\mu$ m.

We also analysed the eye field using electron microscopy at 10 somites stage (Fig. 12). In control animals, retinal progenitors showed an epithelial aspect with many matured junctions between them, there was almost no space between retinal progenitors (Fig. 12a). The nuclei were located in the apical part of the cell and were also elongated. Cytoplasm was full with ribosomes. After exposure to ethanol, the nuclei of the retinal progenitors had more rounded but the cell had partially elongated (Fig. 12b). These cells did not have so many ribosomes but they had many vacuoles and mitochondrias with abnormal shapes. In the apical domain of the cells, there were cell junctions but miss-located and immature, therefore cells did not present an epithelial aspect so clear as in control animals

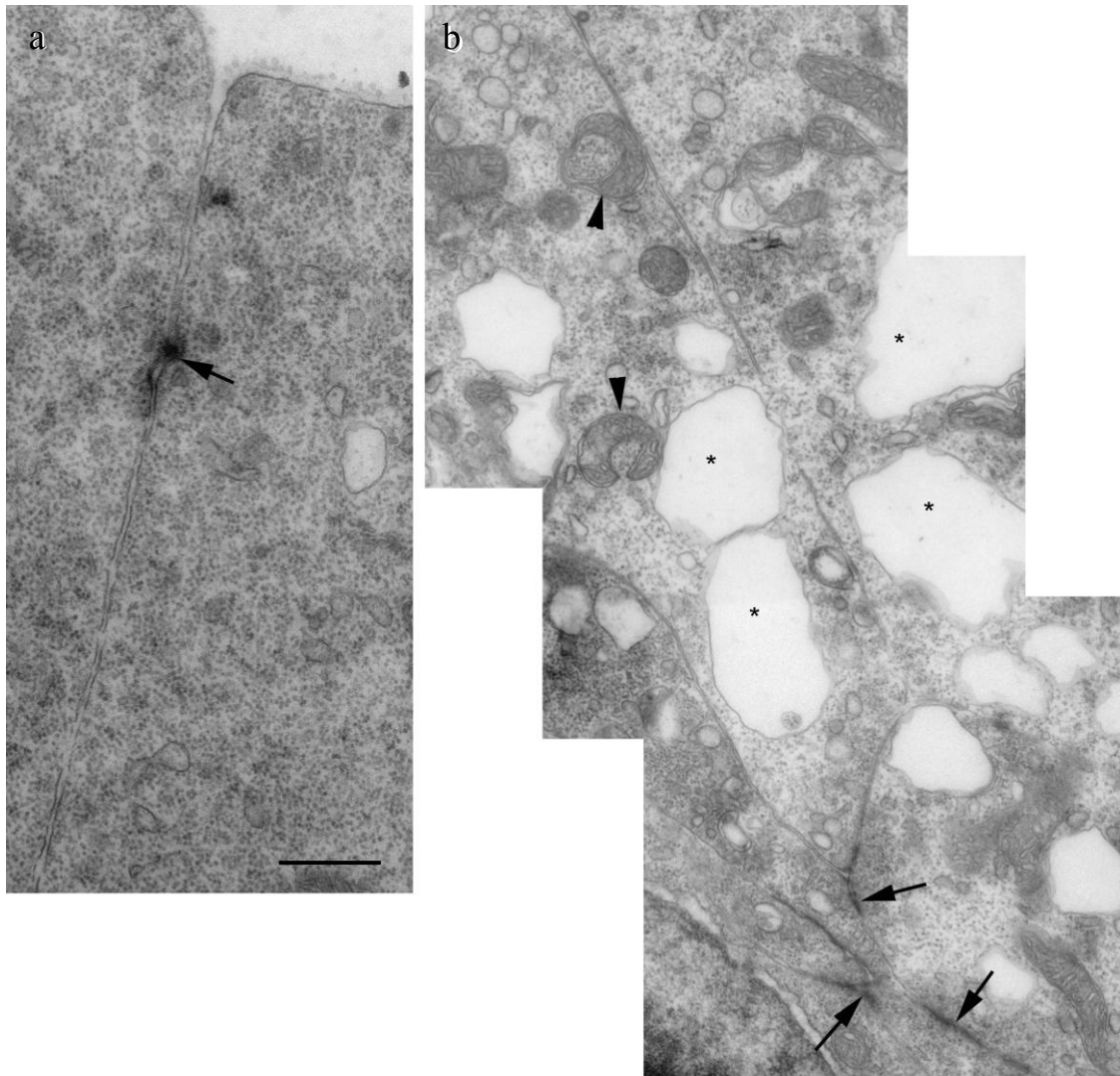


Fig. 12: Electron microscopy pictures of control (a) and ethanol-treated (b) embryos. In control animals, the retinal progenitors had matured cell junctions (arrow in a) and many rybosomes. After exposure to ethanol, retinal progenitors present mitochondrias with weird shapes (arrowhead in b), many vacuoles (asterisks in b) and also miss-located cell junctions (arrows in b). Scale bar: 500nm.

Then, we checked the distribution of Zo1 protein by immunohistochemistry and its expression levels by QRT-PCR. Zo1 is a typical marker of the apical domain of the cells and provides useful information about cell and tissue polarity. Control embryos showed a perfect orientation of eye field cells with their apical domains towards the central part of the embryo from 6 somites stage onwards (Fig. 13a). Embryos exposed to ethanol not only showed a mis-location of Zo1 protein (Fig. 13b) but also a down-regulation of its expression in a dose dependent manner (Fig. 13c).



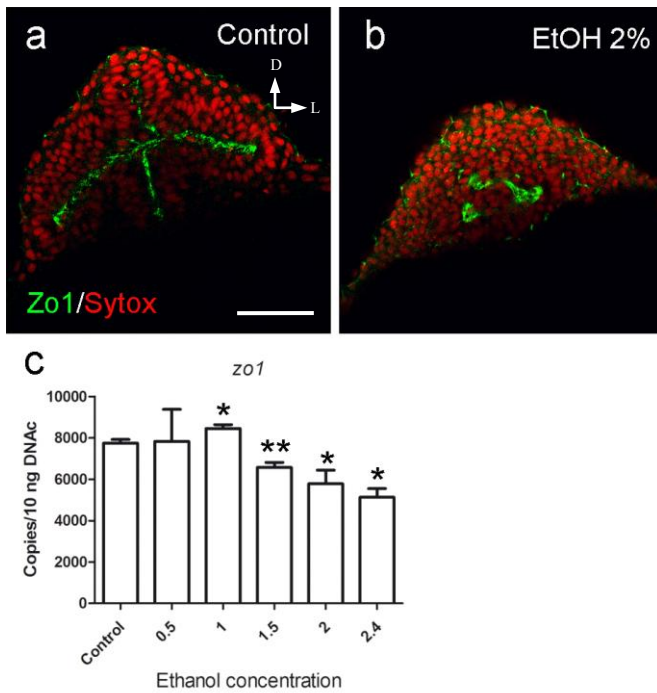


Fig. 13: Distribution of Zo1 at 10 somites stage in control animals (a) and embryos exposed to 2% of ethanol (b). Retinal progenitors showed a perfectly polarized shape towards the central part of the embryo just in control animals. The expression of zo1 is down-regulated by exposition to ethanol in a dose-dependent manner (c). D: dorsal; L: lateral. Scale bar: 50 $\mu$ m. \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $0,05 > p > 0,001$ .

## Differentiation of the visual areas in cyclopic embryos

We wondered if the visual areas differentiated properly even when the optic vesicles remain fused and despite of the lack of side effects of the exposure to ethanol. We analysed the distribution pattern of the bHLH proneural factor *Ath5* (*atoh7*) which is expressed by the RPCs committed to differentiation. *Ath5* expression starts at 28/30 hpf and spreads as a wave throughout the retina promoted by *Shh*. Since cyclopic embryos present a delay in their development we analysed *Ath5* expression at 60 hpf in a transgenic line (*ath5:GFP*). At this stage, *Ath5* is present throughout retina in the prospective GCL of control animals (Fig. 14a). In cyclopic embryos is present in both hemi-retinas in the cyclopic embryos (Fig. 14b) but does not fully spread. In these embryos it is also expressed in the region where eyes fuse (Fig. 14b). These results suggest a delay in the onset of the retinal differentiation.

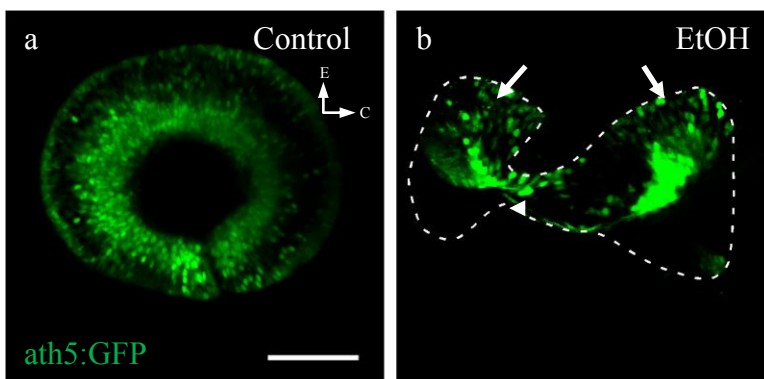
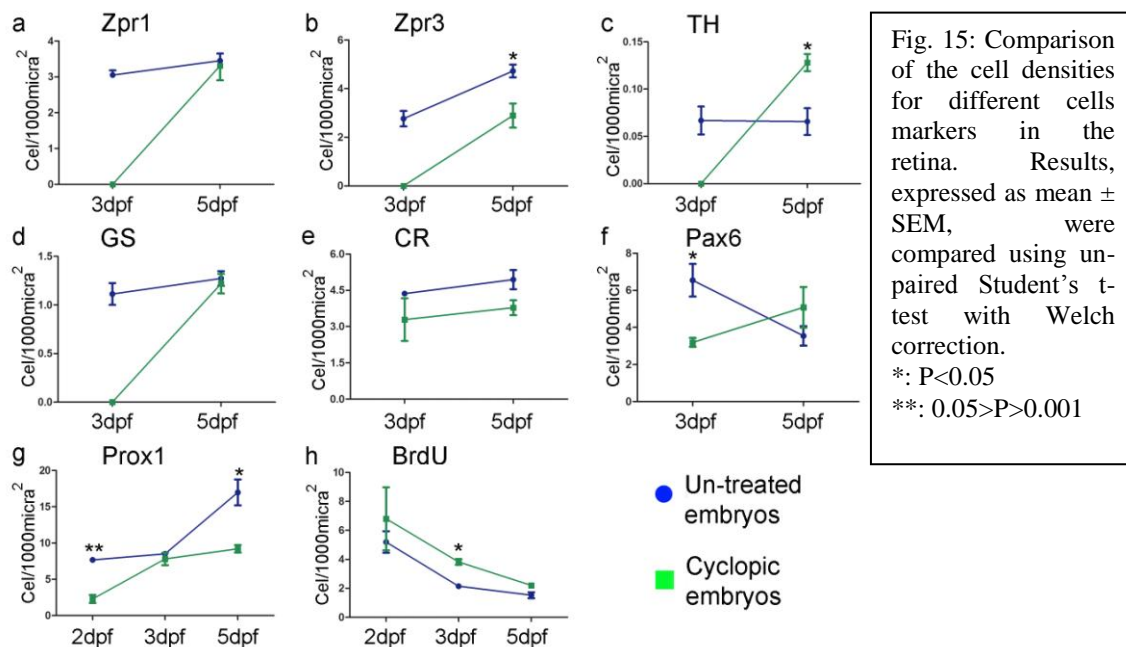


Fig. 14: Distribution of *Ath5* at 60 hpf in control animals (a) and cyclopic embryos (b). In the latter group, *Ath5* is only present in the central part of both hemi-retina (arrows in b) and in the region where eyes fuse (arrowhead in b). C: caudal; E: scleral. Scale bar: 50 $\mu$ m.

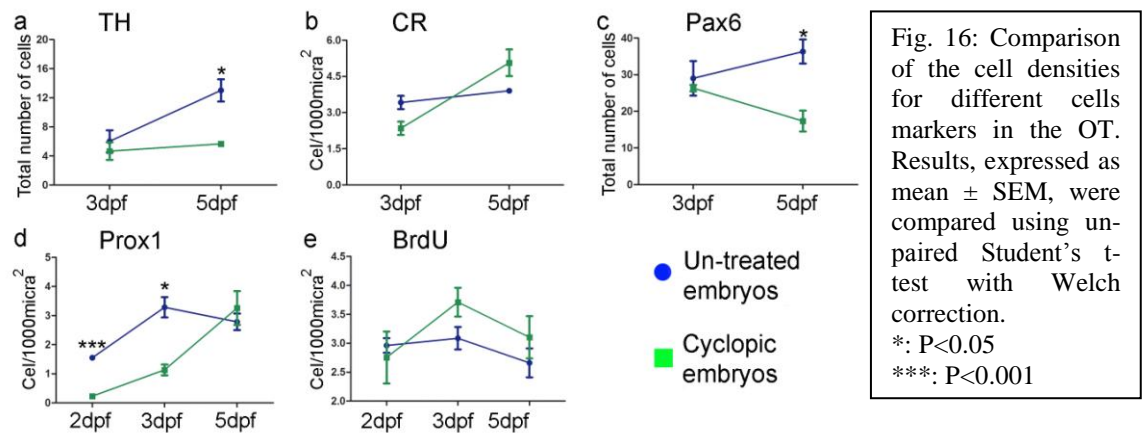
In order to study the progression of visual system maturation we performed BrdU incorporation experiments to analyse the proliferation and immunohistochemistry against several transcription factors involved in visual system differentiation. We also quantified the number of positive cells for each marker in the retina (Fig. 15) and OT (Fig. 16).

Within the retina not all the transcription factors were affected in the same way. Zpr1 (cones) (Fig. 15a) and GS (Müller cells) (Fig. 15d) just presented a delay but at 5 dpf the density of positive cells was similar between both groups. The cell density for Zpr3- (rods) (Fig. 15b), CR- (cells in the INL and the GCL) (Fig. 15e) and Prox1- (cells in the INL and the GCL) (Fig. 15g) positive cells was reduced in all the stages, even at 5 dpf. TH- (cells in the INL) (Fig. 15c) and Pax6- (cells in the INL) (Fig. 15f) positive cells showed a greater cell density in cyclopic embryos as compared to control ones.



Only one thin optic nerve left the cyclopic retina and the OT presented fewer projections within it. Therefore, we also analysed the differentiation and the BrdU incorporation at different stages in the OT. As in the retina, not all the markers were affected in the same way. Moreover, some of them presented differences from the data observed in the retina. The density of TH- (Fig. 16a) and Pax6-positive cells (Fig. 16c) was similar in cyclopic and control embryos at 3 dpf, but they were reduced at 5 dpf. There were no significant differences in the density for CR-positive cells at any of the stages analysed (Fig. 16b). Prox1-positive cells just presented higher densities in control

animals at 2 and 3 dpf (Fig. 16d) but, at 5 dpf, the cell density is similar between both groups. There were no significant differences in the levels of BrdU incorporation (Fig. 16e).



# DISCUSSION

## Effects of ethanol during gastrulation

Ethanol-induced cyclopic embryos, as other cyclopic models such as *cyc* or *sbl*, present problems during the migration of the progenitors of the prechordal plate (Hatta *et al.*, 1994; Heisenberg and Nuüsslein-Volhard, 1997; Blader and Strähle, 1998). We have described an expansion of the prechordal plate domain and a great delay in its migration just after two hours of exposure. Moreover, the alterations in the migration are dose-dependent.

Many genes have been shown to be down-regulated by ethanol during gastrulation, such as *six3*, *shh*, or *rx3* (Blader and Strähle, 1998; Loucks *et al.*, 2007), and here we describe an up-regulation of rhoGTPases associated to ethanol treatments. To our knowledge, this is the first time that a dose-dependent up-regulation in these conditions is described. Although there are not many studies addressing the role of these GTPases *in vivo*, they have been shown to be important regulators during zebrafish gastrulation (Weiser *et al.*, 2009). More information can be obtained from cell cultures, where it has been shown that RhoA increases cell adhesion and can be either up-regulated (Guasch *et al.*, 2003) or down-regulated (Joshi *et al.*, 2003) by exposure to ethanol depending on the cell type. Ethanol can also up-regulate antagonists of RhoA (Guasch *et al.*, 2007), inducing the loss of cell adhesion.

We have shown that *rhoA*, *rnd1* and *rnd1like* are up-regulated after ethanol exposure. It has been previously shown that the up-regulation of *rhoA* during zebrafish development could lead to cyclopic phenotypes (Weiser *et al.*, 2009) and the up-regulation of *rnd1* during gastrulation in *Xenopus* leads to problems similar to those described here (Wünnenberg-Stapleton *et al.*, 1999). These results could be contradictory since these two GTPases are antagonists (Nobes *et al.*, 1998). Nevertheless, both of them are involved in cytoskeleton dynamics. Moreover, the changes in *rnd1* expression could be more important because it is an actively constitutive GTPase, whereas RhoA presents several other regulators (reviewed in Wennerberg and Der, 2004). We have also described the dose-dependent down-regulation of *snail1a*, a transcription factor involved in the guidance of the prechordal plate. Our results agree with previous reports where a down-regulation of *snail1a* induces an expansion of *hgg1* expression (Blanco *et al.*, 2007, Liu *et al.*, 2009).

We have shown that the down-regulation of *rnd1* and *rnd1like* does not rescue the

phenotype induced by ethanol and it even produces a greater delay in prechordal plate migration during gastrulation. When we focus on the distance between nuclei, cell distance increases in a dose-dependent manner after exposure to ethanol, leading to the spread phenotype observed upon *hgg1* analysis, and suggesting an effect on cell cohesion of ethanol treatments. Morpholino injection partially suppresses the effect of ethanol treatment on cell distance, suggesting that the effect of ethanol in cell distance/coherence may be mediated by *rnd1*.

*rnd1*, *rnd1like* and *snail1* are negative regulators of E-Cadherin (Cdh1) (Blanco *et al.*, 2004; Ogata *et al.*, 2007). Although our data are preliminary, we have described an up-regulation of *rnd1/like* and a down-regulation of *snail1a* by ethanol. These results lead us to hypothesize that ethanol, within the prechordal plate, up-regulates *rnd1* and *rnd1like*, which inhibits cell adhesion, possibly through Cdh1 down-regulation. Then, the prechordal plate progenitors cannot properly migrate and spread. Ahead of the prechordal plate cells express *snail1a* (Blanco *et al.*, 2007). In this population ethanol down-regulates this transcription factor, so cell adhesion through Cdh1 could be increased. This may result in that cell population not being able to properly guide the prechordal plate and in an arrest of migration.

Our hypothesis has been partially demonstrated by previous reports: 1) Without E-cadherin gastrulation is arrested (Babb y Marrs, 2004; Montero *et al.*, 2005). 2) In *Xenopus*, the up-regulation of *rnd1* leads to a reduction of the cell adhesion mediated by Cadherin (Ogata *et al.*, 2007). In both cases similar phenotypes to those described by us are obtained. 3) *rnd1* positively responds to TGF $\beta$  signals and induces a massive internalization of Cadherin (Miller *et al.*, 2006; Ogata *et al.*, 2007). 4) Failures on TGF $\beta$  activity lead to cyclopia in zebrafish (Hatta *et al.*, 1994; Heisenberg and Nuüsslein-Volhard, 1997) and humans (review in Bertrand and Dahmane, 2006).

Although the activity of several pathways is altered by ethanol during gastrulation (Blader and Strähle, 1998; Yelin *et al.*, 2005; Loucks *et al.*, 2007), the mechanism by which ethanol arrests the migration of the progenitors of the prechordal plate remains unclear. The regulation of cytoskeleton dynamics and the interaction between cells are key factors during gastrulation (review in Heisenberg and Masa, 2002; Kai *et al.*, 2008), and we speculate that the disruption of these processes by exposure to ethanol could explain the ethylic effects during gastrulation.

## Effects of ethanol in the splitting of the eye field

We have described the alterations in the expression patterns of *pax6*, *rx3*, *rx1* and *six3a* after exposure to ethanol. Not only the pattern was aberrant but also the levels of expression were reduced. These results agree with a previous work that used other strains and embryos exposed to forskolin (Loucks *et al.*, 2007).

Pax6 is intimately joined to visual system development (Zaghloul and Moody, 2007), although it has not been described to play a specific role in eye field splitting. Its role in the patterning of the optic vesicles has been studied in detail and it has been shown that its expression needs to be down-regulated in the proximal region of the optic vesicles for the specification of the optic stalks to take place. In the absence of this process, the optic stalk remains as retina and the optic vesicles fuse, as happens in *cyc* mutants (Macdonald *et al.*, 1995). We do not think that this happens in the ethanol-induced cyclopic embryos where *pax6* expression remains in the dorsal and medial part of the eye field and never extends through the ventral part of the embryos. This effect is more similar to what happens in *sbl* mutants where the optic stalk progenitors remain in a dorsal and medial position and, eventually, differentiate into retina (England *et al.*, 2006).

*six3* is also down-regulated in embryos exposed to ethanol. Lack of Six3 signaling is related to holoprosencephaly in zebrafish (Domené *et al.*, 2008) and humans (Wallis *et al.*, 1999). It is not clear how *six3* contributes to this phenotype and cyclopia but it has been described that the injection of Geminin, which blocks Six3, or medium doses of *six3* morpholino induce cyclopia (Carl *et al.*, 2002; del Bene *et al.*, 2004). Other reports have shown a reduction in Shh signal after Six3 depletion (Geng *et al.*, 2008) and indeed, the injection of *shh* mRNA can rescue ethanol induced phenotypes, including cyclopia (Loucks *et al.*, 2009).

The most important changes during eye field splitting induced by ethanol are related to the modification of *rx3* and *rx1* expression. In zebrafish *chk* mutants and medaka *eyeless* mutants, the lack of Rx3 leads to a total absence of splitting and, eventually, the eye field disappears (Rembold *et al.*, 2006), which is known as anophthalmia. Something similar also happens in mice mutants for *rx* (Mathers *et al.*, 1997). Moreover, without *rx3*, the cell adhesion molecule NICam cannot be degraded and there is an excessive convergence of the retinal progenitors in the midline (Brown *et al.*, 2010). In the ethanol-treated embryos, *rx3* is just down-regulated and evagination

starts but optic vesicles cannot totally separate. Maybe *rx3* is not involved in the ethanol-induced cyclopia and it is related with the small size of the optic vesicles, since a down-regulation of *rx3* expression contributes to the reduction in the size of the optic vesicles (Loosli et al., 2001). In fact, down-regulation of *rx3* has never been linked to cyclopia while up-regulation of *rx2* has, although probably as a result of the transformation of the optic stalk into retina (Chuang and Raymond, 2001).

We have also described a disruption in the cytoarchitecture of the eye field. After exposure to ethanol, eye field progenitors elongate but do not acquire their characteristic fusiform shape and the nuclei remain rounded. They present fewer amounts of ribosomes and many more vacuoles. These alterations have been described in the gut of rats fed with ethanol (Rossi y Zucoloto, 1977) and in the optic nerve of rats exposed to ethanol during pregnancy (Pinazo-Durán *et al.*, 2003). Retinal progenitors exposed to ethanol also present some cell junctions but they do not orient appropriately and they never acquire an epithelial aspect. Moreover, ethanol seems to prevent the acquisition of cell polarity, as evidenced by the reduction in the expression of the apical marker *zo1*. In fact, the lack of *Zo1* has been related to a delay in the formation and maturation of the cell junctions (McNeil *et al.*, 2006) although cells elongate (Umeda *et al.*, 2006). The lack of elongation could be due to the reduction in *rx3* expression, since, in mice, it has been described that retinal progenitors without *rx* do not elongate nor contribute to the retina (Medina-Martinez *et al.*, 2009).

It is not clear if cells within the eye field actively move towards more lateral regions (Rembold *et al.*, 2006) or this displacement is a consequence of the forces generated by surrounding tissues (England *et al.*, 2006). In any case, cells within the eye field change their morphology and ethanol exposure prevents this process. This phenomenon is known as the mesenchymal-epithelial transition (MET), when changes between un-polarized and polarized cells are observed and it has been deeply described during zebrafish somitogenesis (Barrios *et al.*, 2003; review in Holley, 2007). The opposite phenomenon, the epithelial-mesenchymal transition (EMT) has been described during zebrafish development in gastrulation (review in Shook and Keller, 2003). In cell cultures, the MET has been related to the location of E-cadherin in apical regions (Auersperg *et al.*, 1999) and the down-regulation of TGF $\beta$  signal (Li *et al.*, 2010). During zebrafish somitogenesis, MET is controlled by ephrins (Barrios *et al.*, 2003), molecules that can be altered by exposure to ethanol (Arenzana, 2006) and, also, a proper regulation of the GTPases Cdc42 and Rac1 is needed (Nakaya *et al.*, 2004).

## Long-standing effects of exposure to ethanol

To study the long-standing effects of exposure to ethanol we have analysed cyclopic embryos obtained as previously described (Arenzana *et al.*, 2006; Loucks *et al.*, 2007). Cyclopic embryos present a great delay in the differentiation of their visual system such as that, at 3 dpf, neither the retina nor the OT of cyclopic larvae is laminated (Arenzana *et al.*, 2006) and even at 5 dpf, nuclear layers are thinner (Santos-Ledo, 2007). A similar phenotype is also observed in an ethanol-induced microphthalmic model (Dlugos and Rabin, 2007).

Our data support previous results that show that the effect of ethanol on cell differentiation depends on the cell type (Matsui *et al.*, 2006; Kashyap *et al.*, 2007). For example, we have described the recovery of normal densities at 5 dpf of Zpr1 positive cells (cones) but not of Zpr3 positive cells (rods). The differentiation of the latter cells is regulated by retinoic acid (Hyatt *et al.*, 1996) and ethanol could decrease the synthesis of retinoic acid (Yelin *et al.*, 2005) which would lead to a reduction in their differentiation. Nevertheless, why cones are less affected remains unclear.

Within the retina, the densities of CR and Prox1 positive cells are lower in cyclopic larvae, even at 5 dpf. Our results agree with previous reports where the reduction of CR expression was linked to problems in vision, learning and memory in people borned with FAS (Marshall *et al.*, 2009). Prox1 is involved in the transition between proliferation and differentiation of retinal progenitors (Cid *et al.*, 2010), thus the reduction in its expression would contribute to the lack of differentiation observed in the cyclopic retina. The alterations in numbers of rods and cells that express CR and Prox1 may contribute to the visual deficits that have been shown after exposure to ethanol in zebrafish (Bilotta *et al.*, 2002; Matsui *et al.*, 2006) and humans (Paul *et al.*, 2010).

The effect on TH and Pax6 positive cells is different to that on CR and Prox1 positive cells and consists in an increase in the density of cells at later stages. Some reports have described that, in certain brain regions, ethanol can up-regulate TH expression and increase the release of dopamine (Guardia *et al.*, 2000; Bowers *et al.*, 2006). We have described a refinement of the Pax6-positive cells in control animals between 3 and 5 dpf. In this latter stage the density of Pax6-positive cells is slightly higher in cyclopic embryos, which is consistent with a previous study that propose that



exposure to ethanol can delay the refinement of the distribution pattern of Pax6 (Kashyap et al., 2007).

One possibility, that combines all the results obtained in the retina, is a change in the cell fate of retinal progenitors. During retinal differentiation, a progenitor cell passes through waves of competence during which it can generate only a subset of types of postmitotic cells. In case the window to differentiate to a specific cell type passes, progenitors will differentiate to another cell type (review in Livesey and Cepko, 2001). The delay produced by exposure to ethanol (Matsui *et al.*, 2006; Kashyap *et al.*, 2007) could impair the differentiation of retinal progenitors to the first mature cells (ganglion and interplexiform cells which are positive to CR and Prox1). In this case, cells would remain as retinal progenitors and differentiate in later stages to other retinal types such as TH- and Pax6-positive interplexiform cells, resulting in the high number of these cells that we have described. This idea is supported by the significant higher proliferation levels in the cyclopic retina at 3 dpf.

Our ethanol induced cyclopic embryos show optic nerve hypoplasia, a phenotype also described in ethanol-induced microphthalmic models (Chmielewski *et al.*, 1997; Parnig *et al.*, 2007). Each side of the fused retina presents one optic nerve, and they fuse before leaving the retina. The projections within the OT are also reduced. This phenotype is similar to that observed in *cyc* mutants (Kärllström *et al.*, 1996), where only ipsilateral and anterior projections can be observed. The problems in the formation of the optic nerve could be linked with the delay in the differentiation of the OT.

Ventral parts of the embryo are more affected than dorsal domains by exposure to ethanol (Blader and Strähle, 1998). Nevertheless, superior visual centres (pretectum and OT) also present alterations in cyclopic animals, although they are different from those observed in the retina. For example, at 3 dpf, we have not observed alterations in the distribution of Pax6 and TH, but, at 5 dpf, the density of these markers is significantly higher in control animals. Regarding Prox1 and CR positive cells, they eventually recover normal densities at 5 dpf. Since we observed a reduction in the projection within the OT, our data suggest that the differentiation of Prox1 and CR positive cells are independent of the establishment of the right connections and they are only affected by the general delay. Nevertheless, Pax6 and TH positive cells are more altered, thus for their differentiation proper retino-pretectum-tectal projections could be needed.

After one day of ethanol retrieval we have not observed important differences in the proliferation neither in the retina nor the OT. Previous reports have shown that

ethanol reduces cell proliferation in many regions of the brain (review in Polifka and Friedman, 2002), an effect confirmed in the zebrafish retina (Kashyap *et al.*, 2007). It is not clear how ethanol decreases proliferation; but it can inhibit muscarinic agonists (Costa y Guizzetti, 2002) or PKC (Kumada *et al.*, 2006). It has been also described that ethanol increases cell death (Carvan *et al.*, 2004; Arenzana *et al.*, 2006; Reimers *et al.*, 2006; Santos-Ledo, 2007), even many days after ethanol retrieval. The slightly increased proliferation in later stages could be a response to the high levels of apoptosis.

Recent studies have shown that ethanol-induced phenotypes can be partially recovered adding cholesterol (Lie *et al.*, 2007), injecting shh mRNA (Loucks *et al.*, 2007), exposing to retinoic acid (Marrs *et al.*, 2009) or with antioxidants (Reimers *et al.*, 2006). We have shown that some cell types partially recover by themselves at the end of the organogenesis. Moreover, the effect of ethanol not only depends on the cell type but also on the tissue.

## Summary

Zebrafish is a well-established model for the analysis of the teratogenicity and neurotoxicity and it has been used for several years in the analysis of the effects of ethanol during embryonic development (review in Tierney, 2011). Here, we have shown the effects of ethanol during three different time-points.

We have found several similarities regarding the alterations in the regulation of the cytoskeleton dynamics between zebrafish, cell cultures and mammals. The information drawn from these models could be complementary and zebrafish could be a good *in vivo* model to understand the cellular mechanisms that underlie ethylic teratogenicity. Nevertheless, it would be very difficult to directly extrapolate the effects to the Foetal Alcohol Syndrome.

## CONCLUSSIONS

In accordance with the objectives proposed for this Doctoral Thesis and as a consequence of the results obtained and the discussion executed, we can conclude the following statements:

- I. Exposure to ethanol induces changes in the levels and patterns of expression of the genes involved in the prechordal plate migration (*rhoA*, *rnd1*, *rnd1like* and *snail1a*), preventing this process.
- II. Ethanol may lead to a decrease in cell coherence of prechordal plate progenitors. Since blocking *rnd1* translation partially recovers this phenotype, this effect may be mediated by the up-regulation of *rnd1* in ethanol treated conditions.
- III. Ethanol exposure results in changes in the expression of some of the genes involved in the eye specification and morphogenesis (*pax6a*, *six3a*, *rx3* and *rx1*).
- IV. During the splitting of the eye field, retinal progenitors acquire fusiform morphologies and orient their apical domains to the central part of the embryo. This transformation is prevented by exposure to ethanol and could be mediated by the down-regulation of *zol*.
- V. The effect of ethanol in the differentiating visual system is cell-selective but also region-selective, since the alterations in cell-markers are different in the retina and the optic tectum. The alterations in the latter domain may be a consequence of the reduction in the retino-tectal projections.
- VI. Although the differentiation in visual centres is delayed by exposure to ethanol, some of the cell-markers partially recover a normal distribution and densities at 5 dpf.

# Bibliografía

- Acampora, D., Mazan, S., Lallemand, Y., Avantaggiato, V., Maury, M., Simeone, A., Brulet, P. (1995).** Forebrain and midbrain regions are deleted in *Otx2*<sup>-/-</sup> mutants due to a defective anterior neuroectoderm specification during gastrulation. *Development* 121, 3279-3290.
- Adelmann, H.B. (1929).** Experimental studies on the development of the eye. I. The effect of the removal of median and lateral areas of the anterior end of the urodelan neural plate on the development of the eyes (*Triton teniatus* and *Amblystoma punctatum*). *J Exp Zool* 54, 249-290.
- Adelmann, H.B. (1936).** The problem of cyclopia. *Pt I Quar Rev Biol* 11, 161-182.
- Ahlgren, S.C., Thakur, V., Bronner-Fraser, M. (2002).** Sonic hedgehog rescues cranial neural crest from cell death induced by ethanol exposure. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 10476-10481.
- Anastasiadis, P.Z., Reynolds, A.B. (2001).** Regulation of Rho GTPases by p120-catenin. *Curr Opin Cell Biol* 13, 604-610.
- Anderson, J.M., Stevenson, B.R., Jesaitis, L.A., Goodenough, D.A., Mooseker, M.S. (1988).** Characterization of ZO-1, a protein component of the tight junction from mouse liver and Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Biol* 106, 1141-1149.
- Andreazzoli, M., Gestri, G., Angeloni, D., Menna, E., and Barsacchi, G. (1999).** Role of *Xrx1* in *Xenopus* eye and anterior brain development. *Development* 126, 2451-2460.
- Arenzana, F.J. (2006).** Caracterización neuroquímica de las áreas visuales primarias del pez cebra en condiciones normales y en ciclopia inducida por etanol. *Tesis Doctoral*. Universidad de Salamanca.
- Arenzana, F.J., Arévalo, R., Sánchez-González, R., Clemente, D., Aijón, J., Porteros, A., (2006a).** Tyrosine hydroxylase immunoreactivity in the developing visual pathway of the zebrafish. *Anat Embryol* 211, 323-334.
- Arenzana, F.J., Carvan, M.J., III, Aijón, J., Sánchez-Gonzalez, R., Arévalo, R., Porteros, A. (2006b).** Teratogenic effects of ethanol exposure on zebrafish visual system development. *Neurotoxicol Teratol* 28, 342-348.
- Arenzana, F.J., Santos-Ledo, A., Porteros, A., Aijón, J., Velasco, A., Lara, J.M., Arévalo, R. (2011).** Characterisation of neuronal and glial populations of the visual system during zebrafish lifespan. *Int J Dev Neurosci*.
- Aronne, M.P., Evrard, S.G., Mirochnic, S., Brusco, A. (2008).** Prenatal ethanol exposure reduces the expression of the transcriptional factor Pax6 in the developing rat brain. *Ann NY Acad Sci* 1139, 478-498.
- Auersperg, N., Pan, J., Grove, B.D., Peterson, T., Fisher, J., Maines-Bandiera, S., Somasiri, A., Roskelley, C.D. (1999).** E-cadherin induces mesenchymal-to-epithelial transition in human ovarian surface epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 6249-6254.
- Axelrod, J.D., Miller, J.R., Shulman, J.M., Moon, R.T., Perrimon, N. (1998).** Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Genes Dev* 12, 2610-2622.
- Babb, S.G., Marrs, J.A. (2004).** E-cadherin regulates cell movements and tissue formation in early zebrafish embryos. *Dev Dyn* 230, 263-277.
- Bailey, T.J., El-Hodiri, H., Zhang, L., Shah, R., Mathers, P.H., Jamrich, M. (2004).** Regulation of vertebrate eye development by Rx genes. *Int J Dev Biol* 48, 761-770.
- Barrallo-Gimeno, A., Nieto, M.A. (2005).** The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 132, 3151-3161.
- Barresi, M.J., Stickney, H.L., Devoto, S.H. (2000).** The zebrafish slow-muscle-omitted gene product is required for Hedgehog signal transduction and the development of slow muscle identity. *Development* 127, 2189-2199.
- Barrios, A., Poole, R.J., Durbin, L., Brennan, C., Holder, N., Wilson, S.W. (2003).** Eph/Ephrin signaling regulates the mesenchymal-to-epithelial transition of the paraxial mesoderm during somite morphogenesis. *Cur Biol* 13, 1571-1582.

- Bartlett, P.F., Dutton, R., Likiardopoulos, V., Brooker, G. (1994).** Regulation of neurogenesis in the embryonic and adult brain by fibroblast growth factors. *Alcohol Alcohol Suppl* 2, 387-394.
- Bauer, H., Zweimueller-Mayer, J., Steinbacher, P., Lametschwandner, A., Bauer, H.C. (2010).** The dual role of zonula occludens (ZO) proteins. *J Biomed Biotechnol* 2010, 402593.
- Baumer, N., Marquardt, T., Stoykova, A., Ashery-Padan, R., Chowdhury, K., Gruss, P. (2002).** Pax6 is required for establishing naso-temporal and dorsal characteristics of the optic vesicle. *Development* 129, 4535-4545.
- Baydas, G., Tuzcu, M. (2005).** Protective effects of melatonin against ethanol-induced reactive gliosis in hippocampus and cortex of young and aged rats. *Exp Neurol* 194, 175-181.
- Bertrand, N., Dahmane, N. (2006).** Sonic hedgehog signaling in forebrain development and its interactions with pathways that modify its effects. *Trends Cell Biol* 16, 597-605.
- Betchaku, T., Trinkaus, J.P. (1978).** Contact relations, surface activity, and cortical microfilaments of marginal cells of the enveloping layer and of the yolk syncytial and yolk cytoplasmic layers of fundulus before and during epiboly. *J Exp Zool* 206, 381-426.
- Bilotta, J., Saszik, S., Givin, C.M., Hardesty, H.R., Sutherland, S.E. (2002).** Effects of embryonic exposure to ethanol on zebrafish visual function. *Neurotoxicol Teratol* 24, 759-766.
- Blader, P., Strahle, U. (1998).** Ethanol impairs migration of the prechordal plate in the zebrafish embryo. *Dev Biol* 201, 185-201.
- Blanco, M.J., Barrallo-Gimeno, A., Acloque, H., Reyes, A.E., Tada, M., Allende, M.L., Mayor, R., Nieto, M.A. (2007).** Snail1a and Snail1b cooperate in the anterior migration of the axial mesendoderm in the zebrafish embryo. *Development* 134, 4073-4081.
- Bovolenta, P., Mallamaci, A., Puelles, L., Boncinelli, E. (1998).** Expression pattern of cSix3, a member of the Six/sine oculis family of transcription factors. *Mech Dev* 70, 201-203.
- Bowers, B.J., Radcliffe, R.A., Smith, A.M., Miyamoto-Ditmon, J., Wehner, J.M. (2006).** Microarray analysis identifies cerebellar genes sensitive to chronic ethanol treatment in PKCgamma mice. *Alcohol* 40, 19-33.
- Bradfield, J.Y., West, J.R., Maier, S.E. (2006).** Uptake and elimination of ethanol by young zebrafish embryos. *Neurotoxicol Teratol* 28, 629-633.
- Brown, K.E., Keller, P.J., Ramialison, M., Rembold, M., Stelzer, E.H., Loosli, F., Wittbrodt, J. (2010).** Nlcam modulates midline convergence during anterior neural plate morphogenesis. *Dev Biol* 339, 14-25.
- Brown, L., Brown, S. (2009).** Zic2 is expressed in pluripotent cells in the blastocyst and adult brain expression overlaps with makers of neurogenesis. *Gene Expr Patterns* 9, 43-49.
- Brown, S.A., Warburton, D., Brown, L.Y., Yu, C.Y., Roeder, E.R., Stengel-Rutkowski, S., Hennekam, R.C., Muenke, M. (1998).** Holoprosencephaly due to mutations in ZIC2, a homologue of Drosophila odd-paired. *Nat Genet* 20, 180-183.
- Burrill, J.D., Easter, S.S., Jr. (1994).** Development of the retinofugal projections in the embryonic and larval zebrafish (*Brachydanio rerio*). *J Comp Neurol* 346, 583-600.
- Carl, M., Loosli, F., Wittbrodt, J. (2002).** Six3 inactivation reveals its essential role for the formation and patterning of the vertebrate eye. *Development* 129, 4057-4063.
- Carmany-Rampey, A., Schier, A.F. (2001).** Single-cell internalization during zebrafish gastrulation. *Curr Biol* 11, 1261-1265.
- Carvan, M.J., III, Loucks, E., Weber, D.N., Williams, F.E. (2004).** Ethanol effects on the developing zebrafish: neurobehavior and skeletal morphogenesis. *Neurotoxicol Teratol* 26, 757-768.
- Castro, A., Becerra, M., Manso, M.J., Anadón, R. (2006).** CR immunoreactivity in the brain of the zebrafish, *Danio rerio*: distribution and comparison with some neuropeptides and neurotransmitter-synthesizing enzymes. I. Olfactory organ and forebrain. *J Comp Neurol* 494, 435-459.

- Cavodeassi, F., Carreira-Barbosa, F., Young, R.M., Concha, M.L., Allende, M.L., Houart, C., Tada, M., Wilson, S.W. (2005).** Early stages of zebrafish eye formation require the coordinated activity of Wnt11, Fz5, and the Wnt/beta-catenin pathway. *Neuron* 47, 43-56.
- Cervený, K.L., Cavodeassi, F., Turner, K.J., de Jong-Curtain, T.A., Heath, J.K., Wilson, S.W. (2010).** The zebrafish *flotte lotte* mutant reveals that the local retinal environment promotes the differentiation of proliferating precursors emerging from their stem cell niche. *Development* 137, 2107-2115.
- Chaffer, C.L., Brennan, J.P., Slavin, J.L., Blick, T., Thompson, E.W., Williams, E.D. (2006).** Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer Res.* 66, 11271-11278.
- Chaffer, C.L., Thompson, E.W., Williams, E.D. (2007).** Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells Tissues Organs* 185, 7-19.
- Chen, J.R., Lazarenko, O.P., Shankar, K., Blackburn, M.L., Badger, T.M., Ronis, M.J. (2010).** A role for ethanol-induced oxidative stress in controlling lineage commitment of mesenchymal stromal cells through inhibition of Wnt/beta-catenin signaling. *J Bone Miner Res* 25, 1117-1127.
- Cheng, J.C., Miller, A.L., Webb, S.E. (2004).** Organization and function of microfilaments during late epiboly in zebrafish embryos. *Dev Dyn* 231, 313-323.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H., Beachy, P.A. (1996).** Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383, 407-413.
- Chmielewski, C.E., Hernández, L.M., Quesada, A., Pozas, J.A., Picabea, L., Prada, F.A. (1997).** Effects of ethanol on the inner layers of chick retina during development. *Alcohol* 14, 313-317.
- Choi, I. Y., Lee, S., Rivier, C. (2008).** Novel role of adrenergic neurons in the brain stem in mediating the hypothalamic-pituitary axis hyperactivity caused by prenatal alcohol exposure. *Neuroscience* 155, 888-901.
- Chrisman, K., Kenney, R., Comin, J., Thal, T., Suchocki, L., Yueh, Y.G., Gardner, D.P. (2004).** Gestational ethanol exposure disrupts the expression of FGF8 and Sonic hedgehog during limb patterning. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 70, 163-171.
- Chuang, J.C., Mathers, P.H., Raymond, P.A. (1999).** Expression of three Rx homeobox genes in embryonic and adult zebrafish. *Mech Dev* 84, 195-198.
- Chuang, J.C., Raymond, P.A. (2001).** Zebrafish genes rx1 and rx2 help define the region of forebrain that gives rise to retina. *Dev Biol* 231, 13-30.
- Cid, E., Santos-Ledo, A., Parrilla-Monge, M., Lillo, C., Arévalo, R., Lara, J.M., Aijón, J., Velasco, A. (2010).** Prox1 expression in rod precursors and Müller cells. *Exp Eye Res* 90, 267-276.
- Ciolofan, C., Li, X.B., Olson, C., Kamasawa, N., Gebhardt, B.R., Yasumura, T., Morita, M., Rash, J.E., Nagy, J.I. (2006).** Association of connexin36 and zonula occludens-1 with zonula occludens-2 and the transcription factor zonula occludens-1-associated nucleic acid-binding protein at neuronal gap junctions in rodent retina. *Neuroscience* 140, 433-451.
- Connor, R.J., Menzel, P., Pasquale, E.B. (1998).** Expression and tyrosine phosphorylation of Eph receptors suggest multiple mechanisms in patterning of the visual system. *Dev Biol* 193, 21-35.
- Costa, L.G., Guizzetti, M. (2002).** Inhibition of muscarinic receptor-induced proliferation of astroglial cells by ethanol: mechanisms and implications for the fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicology* 23, 685-691.
- Crews, F.T., Waage, H.G., Wilkie, M.B., Lauder, J.M. (1999).** Ethanol pretreatment enhances NMDA excitotoxicity in biogenic amine neurons: protection by brain derived neurotrophic factor. *Alcohol Clin Exp Res* 23, 1834-1842.
- Culverwell, J. and Karlstrom, R.O. (2002).** Making the connection: retinal axon guidance in the zebrafish. *Semin Cell Dev Biol* 13, 497-506.

- Dakubo, G.D., Wang, Y.P., Mazerolle, C., Campsall, K., McMahon, A.P., Wallace, V.A. (2003).** Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog signaling is required for optic disc and stalk neuroepithelial cell development. *Development* 130, 2967-2980.
- Das, J., Pany, S., Rahman, G.M., Slater, S.J. (2009).** PKC epsilon has an alcohol-binding site in its second cysteine-rich regulatory domain. *Biochem J* 421, 405-413.
- Dayhaw-Barker, P. (2002).** Retinal pigment epithelium melanin and ocular toxicity. *Int J Toxicol* 21, 451-454.
- de longh, R.U., Abud, H.E., Hime, G.R. (2006).** WNT/Frizzled signaling in eye development and disease. *Front Biosci* 11, 2442-2464.
- del Bene, F., Tessmar-Raible, K., Wittbrodt, J. (2004).** Direct interaction of geminin and Six3 in eye development. *Nature* 427, 745-749.
- Dlugos, C.A., Rabin, R.A. (2007).** Ocular deficits associated with alcohol exposure during zebrafish development. *J Comp Neurol* 502, 497-506.
- Dodou, E., Barald, K.F., Postlethwait, J.H. (2004).** Ventralized zebrafish embryo rescue by overexpression of *Zic2a*. *Zebrafish* 1, 239-256.
- Domene, S., Roessler, E., El-Jaick, K.B., Snir, M., Brown, J.L., Velez, J.I., Bale, S., Lacbawan, F., Muenke, M., Feldman, B. (2008).** Mutations in the human SIX3 gene in holoprosencephaly are loss of function. *Hum Mol Genet* 17, 3919-3928.
- Dwyer, D.S., Bradley, R.J. (2000).** Chemical properties of alcohols and their protein binding sites. *Cell Mo Life Sci* 57, 265-275.
- Easter, S.S., Jr., Stuermer, C.A. (1984).** An evaluation of the hypothesis of shifting terminals in goldfish optic tectum. *J Neurosci* 4, 1052-1063.
- Ebert, A.M., McAnelly, C.A., Srinivasan, A., Linker, J.L., Horne, W.A., Garrity, D.M. (2008).** Ca<sup>2+</sup> channel-independent requirement for MAGUK family CACNB4 genes in initiation of zebrafish epiboly. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 198-203.
- Eckert, J.J., Fleming, T.P. (2008).** Tight junction biogenesis during early development. *Biochim. Biophys Acta* 1778, 717-728.
- Elul, T., Keller, R. (2000).** Monopolar protrusive activity: a new morphogenic cell behavior in the neural plate dependent on vertical interactions with the mesoderm in *Xenopus*. *Dev Biol* 224, 3-19.
- England, S.J., Blanchard, G.B., Mahadevan, L., Adams, R.J. (2006).** A dynamic fate map of the forebrain shows how vertebrate eyes form and explains two causes of cyclopia. *Development* 133, 4613-4617.
- Etienne-Manneville, S., Hall, A. (2002).** Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.
- Ezin, A.M., Skoglund, P., Keller, R. (2006).** The presumptive floor plate (notoplate) induces behaviors associated with convergent extension in medial but not lateral neural plate cells of *Xenopus*. *Dev Biol* 300, 670-686.
- Fan, C.Y., Cowden, J., Simmons, S.O., Padilla, S., Ramabhadran, R. (2010).** Gene expression changes in developing zebrafish as potential markers for rapid developmental neurotoxicity screening. *Neurotoxicol Teratol* 32, 91-98.
- Feldman, B., Gates, M.A., Egan, E.S., Dougan, S.T., Rennebeck, G., Sirotkin, H.I., Schier, A.F., Talbot, W.S. (1998).** Zebrafish organizer development and germ-layer formation require nodal-related signals. *Nature* 395, 181-185.
- Fulwiler, C., Schmitt, E.A., Kim, J.M., Dowling, J.E. (1997).** Retinal patterning in the zebrafish mutant cyclops. *J Comp Neurol* 381, 449-460.
- Geng, X., Speirs, C., Lagutin, O., Inbal, A., Liu, W., Solnica-Krezel, L., Jeong, Y., Epstein, D.J., Oliver, G. (2008).** Haploinsufficiency of *Six3* fails to activate Sonic hedgehog expression in the ventral forebrain and causes holoprosencephaly. *Dev Cell* 15, 236-247.



- Gestri, G., Carl, M., Appolloni, I., Wilson, S.W., Barsacchi, G., Andreazzoli, M. (2005).** Six3 functions in anterior neural plate specification by promoting cell proliferation and inhibiting Bmp4 expression. *Development* 132, 2401-2413.
- Gilbert, S.F. (2005).** Biología del desarrollo. *Buenos Aires: Médica Panamericana.*
- Goda, T., Takagi, C., Ueno, N. (2009).** *Xenopus* Rnd1 and Rnd3 GTP-binding proteins are expressed under the control of segmentation clock and required for somite formation. *Dev Dyn* 238, 2867-2876.
- Goldstein, D.B., Chin, J.H. (1981).** Interaction of ethanol with biological membranes. *Fed Proc* 40, 2073-2076.
- Gottardi, C.J., Arpin, M., Fanning, A.S., Louvard, D. (1996).** The junction-associated protein, zonula occludens-1, localizes to the nucleus before the maturation and during the remodeling of cell-cell contacts. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 10779-10784.
- Granato, A. (2006).** Altered organization of cortical interneurons in rats exposed to ethanol during neonatal life. *Brain Res* 1069, 23-30.
- Graw, J. (2010).** Eye development. *Curr Top Dev Biol* 90, 343-386.
- Greenberg, D.A. (2003).** Linking acquired neurodevelopmental disorders to defects in cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 8043-8044.
- Gripp, K.W., Wotton, D., Edwards, M.C., Roessler, E., Ades, L., Meinecke, P., Richieri-Costa, A., Zackai, E.H., Massague, J., Muenke, M., Elledge, S.J. (2000).** Mutations in TGIF cause holoprosencephaly and link NODAL signalling to human neural axis determination. *Nat Genet* 25, 205-208.
- Gritsman, K., Zhang, J., Cheng, S., Heckscher, E., Talbot, W.S., Schier, A.F. (1999).** The EGF-CFC protein one-eyed pinhead is essential for nodal signaling. *Cell* 97, 121-132.
- Gritsman, K., Talbot, W.S., Schier, A.F. (2000).** Nodal signaling patterns the organizer. *Development* 127, 921-932.
- Grupp, L., Wolburg, H., Mack, A.F. (2010).** Astroglial structures in the zebrafish brain. *J Comp Neurol* 518, 4277-4287.
- Guardia, J., Catafau, A.M., Batlle, F., Martin, J.C., Segura, L., Gonzalvo, B., Prat, G., Carrio, I., Casas, M. (2000).** Striatal dopaminergic D(2) receptor density measured by [(123)I]iodobenzamide SPECT in the prediction of treatment outcome of alcohol-dependent patients. *Am J Psychiatry* 157, 127-129.
- Guasch, R.M., Tomas, M., Miñambres, R., Valles, S., Renau-Piqueras, J., Guerri, C. (2003).** RhoA and lysophosphatidic acid are involved in the actin cytoskeleton reorganization of astrocytes exposed to ethanol. *J Neurosci Res* 72, 487-502.
- Guasch, R.M., Blanco, A.M., Pérez-Arago, A., Miñambres, R., Talens-Visconti, R., Peris, B., Guerri, C. (2007).** RhoE participates in the stimulation of the inflammatory response induced by ethanol in astrocytes. *Exp Cell Res* 313, 3779-3788.
- Guerri, C., Renau-Piqueras, J. (1997).** Alcohol, astroglia, and brain development. *Mol Neurobiol* 15, 65-81.
- Halilagic, A., Ribes, V., Ghyselinck, N.B., Zile, M.H., Dolle, P., Studer, M. (2007).** Retinoids control anterior and dorsal properties in the developing forebrain. *Dev Bio* 303, 362-375.
- Hammerschmidt, M., Pelegri, F., Mullins, M.C., Kane, D.A., Brand, M., van Eeden, F.J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Haffter, P., Heisenberg, C.P., Jiang, Y.J., Kelsh, R.N., Odenthal, J., Warga, R.M., Nüsslein-Volhard, C. (1996).** Mutations affecting morphogenesis during gastrulation and tail formation in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 143-151.
- Harland, R., Gerhart, J. (1997).** Formation and function of Spemann's organizer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 611-667.
- Harris, R.A., Trudell, J.R., Mihic, S.J. (2008).** Ethanol's molecular targets. *Sci Signal* 1, 7.
- Hassler, J.A., Moran, D.J. (1986).** The effects of ethanol on embryonic actin: a possible role in teratogenesis. *Experientia* 42, 575-577.

- Hatta, K., Puschel, A.W., Kimmel, C.B. (1994). Midline signaling in the primordium of the zebrafish anterior central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 2061-2065.
- Heisenberg, C.P., Brand, M., Jiang, Y.J., Warga, R.M., Beuchle, D., van Eeden, F.J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Kane, D.A., Kelsh, R.N., Mullins, M.C., Odenthal, J., Nusslein-Volhard, C. (1996). Genes involved in forebrain development in the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 191-203.
- Heisenberg, C.P., Nusslein-Volhard, C. (1997). The function of *silberblick* in the positioning of the eye anlage in the zebrafish embryo. *Dev Biol* 184, 85-94.
- Heisenberg, C.P., Tada, M., Rauch, G.J., Saude, L., Concha, M.L., Geisler, R., Stemple, D.L., Smith, J.C., Wilson, S.W. (2000). *Silberblick/Wnt11* mediates convergent extension movements during zebrafish gastrulation. *Nature* 405, 76-81.
- Heisenberg, C.P., Houart, C., Take-Uchi, M., Rauch, G.J., Young, N., Coutinho, P., Masai, I., Caneparo, L., Concha, M.L., Geisler, R., Dale, T.C., Wilson, S.W., Stemple, D.L. (2001). A mutation in the Gsk3-binding domain of zebrafish *Masterblind/Axin1* leads to a fate transformation of telencephalon and eyes to diencephalon. *Genes Dev* 15, 1427-1434.
- Heisenberg, C.P., Tada, M. (2002). Zebrafish gastrulation movements: bridging cell and developmental biology. *Semin Cell Dev Biol* 13, 471-479.
- Hever, A.M., Williamson, K.A., Van, H. (2006). Developmental malformations of the eye: the role of PAX6, SOX2 and OTX2. *Clin Genet* 69, 459-470.
- Holley, S.A. (2007). The genetics and embryology of zebrafish metamerism. *Dev Dyn* 236, 1422-1449.
- Howarth, A.G., Hughes, M.R., Stevenson, B.R. (1992). Detection of the tight junction-associated protein ZO-1 in astrocytes and other nonepithelial cell types. *Am J Physiol* 262, C461-C469.
- Hyatt, G.A., Schmitt, E.A., Fadool, J.M., Dowling, J.E. (1996). Retinoic acid alters photoreceptor development in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 13298-13303.
- Irons, T.D., MacPhail, R.C., Hunter, D.L., Padilla, S. (2010). Acute neuroactive drug exposures alter locomotor activity in larval zebrafish. *Neurotoxicol Teratol* 32, 84-90.
- Ismail, S., Buckley, S., Budacki, R., Jabbar, A., Gallicano, G.I. (2010). Screening, diagnosing and prevention of fetal alcohol syndrome: is this syndrome treatable? *Dev Neurosci* 32, 91-100.
- Ito, Y., Tanaka, H., Okamoto, H., Ohshima, T. (2010). Characterization of neural stem cells and their progeny in the adult zebrafish optic tectum. *Dev Biol* 342, 26-38.
- Jacobs, R.E., Fraser, S.E. (1994). Magnetic resonance microscopy of embryonic cell lineages and movements. *Science* 263, 618-684.
- Jamrich, M., Sato, S. (1989). Differential gene expression in the anterior neural plate during gastrulation of *Xenopus laevis*. *Development* 105, 779-786.
- Joshi, S., Guleria, R.S., Pan, J., Bayless, K.J., Davis, G.E., Dipette, D., Singh, U.S. (2006). Ethanol impairs Rho GTPase signaling and differentiation of cerebellar granule neurons in a rodent model of fetal alcohol syndrome. *Cell Mol Life Sci* 63, 2859-2870.
- Kai, M., Heisenberg, C.P., Tada, M. (2008). Sphingosine-1-phosphate receptors regulate individual cell behaviours underlying the directed migration of prechordal plate progenitor cells during zebrafish gastrulation. *Development* 135, 3043-3051.
- Kane, D.A., Kimmel, C.B. (1993). The zebrafish midblastula transition. *Development* 119, 447-456.
- Kane, D.A., Maischein, H.M., Brand, M., van Eeden, F.J., Furutani-Seiki, M., Granato, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C.P., Jiang, Y.J. (1996). The zebrafish early arrest mutants. *Development* 123, 57-66.

- Karlstrom, R.O., Trowe, T., Klostermann, S., Baier, H., Brand, M., Crawford, A.D., Grunewald, B., Haffter, P., Hoffmann, H., Meyer, S.U., Kelsh, R.N., Nüsslein-Volhard, C. (1996).** Zebrafish mutations affecting retinotectal axon pathfinding. *Development* 123, 427-438.
- Kashyap, B., Frederickson, L.C., Stenkamp, D.L. (2007).** Mechanisms for persistent microphthalmia following ethanol exposure during retinal neurogenesis in zebrafish embryos. *Vis. Neurosci* 24, 409-421.
- Katsuno, T., Umeda, K., Matsui, T., Hata, M., Tamura, A., Itoh, M., Takeuchi, K., Fujimori, T., Nabeshima, Y., Noda, T., Tsukita, S., Tsukita, S. (2008).** Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Mol Biol Cell* 19, 2465-2475.
- Kausalya, P.J., Reichert, M., Hunziker, W. (2001).** Connexin45 directly binds to ZO-1 and localizes to the tight junction region in epithelial MDCK cells. *FEBS Lett* 505, 92-96.
- Kay, J.N., Finger-Baier, K.C., Roeser, T., Staub, W., Baier, H. (2001).** Retinal ganglion cell genesis requires lakritz, a Zebrafish atonal Homolog. *Neuron* 30, 725-736.
- Kay, J.N., Roeser, T., Mumm, J.S., Godinho, L., Mrejeru, A., Wong, R.O., Baier, H. (2004).** Transient requirement for ganglion cells during assembly of retinal synaptic layers. *Development* 131, 1331-1342.
- Keller, R.E., Danilchik, M., Gimlich, R., Shih, J. (1985).** The function and mechanism of convergent extension during gastrulation of *Xenopus laevis*. *J. Embryol Exp Morphol* 89, 185-209.
- Kennedy, B.N., Stearns, G.W., Smyth, V.A., Ramamurthy, V., van, E.F., Ankoudinova, I., Raible, D., Hurley, J.B., Brockhoff, S.E. (2004).** Zebrafish rx3 and mab21l2 are required during eye morphogenesis. *Dev Biol* 270, 336-349.
- Kenyon, K.L., Zaghloul, N., Moody, S.A. (2001).** Transcription factors of the anterior neural plate alter cell movements of epidermal progenitors to specify a retinal fate. *Dev Biol* 240, 77-91.
- Kiecker, C., Niehrs, C. (2001).** The role of prechordal mesendoderm in neural patterning. *Curr Opin Neurobiol* 11, 27-33.
- Kim, C.H., Oda, T., Itoh, M., Jiang, D., Artinger, K.B., Chandrasekharappa, S.C., Driever, W., Chitnis, A.B. (2000).** Repressor activity of Headless/Tcf3 is essential for vertebrate head formation. *Nature* 407, 913-916.
- Kim, H.T., Kim, E.H., Yoo, K.W., Lee, M.S., Choi, J.H., Park, H.C., Yeo, S.Y., Lee, D.S., Kim, C.H. (2008).** Isolation and expression analysis of Alzheimer's disease-related gene x51 in zebrafish. *Dev Dyn* 237, 3921-3926.
- Kim, K.C., Go, H.S., Bak, H.R., Choi, C.S., Choi, I., Kim, P., Han, S.H., Han, S.M., Shin, C.Y., Ko, K.H. (2010).** Prenatal exposure of ethanol induces increased glutamatergic neuronal differentiation of neural progenitor cells. *J Biomed Sci* 17, 85.
- Kimmel, C.B., Warga, R.M., Schilling, T.F. (1990).** Origin and organization of the zebrafish fate map. *Development* 108, 581-594.
- Kril, J.J., Halliday, G.M., Svoboda, M.D., Cartwright, H. (1997).** The cerebral cortex is damaged in chronic alcoholics. *Neuroscience* 79, 983-998.
- Kumada, T., Lakshmana, M.K., Komuro, H. (2006).** Reversal of neuronal migration in a mouse model of fetal alcohol syndrome by controlling second-messenger signalings. *J Neurosci* 26, 742-756.
- Laale, H.W. (1971).** Ethanol induced notochord and spinal cord duplications in the embryo of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J Exp Zool* 177, 51-64.
- Lagutin, O.V., Zhu, C.C., Kobayashi, D., Topczewski, J., Shimamura, K., Puelles, L., Russell, H.R., McKinnon, P.J., Solnica-Krezel, L., Oliver, G. (2003).** Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development. *Genes Dev* 17, 368-379.

## Bibliografía

---

- Lara, J.M., Velasco, A., Alonso, J.R., Aijón, J. (1995).** The neuroglia in the CNS of teleost. En: Vernadakis, A., Roots, B.I. (eds): "Neuroglia interrelations during phylogeny. I. Phylogeny and ontogeny of glial cells". Totowa, Nueva Jersey: Humana Press Inc. 131-156.
- Laufer, M., Vanegas, H., (1974).** The optic tectum of a perciform teleost. II. Fine structure. *J Comp Neurol* 154, 61-96.
- Lepage, S.E., Bruce, A.E. (2010).** Zebrafish epiboly: mechanics and mechanisms. *Int J Dev Biol* 54, 1213-1228.
- LePlat, G. (1919).** Action du milieu sur le développement des larves d'amphibiens. Localisation et différenciation des premières ébauches oculaires chez les vertébrés. Cyclopie et anophtalmie. *Arch de Biol* 30, 231-321.
- Lesaffre, B., Joliot, A., Prochiantz, A., and Volovitch, M. (2007).** Direct non-cell autonomous Pax6 activity regulates eye development in the zebrafish. *Neural Dev* 2, 2.
- Li, H., Tierney, C., Wen, L., Wu, J.Y., Rao, Y. (1997).** A single morphogenetic field gives rise to two retina primordia under the influence of the prechordal plate. *Development* 124, 603-615.
- Li, H., Wagner, E., McCaffery, P., Smith, D., Andreadis, A., Drager, U.C. (2000).** A retinoic acid synthesizing enzyme in ventral retina and telencephalon of the embryonic mouse. *Mech Dev* 95, 283-289.
- Li, R., Liang, J., Ni, S., Zhou, T., Qing, X., Li, H., He, W., Chen, J., Li, F., Zhuang, Q. Qin, B., Xu, J., Li, W., Yang, J., Gan, Y., Qin, D., Feng, S., Song, H., Yang, D., Zhang, B., Zeng, L., Lai, L., Esteban, M.A., Pei, D. (2010).** A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 7, 51-63.
- Li, Y.X., Yang, H.T., Zdanowicz, M., Sicklick, J.K., Qi, Y., Camp, T. J., Diehl, A.M. (2007).** Fetal alcohol exposure impairs Hedgehog cholesterol modification and signaling. *Lab Invest* 87, 231-240.
- Liu, Q., Marrs, J.A., Chuang, J.C., Raymond, P.A. (2001).** Cadherin-4 expression in the zebrafish central nervous system and regulation by ventral midline signaling. *Brain Res Dev Brain Res* 131, 17-29.
- Liu, X., Huang, S., Ma, J., Li, C., Zhang, Y., Luo, L. (2009).** NF-kappaB and Snail1a coordinate the cell cycle with gastrulation. *J Cell Biol* 184, 805-815.
- Livesey, F.J., Cepko, C.L. (2001).** Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina. *Nat Rev Neurosci* 2(2), 109-118.
- Loosli, F., Winkler, S., Burgtorf, C., Wurmbach, E., Ansorge, W., Henrich, T., Grabher, C., Arendt, D., Carl, M., Krone, A., Grzebisz, E., Wittbrodt, J. (2001).** Medaka eyeless is the key factor linking retinal determination and eye growth. *Development* 128, 4035-4044.
- López-Ríos, J., Tessmar, K., Loosli, F., Wittbrodt, J., Bovolenta, P. (2003).** Six3 and Six6 activity is modulated by members of the groucho family. *Development* 130, 185-195.
- Loucks, E., Carvan, M.J., III (2004).** Strain-dependent effects of developmental ethanol exposure in zebrafish. *Neurotoxicol Teratol* 26, 745-755.
- Loucks, E.J., Schwend, T., Ahlgren, S.C. (2007).** Molecular changes associated with teratogen-induced cycloopia. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 79, 642-651.
- Loucks, E.J., Ahlgren, S.C. (2009).** Deciphering the role of Shh signaling in axial defects produced by ethanol exposure. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 85, 556-567.
- Lupo, G., Liu, Y., Qiu, R., Chandraratna, R.A., Barsacchi, G., He, R. Q., Harris, W.A. (2005).** Dorsoventral patterning of the *Xenopus* eye: a collaboration of Retinoid, Hedgehog and FGF receptor signaling. *Development* 132, 1737-1748.
- Ma, C., Moses, K. (1995).** Wingless and patched are negative regulators of the morphogenetic furrow and can affect tissue polarity in the developing *Drosophila* compound eye. *Development* 121, 2279-2289.

- Macdonald, R., Barth, K.A., Xu, Q., Holder, N., Mikkola, I., Wilson, S.W. (1995).** Midline signalling is required for Pax gene regulation and patterning of the eyes. *Development* 121, 3267-3278.
- Macdonald, R., Scholes, J., Strahle, U., Brennan, C., Holder, N., Brand, M., Wilson, S.W. (1997).** The Pax protein Noi is required for commissural axon pathway formation in the rostral forebrain. *Development* 124, 2397-2408.
- Manzo-Avalos, S., Saavedra-Molina, A. (2010).** Cellular and mitochondrial effects of alcohol consumption. *Int J Environ Res Public Health* 7, 4281-4304.
- Marlow, F., Zwartkruis, F., Malicki, J., Neuhauss, S.C., Abbas, L., Weaver, M., Driever, W., Solnica-Krezel, L. (1998).** Functional interactions of genes mediating convergent extension, knypek and trilobite, during the partitioning of the eye primordium in zebrafish. *Dev Biol* 203, 382-399.
- Marlow, F., Topczewski, J., Sepich, D., Solnica-Krezel, L. (2002).** Zebrafish Rho kinase 2 acts downstream of Wnt11 to mediate cell polarity and effective convergence and extension movements. *Curr Biol* 12, 876-884.
- Marrs, J.A., Clendenon, S.G., Ratcliffe, D.R., Fielding, S.M., Liu, Q., Bosron, W.F. (2010).** Zebrafish fetal alcohol syndrome model: effects of ethanol are rescued by retinoic acid supplement. *Alcohol* 44, 707-715.
- Marshall, A.G., McCarthy, M.M., Brishnehan, K.M., Rao, V., Batia, L.M., Gupta, M., Das, S., Mitra, N.K., Chaudhuri, J.D. (2009).** Effect of gestational ethanol exposure on parvalbumin and calretinin expressing hippocampal neurons in a chick model of fetal alcohol syndrome. *Alcohol* 43, 147-161.
- Martínez-Morales, J.R., Dolez, V., Rodrigo, I., Zaccarini, R., Leconte, L., Bovolenta, P., Saule, S. (2003).** Otx2 activates the molecular network underlying retina pigment epithelium differentiation. *J Biol Chem* 278, 21721-21731.
- Martínez-Morales, J.R., Rembold, M., Greger, K., Simpson, J.C., Brown, K.E., Quiring, R., Pepperkok, R., Martin-Bermudo, M.D., Himmelbauer, H., Wittbrodt, J. (2009).** Ojoplano-mediated basal constriction is essential for optic cup morphogenesis. *Development* 136, 2165-2175.
- Martínez, S.E., Lázaro-Diéguez, F., Selva, J., Calvo, F., Piqueras, J.R., Crespo, P., Claro, E., Egea, G. (2007).** Lysophosphatidic acid rescues RhoA activation and phosphoinositides levels in astrocytes exposed to ethanol. *J Neurochem* 102, 1044-1052.
- Masai, I., Stemple, D.L., Okamoto, H., Wilson, S.W. (2000).** Midline signals regulate retinal neurogenesis in zebrafish. *Neuron* 27, 251-263.
- Mathers, P.H., Grinberg, A., Mahon, K.A., Jamrich, M. (1997).** The Rx homeobox gene is essential for vertebrate eye development. *Nature* 387, 603-607.
- Matsui, J.I., Egana, A.L., Sponholtz, T.R., Adolph, A.R., Dowling, J.E. (2006).** Effects of ethanol on photoreceptors and visual function in developing zebrafish. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47, 4589-4597.
- Matsui, T., Amano, M., Yamamoto, T., Chihara, K., Nakafuku, M., Ito, M., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K. (1996).** Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J* 15, 2208-2216.
- Matsumoto, I. (2009).** Proteomics approach in the study of the pathophysiology of alcohol-related brain damage. *Alcohol Alcohol* 44, 171-176.
- Maurus, D., Harris, W.A. (2009).** Zic-associated holoprosencephaly: zebrafish Zic1 controls midline formation and forebrain patterning by regulating Nodal, Hedgehog, and retinoic acid signaling. *Genes Dev* 23, 1461-1473.
- Meek, J., Nieuwenhuys, R. (1998).** Holosteans and teleosts. En: Nieuwenhuys, R., Donkelaar, H.J., Nicholson, C. (eds): "The Central Nervous System of Vertebrates". *Berlin: Springer Verlag*, 759-937.
- McNeil, E., Capaldo, C.T., Macara, I.G. (2006).** Zonula occludens-1 function in the assembly of tight junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell* 17, 1922-1932.

- Medina-Martínez, O., Amaya-Manzanares, F., Liu, C., Mendoza, M., Shah, R., Zhang, L., Behringer, R.R., Mahon, K.A., Jamrich, M. (2009).** Cell-autonomous requirement for rx function in the mammalian retina and posterior pituitary. *PLoS One* 4, 4513.
- Miller, M.W., Mooney, S.M., Middleton, F.A. (2006).** Transforming growth factor beta1 and ethanol affect transcription and translation of genes and proteins for cell adhesion molecules in B104 neuroblastoma cells. *J Neurochem* 97, 1182-1190.
- Miñambres, R., Guasch, R.M., Pérez-Arago, A., Guerri, C. (2006).** The RhoA/ROCK-1/MLC pathway is involved in the ethanol-induced apoptosis by anoikis in astrocytes. *J Cell Sci* 119, 271-282.
- Moens, C.B., Cordes, S.P., Giorgianni, M.W., Barsh, G.S., Kimmel, C.B. (1998).** Equivalence in the genetic control of hindbrain segmentation in fish and mouse. *Development* 125, 381-391.
- Montero, J.A., Carvalho, L., Wilsch-Brauninger, M., Kilian, B., Mustafa, C., Heisenberg, C.P. (2005).** Shield formation at the onset of zebrafish gastrulation. *Development* 132, 1187-1198.
- Moore, K.B., Mood, K., Daar, I.O., Moody, S.A. (2004).** Morphogenetic movements underlying eye field formation require interactions between the FGF and ephrinB1 signaling pathways. *Dev Cell* 6, 55-67.
- Mori, H., Miyazaki, Y., Morita, T., Nitta, H., Mishina, M. (1994).** Different spatio-temporal expressions of three otx homeoprotein transcripts during zebrafish embryogenesis. *Brain Res Mol Brain Res* 27, 221-231.
- Morris, A.C., Fadool, J.M. (2005).** Studying rod photoreceptor development in zebrafish. *Physiol Behav* 86, 306-313.
- Morse, D.E., McCann, P.S. (1984).** Neuroectoderm of the early embryonic rat eye. Scanning electron microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25, 899-907.
- Nagai, T., Aruga, J., Takada, S., Gunther, T., Sporle, R., Schughart, K., Mikoshiba, K. (1997).** The expression of the mouse Zic1, Zic2, and Zic3 gene suggests an essential role for Zic genes in body pattern formation. *Dev Biol* 182, 299-313.
- Nakaya, Y., Kuroda, S., Katagiri, Y.T., Kaibuchi, K., Takahashi, Y. (2004).** Mesenchymal-epithelial transition during somitic segmentation is regulated by differential roles of Cdc42 and Rac1. *Dev Cell* 7, 425-438.
- Nelson, S.M., Park, L., Stenkamp, D.L. (2009).** Retinal homeobox 1 is required for retinal neurogenesis and photoreceptor differentiation in embryonic zebrafish. *Dev Biol* 328, 24-39.
- Nieto, M.A. (2002).** The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 155-166.
- Nieuwkoop, P.D., Johnen, A.G., Albers, B. (1985).** The epigenetic nature of early chordate development. *Cambridge University Press*.
- Nobes, C.D., Lauritzen, I., Mattei, M.G., Paris, S., Hall, A., Chardin, P. (1998).** A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J Cell Biol* 141, 187-197.
- Nyholm, M.K., Abdelilah-Seyfried, S., Grinblat, Y. (2009).** A novel genetic mechanism regulates dorsolateral hinge-point formation during zebrafish cranial neurulation. *J Cell Sci* 122, 2137-2148.
- Ogata, S., Morokuma, J., Hayata, T., Kolle, G., Niehrs, C., Ueno, N., Cho, K.W. (2007).** TGF-beta signaling-mediated morphogenesis: modulation of cell adhesion via cadherin endocytosis. *Genes Dev* 21, 1817-1831.
- Ozdamar, B., Bose, R., Barrios-Rodiles, M., Wang, H.R., Zhang, Y., Wrana, J.L. (2005).** Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* 307, 1603-1609.
- Parng, C. (2005).** In vivo zebrafish assays for toxicity testing. *Curr Opin Drug Discov Devel* 8, 100-106.
- Parng, C., Roy, N.M., Ton, C., Lin, Y., McGrath, P. (2007).** Neurotoxicity assessment using zebrafish. *J Pharmacol Toxicol Methods* 55, 103-112.

- Parrilla, M., Lillo, C., Herrero-Turrión, M.J., Arévalo, R., Lara, J.M., Aijón, J., Velasco, A. (2009).** Pax2 in the optic nerve of the goldfish, a model of continuous growth. *Brain Res* 1255, 75-88.
- Pasquier, L., Dubourg, C., Blayau, M., Lázaro, L., Le, M.B., David, V., Odent, S. (2000).** A new mutation in the six-domain of SIX3 gene causes holoprosencephaly. *Eur J Hum Genet* 8, 797-800.
- Paul, A.P., Pohl-Guimaraes, F., Krahe, T.E., Filgueiras, C.C., Lantz, C.L., Colello, R.J., Wang, W., Medina, A.E. (2010).** Overexpression of serum response factor restores ocular dominance plasticity in a model of fetal alcohol spectrum disorders. *J Neurosci* 30, 2513-2520.
- Peng, Y., Yang, P.H., Ng, S.S., Wong, O.G., Liu, J., He, M.L., Kung, H.F., Lin, M.C. (2004).** A critical role of Pax6 in alcohol-induced fetal microcephaly. *Neurobiol Dis* 16, 370-376.
- Peterson, R.T., Nass, R., Boyd, W.A., Freedman, J.H., Dong, K., Narahashi, T. (2008).** Use of non-mammalian alternative models for neurotoxicological study. *Neurotoxicology* 29, 546-555.
- Pezeron, G., Lambert, G., Dickmeis, T., Strahle, U., Rosa, F.M., Mourrain, P. (2008).** Rasl11b knock down in zebrafish suppresses one-eyed-pinhead mutant phenotype. *PLoS One* 3, 1434.
- Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharyya, S., Grunz, H., Bouwmeester, T., De Robertis, E.M. (1999).** The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* 397, 707-710.
- Pinazo-Duran, M.D., Renau-Piqueras, J., Guerri, C. (1993).** Developmental changes in the optic nerve related to ethanol consumption in pregnant rats: analysis of the ethanol-exposed optic nerve. *Teratology* 48, 305-322.
- Pistocchi, A., Feijoo, C.G., Cabrera, P., Villablanca, E.J., Allende, M.L., Cotelli, F. (2009).** The zebrafish prospero homolog prox1 is required for mechanosensory hair cell differentiation and functionality in the lateral line. *BMC Dev Biol* 9, 58.
- Polifka, J.E., Friedman, J.M. (2002).** Medical genetics: 1. Clinical teratology in the age of genomics *CMAJ* 167, 265-273.
- Ramanathan, R., Wilkemeyer, M.F., Mittal, B., Perides, G., Charness, M.E. (1996).** Alcohol inhibits cell-cell adhesion mediated by human L1. *J Cell Biol* 133, 381-390.
- Ramón y Cajal, S. (1889).** Sistema visual, órgano receptor de la excitación visual o retina. En: "Textura del sistema nervioso del hombre y los vertebrados". Madrid, Imp. Nicolás Moya.
- Ramón y Cajal, S. (1892).** La rétine des vertébrés. *Cellule* 9, 121-225.
- Rebagliati, M.R., Toyama, R., Haffter, P., Dawid, I.B. (1998).** *cyclops* encodes a nodal-related factor involved in midline signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 9932-9937.
- Reimers, M.J., Flockton, A.R., Tanguay, R.L. (2004).** Ethanol- and acetaldehyde-mediated developmental toxicity in zebrafish. *Neurotoxicol Teratol* 26, 769-781.
- Reimers, M.J., La Du, J.K., Periera, C.B., Giovanini, J., Tanguay, R.L. (2006).** Ethanol-dependent toxicity in zebrafish is partially attenuated by antioxidants. *Neurotoxicol Teratol* 28, 497-508.
- Rembold, M., Loosli, F., Adams, R.J., Wittbrodt, J. (2006).** Individual cell migration serves as the driving force for optic vesicle evagination. *Science* 313, 1130-1134.
- Ridley, A.J., Hall, A. (1992).** The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389-399.
- Riou, P., Villalonga, P., Ridley, A.J. (2010).** Rnd proteins: multifunctional regulators of the cytoskeleton and cell cycle progression. *Bioessays* 32, 986-992.
- Robin, M.A., Sauvage, I., Grandperret, T., Descatoire, V., Pessayre, D., Fromenty, B. (2005).** Ethanol increases mitochondrial cytochrome P450 2E1 in mouse liver and rat hepatocytes. *FEBS Lett* 579, 6895-6902.

- Rossi, M.A., Zucoloto, S. (1977). Effect of chronic ethanol ingestion on the small intestinal ultrastructure in rats. *Beitr Pathol* 161, 50-61.
- Saloman, D.S., Bianco, C., Ebert, A.D., Khan, N.I., De, S.M., Normanno, N., Wechselberger, C., Seno, M., Williams, K., Sanicola, M., Foley, S., Gullick, W.J., Persico, G. (2000). The EGF-CFC family: novel epidermal growth factor-related proteins in development and cancer. *Endocr Relat Cancer* 7, 199-226.
- Sampath, K., Rubinstein, A.L., Cheng, A.M., Liang, J.O., Fekany, K., Solnica-Krezel, L., Korzh, V., Halpern, M.E., Wright, C.V. (1998). Induction of the zebrafish ventral brain and floorplate requires cyclops/nodal signalling. *Nature* 395, 185-189.
- Sánchez-Simón, F.M., Arenzana, F.J., Rodríguez, R.E. (2010). *In vivo* effects of morphine on neuronal fate and opioid receptor expression in zebrafish embryos. *Eur J Neurosci* 32, 550-559.
- Sanek, N.A., Grinblat, Y. (2008). A novel role for zebrafish *zic2a* during forebrain development. *Dev Biol* 317, 325-335.
- Sanek, N.A., Taylor, A.A., Nyholm, M.K., Grinblat, Y. (2009). Zebrafish *zic2a* patterns the forebrain through modulation of Hedgehog-activated gene expression. *Development* 136, 3791-3800.
- 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*. Universidad de Salamanca
- Schauerte, H.E., van Eeden, F.J., Fricke, C., Odenthal, J., Strahle, U., Haffter, P. (1998). Sonic hedgehog is not required for the induction of medial floor plate cells in the zebrafish. *Development* 125, 2983-2993.
- Schmitt, E.A., Dowling, J.E. (1994). Early eye morphogenesis in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J Comp Neurol* 344, 532-542.
- Shahidullah, M., Harris, T., Germann, M.W., Covarrubias, M. (2003). Molecular features of an alcohol binding site in a neuronal potassium channel. *Biochemistry* 42, 11243-11252.
- Shkumatava, A., Fischer, S., Muller, F., Strahle, U., Neumann, C.J. (2004). Sonic hedgehog, secreted by amacrine cells, acts as a short-range signal to direct differentiation and lamination in the zebrafish retina. *Development* 131, 3849-3858.
- Shook, D., Keller, R. (2003). Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mech Dev* 120, 1351-1383.
- Slater, S.J., Cook, A.C., Seiz, J.L., Malinowski, S.A., Stagliano, B.A., Stubbs, C.D. (2003). Effects of ethanol on protein kinase C alpha activity induced by association with Rho GTPases. *Biochemistry* 42, 12105-12114.
- Sobrian, S.K., Jones, B.L., James, H., Kamara, F.N., Holson, R.R. (2005). Prenatal ethanol preferentially enhances reactivity of the dopamine D1 but not D2 or D3 receptors in offspring. *Neurotoxicol Teratol* 27, 73-93.
- Spemann, H. (1938). Embryonic Development and Induction. *New York, Yale University Press*.
- Springer, A.D., Gaffney, J.S. (1981). Retinal projections in the goldfish: a study using cobaltous-lysine. *J Comp Neurol* 203, 401-424.
- Steed, E., Balda, M.S., Matter, K. (2010). Dynamics and functions of tight junctions. *Trends Cell Biol* 20, 142-149.
- Stenkamp, D.L., Frey, R.A., Prabhudesai, S.N., Raymond, P.A. (2000). Function for Hedgehog genes in zebrafish retinal development. *Dev Biol* 220, 238-252.
- Stockard, C.R. (1910). The influence of alcohol and other anaesthetics on embryonic development. *Am J Anat* 10, 369-392.
- Stockard, C.R. (1914). The artificial production of eye abnormalities in the chick embryo. *Anat Rec* 8, 33-41.
- Stromland, K., Pinazo-Duran, M.D. (1994). Optic nerve hypoplasia: comparative effects in children and rats exposed to alcohol during pregnancy. *Teratology* 50, 100-111.



- Strömland, K. (2004).** Visual impairment and ocular abnormalities in children with fetal alcohol syndrome. *Addict Biol* 9, 153-157.
- Svoboda, K.K., O'Shea, K.S. (1987).** An analysis of cell shape and the neuroepithelial basal lamina during optic vesicle formation in the mouse embryo. *Development* 100, 185-200.
- Sylvain, N.J., Brewster, D.L., Ali, D.W. (2010).** Zebrafish embryos exposed to alcohol undergo abnormal development of motor neurons and muscle fibers. *Neurotoxicol Teratol* 32, 472-480.
- Tada, M., Kai, M. (2009).** Noncanonical Wnt/PCP signaling during vertebrate gastrulation. *Zebrafish* 6, 29-40.
- Talens-Visconti, R., Sánchez-Vera, I., Kostic, J., Pérez-Arago, M.A., Erceg, S., Stojkovic, M., Guerri, C. (2011).** Neural differentiation from human embryonic stem cells as a tool to study early brain development and the neuroteratogenic effects of ethanol. *Stem Cells Dev* 20, 327-339.
- Thompson, I. and Holt, C. (1989).** Effects of intraocular tetrodotoxin on the development of the retinocollicular pathway in the Syrian hamster. *J Comp Neurol* 282, 371-388.
- Tierney, K.B. (2011).** Behavioural assessments of neurotoxic effects and neurodegeneration in zebrafish. *Biochim Biophys Acta* 1812, 381-389.
- Toyama, R., Gomez, D.M., Mana, M.D., Dawid, I.B. (2004).** Sequence relationships and expression patterns of zebrafish *zic2* and *zic5* genes. *Gene Expr Patterns* 4, 345-350.
- Trevarrow, B., Marks, D.L., Kimmel, C.B. (1990).** Organization of hindbrain segments in the zebrafish embryo. *Neuron* 4, 669-679.
- Tucker, P., Laemle, L., Munson, A., Kanekar, S., Oliver, E.R., Brown, N., Schlecht, H., Vetter, M., Glaser, T. (2001).** The eyeless mouse mutation (*ey1*) removes an alternative start codon from the *Rx/rax* homeobox gene. *Genesis* 31, 43-53.
- Uban, K.A., Sliwowska, J.H., Lieblich, S., Ellis, L.A., Yu, W.K., Weinberg, J., Galea, L.A. (2010).** Prenatal alcohol exposure reduces the proportion of newly produced neurons and glia in the dentate gyrus of the hippocampus in female rats. *Horm Behav* 58, 835-843.
- Ulrich, F., Concha, M.L., Heid, P.J., Voss, E., Witzel, S., Roehl, H., Tada, M., Wilson, S.W., Adams, R.J., Soll, D.R., Heisenberg, C.P. (2003).** *Slb/Wnt11* controls hypoblast cell migration and morphogenesis at the onset of zebrafish gastrulation. *Development* 130, 5375-5384.
- Ulrich, F., Krieg, M., Schotz, E.M., Link, V., Castanon, I., Schnabel, V., Taubenberger, A., Mueller, D., Puech, P.H., Heisenberg, C.P. (2005).** *Wnt11* functions in gastrulation by controlling cell cohesion through *Rab5c* and *E-cadherin*. *Dev Cell* 9, 555-564.
- Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M., Tsukita, S. (2006).** *ZO-1* and *ZO-2* independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* 126, 741-754.
- Vanegas, H., Ebbeson, S.O.E., Laufer, M. (1984).** Morphological aspects of the teleostean optic tectum. En: Vaengas, H. (eds.): "Comparative neurology of the optic tectum". Nueva York: Plenum Press, 93-120.
- Varga, Z.M., Wegner, J., Westerfield, M. (1999).** Anterior movement of ventral diencephalic precursors separates the primordial eye field in the neural plate and requires cyclops. *Development* 126, 5533-5546.
- Wallis, D.E., Roessler, E., Hehr, U., Nanni, L., Wiltshire, T., Richieri-Costa, A., Gillessen-Kaesbach, G., Zackai, E.H., Rommens, J., Muenke, M. (1999).** Mutations in the homeodomain of the human *SIX3* gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet* 22, 196-198.
- Warga, R.M., Kimmel, C.B. (1990).** Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish. *Development* 108, 569-580.
- Warga, R.M., Kane, D.A. (2003).** One-eyed pinhead regulates cell motility independent of Squint/Cyclops signaling. *Dev Biol* 261, 391-411.

- Warr, N., Powles-Glover, N., Chappell, A., Robson, J., Norris, D., Arkell, R.M. (2008). Zic2-associated holoprosencephaly is caused by a transient defect in the organizer region during gastrulation. *Hum Mol Genet* 17, 2986-2996.
- Weiser, B., Gonye, G., Sykora, P., Crumm, S., Cahill, A. (2011). Chronic ethanol feeding causes depression of mitochondrial elongation factor Tu in the rat liver: implications for the mitochondrial ribosome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*.
- Weiser, D.C., Row, R.H., Kimelman, D. (2009). Rho-regulated myosin phosphatase establishes the level of protrusive activity required for cell movements during zebrafish gastrulation. *Development* 136, 2375-2384.
- Wennerberg, K., Der, C.J. (2004). Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* 117, 1301-1312.
- Wilkemeyer, M.F., Sebastian, A.B., Smith, S.A., Charness, M.E. (2000). Antagonists of alcohol inhibition of cell adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 3690-3695.
- Wilson, S.W., Houart, C. (2004). Early steps in the development of the forebrain. *Dev Cell* 6, 167-181.
- Winkler, S., Loosli, F., Henrich, T., Wakamatsu, Y., Wittbrodt, J. (2000). The conditional medaka mutation eyeless uncouples patterning and morphogenesis of the eye. *Development* 127, 1911-1919.
- Wong, E.V., Kenwrick, S., Willems, P., Lemmon, V. (1995). Mutations in the cell adhesion molecule L1 cause mental retardation. *Trends Neurosci* 18, 168-172.
- Wunnenberg-Stapleton, K., Blitz, I.L., Hashimoto, C., Cho, K.W. (1999). Involvement of the small GTPases XRhoA and XRnd1 in cell adhesion and head formation in early *Xenopus* development. *Development* 126, 5339-5351.
- Yamanaka, H., Moriguchi, T., Masuyama, N., Kusakabe, M., Hanafusa, H., Takada, R., Takada, S., Nishida, E. (2002). JNK functions in the non-canonical Wnt pathway to regulate convergent extension movements in vertebrates. *EMBO Rep* 3, 69-75.
- Yamashita, S., Miyagi, C., Fukada, T., Kagara, N., Che, Y.S., Hirano, T. (2004). Zinc transporter LIV1 controls epithelial-mesenchymal transition in zebrafish gastrula organizer. *Nature* 429, 298-302.
- Yelin, R., Schyr, R.B., Kot, H., Zins, S., Frumkin, A., Pillemer, G., Fainsod, A. (2005). Ethanol exposure affects gene expression in the embryonic organizer and reduces retinoic acid levels. *Dev Biol* 279, 193-204.
- Yelin, R., Kot, H., Yelin, D., Fainsod, A. (2007). Early molecular effects of ethanol during vertebrate embryogenesis. *Differentiation* 75, 393-403.
- Yoshihara, Y., De, R.M., Muller, D. (2009). Dendritic spine formation and stabilization. *Curr Opin Neurobiol* 19, 146-153.
- Zaghloul, N.A., Moody, S.A. (2007). Alterations of rx1 and pax6 expression levels at neural plate stages differentially affect the production of retinal cell types and maintenance of retinal stem cell qualities. *Dev Biol* 306, 222-240.
- Zhang, J.J., Piontek, J., Wolburg, H., Piehl, C., Liss, M., Otten, C., Christ, A., Willnow, T.E., Blasig, I.E., Abdelilah-Seyfried, S. (2010). Establishment of a neuroepithelial barrier by claudin5a is essential for zebrafish brain ventricular lumen expansion. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 1425-1430.
- Zhang, Y., Shao, M., Wang, L., Liu, Z., Gao, M., Liu, C., Zhang, H. (2010). Ethanol exposure affects cell movement during gastrulation and induces split axes in zebrafish embryos. *Int J Dev Neurosci* 28, 283-288.
- Zhu, S., Liu, L., Korzh, V., Gong, Z., Low, B.C. (2006). RhoA acts downstream of Wnt5 and Wnt11 to regulate convergence and extension movements by involving effectors Rho kinase and Diaphanous: use of zebrafish as an in vivo model for GTPase signaling. *Cell Signal* 18, 359-372.
- Zuber, M.E., Gestri, G., Viczian, A.S., Barsacchi, G., Harris, W.A. (2003). Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development* 130, 5155-5167.

**Zupanc, G.K., Hinsch, K., Gage, F.H. (2005).** Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain. *J Comp Neurol* 488, 290-319.