

UCH - FC
Biotecnología
M298
C1

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



**“SEGUIMIENTO *IN VIVO* DEL PROCESO REGENERATIVO DE LA
LÍNEA LATERAL CAUDAL EN PEZ CEBRA ADULTO (*Danio
rerio*)”**



Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular, por:

CAMILA FRANCISCA MARDONES KRSULOVIC

Dr. Miguel Allende Connelly
Director de Seminario de Título

Diciembre 2010
Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta.:

CAMILA FRANCISCA MARDONES KRSULOVIC

Titulado:

“SEGUIMIENTO *IN VIVO* DEL PROCESO REGENERATIVO DE LA LÍNEA LATERAL CAUDAL EN PEZ CEBRA ADULTO (*Danio rerio*)”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Dr. Miguel Allende Connelly
Director Seminario de Título

Miguel Allende

Comisión de Evaluación

Dr. Alejandro Roth
Presidente Comisión

Alejandro Roth

Dr. Álvaro Glavic
Evaluador

Álvaro Glavic

Santiago de Chile, Diciembre 2010

AUTOBIOGRAFÍA



El 5 de Marzo de 1986 a las 21:05 minutos fue el momento en el cual llegué al mundo en una pequeña Clínica de Santiago. Mi infancia la viví en Buin, una comuna de la Región Metropolitana ubicada a 35 Km de la Capital, lugar hermoso y tranquilo. Mis “estudios” partieron a los 3 meses de vida, cuando ingresé al Jardín Los Tres Chanchitos, lugar del cual conservo grandes recuerdos dados por esos 4 años de vivencias. A los 5 años ingresé al Instituto Sagrado Corazón de San Bernardo, Kinder D fue mi curso y María José mi compañera de banco. Permanecí en el “D” hasta 8°, momento en el cual migramos con mis padres y mi hermana menor a Santiago, para ingresar al Liceo Carmela Carvajal de Prat. La enseñanza media la cursé en dicho Liceo, lo cual me permitió ver distintas realidades de vida y además me acercó al área de la Ciencia, específicamente a la Biología; personajes como “La Proto”(proveniente de *protozoo*) y Canavatti, transformaron un ramo cualquiera en una entretención. En el verano del 2003 ingresé al curso de verano de Biotecnología en la Universidad de Chile, en donde luego de una conversación con el Dr. Juan Asenjo, decidí estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular, no había otra opción. Y así fue. Mi lado más biológico me llevó a trabajar con el Dr. Miguel Allende, quien gentilmente abrió sus puertas a una inexperta de la Biología del Desarrollo y tuvo la voluntad de enseñarme mucho de lo que ahora sé. Tengo el privilegio de poder decir que tuve una fantástica estadía en Juan Gómez Milla, Campus con gran riqueza intelectual, humana, vegetal, una gran familia.



Con amor para Fani y Sergio



AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas y cada una de las personas que contribuyeron de manera directa e indirecta en el desarrollo de esta Tesis, no sólo con conocimiento sino que también con entusiasmo y apoyo.

Primero que todo están mis padres, sin ellos no sería lo que soy, ni estaría donde estoy. Gracias por sus enseñanzas, por sus consejos, por su ejemplo, por sus errores, por sus aciertos, por su cariño, por su comprensión, por ese apoyo incondicional que me han dado, y por la perseverancia que han mantenido para recordarme que "el mundo va mucho más allá de una molécula". Gracias a mi hermana Javiera, por mostrarme que hay muchas formas de mirar la vida, que por más lúgubre y desesperanzador que sea el panorama, siempre hay un rayo de luz que es capaz de clarificar las cosas.

A mi familia en general agradezco, por darme cabida y comprensión dentro del contexto humanista/artístico que nos invade.

Agradezco a la familia que encontré en el "Lab MA": Big Fish, Carmen, Darko, Sharo, Pez, Leo, Undu, Claudia, Pablo, Vivi; fueron los "zebras" que me acogieron y me enseñaron todo lo que no sabía de Biología del Desarrollo. A Cata, por traspasarme su amor y devoción hacia nuestros pecesillos. A Floro por sus consejos y ayuda. A Juanito, por las múltiples exquisiteces con las que semana a semana nos deleita y engorda. A mi "mundo científico": a Rafo, Pao, "Los cabros" e Ignacio, por el eterno apoyo, las múltiples alegrías, los consejos y las (no pocas) horas de estudio. A mi "mundo no científico": Pipi, Cota y Franche; por alegrar mis tardes y abstraerme de mi realidad.

Por último quiero agradecer a esa persona que me ayudó a recoger la confianza y seguridad perdida en el camino, a retomar el rumbo y recordarme lo mucho que amo BioDes, Juampi.



ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Restablecimiento de estructuras o tejidos perdidos y/o dañados en vertebrados	3
Regeneración en sistemas sensoriales de vertebrados	4
Pez cebra como modelo de regeneración	5
Componente sensorial del pez cebra: la línea lateral	6
Desarrollo embrionario y post-embrionario de la línea lateral	9
Procesos de adición de neuromastos	10
Regeneración de la aleta caudal del pez cebra	11
HIPÓTESIS	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
Cuidado, manejo y cirugía de peces	15
Caracterización de transgénicos adultos	16
Tinción con DiAsp	16
Observaciones en lupa/microscopio de fluorescencia y procesamiento de Imágenes	16
Marcaje con trazador celular Dil	17
Cuento de células ciliadas	17
RESULTADOS	18
Identificación de precursores de neuromastos en regeneración en adultos	18
1) <i>Et#20</i> o <i>Et(krt4:EGFP)sqet20</i>	21
2) <i>Brn3c</i> o <i>pou4f3:mGFP</i>	21
3) <i>Sox3h7</i> o <i>βgloSOX3h7:GFP</i>	22
4) <i>CldnB</i> o <i>Tg(-8.0cldnb:lynGFP)zf106</i>	23
Seguimiento <i>in vivo</i> : Visión global del proceso regenerativo de la LLC	23
Capacidad mecanotransductora de neuromastos generados <i>de novo</i>	41
Potencial regenerativo de la línea lateral	42
Regeneración en mutantes de línea lateral en estadio adulto	42
Cuento de células ciliadas	44
DISCUSIÓN	50
CONCLUSIONES	59
PROYECCIONES	60
BIBLIOGRAFÍA	62



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pez cebra adulto, aletas y línea lateral.....	6
Figura 2. Tipos celulares de la línea lateral.....	8
Figura 3. LL en distintos estadios del desarrollo del pez cebra.....	10
Figura 4. Adición de neuromastos por nuevos primordios.....	11
Figura 5. Esquema (vista lateral) y fotografía (vista superior) de neuromastos de cepas transgénicas utilizadas.....	19
Figura 6. Resumen de visualización de la LLC realizada con todos los transgénicos.....	20
Figura 7. Ejemplo 1: Regeneración de línea lateral caudal de pez cebra transgénico Et#20.....	27
Figura 8. Ejemplo 2: Regeneración de línea lateral caudal de pez cebra transgénico Et#20.....	28
Figura 9. Ejemplo 3: Regeneración de línea lateral caudal de pez cebra transgénico Et#20.....	29
Figura 10. Ejemplo 4: Regeneración de línea lateral caudal de pez cebra transgénico Et#20.....	30
Figura 11. Ramificaciones de células interneuromásticas en línea lateral caudal previa al plano de amputación a los 3dpa en un pez cebra transgénico Et#20.....	31
Figura 12. Ejemplo 1: Regeneración de línea lateral caudal de pez cebra transgénico Brn3c.....	32
Figura 13. Variación de neuromastos finales durante regeneración.....	33
Figura 14. Ejemplo 2: Regeneración de línea lateral caudal de pez cebra transgénico Brn3c.....	34
Figura 15. Comportamiento de neuromastos finales en ejemplo 2.....	35
Figura 16. Ejemplo 3: Regeneración de línea lateral caudal de pez cebra transgénico Brn3c.....	36
Figura 17. Comportamiento de neuromastos finales en ejemplo 3.....	37
Figura 18. Regeneración de línea lateral caudal de pez cebra transgénico Sox3h7.....	38
Figura 19. Regeneración de línea lateral caudal de pez cebra transgénico Sox3h7.....	39
Figura 20. Regeneración de línea lateral caudal de pez cebra transgénico CldnB.....	40
Figura 21. Capacidad mecanotransductora de neuromastos generados <i>de novo</i> de pez transgénico Et#20.....	41
Figura 22. Ausencia de neuromastos en la aleta caudal de mutante <i>ody</i>	43
Figura 23. Conteo de las células ciliadas en los neuromastos próximos al sitio de corte durante el proceso regenerativo.....	45
Figura 24. Comportamiento de las células ciliadas en los neuromastos próximos al sitio de corte durante el proceso regenerativo.....	46
Figura 25. Variación de células ciliadas totales durante el proceso regenerativo.....	49



ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Cepas transgénicas de peces cebra utilizadas en el estudio del proceso regenerativo de la línea lateral caudal.	18
Tabla 2. Resumen del proceso global de regeneración.	26
Tabla 3. Datos de la variación del número de células ciliadas del último neuromasto, de 7 peces cebra transgénicos Brn3c durante los 7dpa.	46
Tabla 4. Datos de la variación del número de células ciliadas del último neuromasto durante los 7dpa, de los 2 peces cebra transgénicos Brn3c que tuvieron una excepcional regeneración.	47
Tabla 5. Número de células ciliadas pertenecientes a los NM1 totales.	48
Tabla 6. Normalización de datos y comparación de los tres periodos de tiempo.	48

LISTA DE ABREVIATURAS

AB	: cepa silvestre
CXCR4b	: receptor de la quimioquina SDF1a
DiAsp	: 4-((4 di-etilaminoestiril)-N-metilpiridinium iodado), tinción vital
Dil	: di-alquil-carbocianina I, marcador celular lipofílico
dpa	: día(s) post amputación
dpf	: día(s) post fertilización
GFP	: proteína fluorescente verde (<i>green fluorescent protein</i>), gen reportero
hpf	: hora(s) post fertilización
IM	: células interneurómicas
L1-L5	: 5 neuromastos que conforman la línea lateral primaria en embriones de pez cebra, generados a partir del primordio I
LLA	: línea lateral anterior, presente en la cabeza del pez
LLC	: línea lateral caudal, presente en la aleta caudal
LLP	: línea lateral posterior, línea lateral que ubicados en tronco y aleta del pez
NM	: neuromastos
<i>ody</i>	: mutante <i>odysseus</i> , mutante nulo para CXCR4b
primI	: primordio I
primII	: primordio II
primD	: primordio dorsal
<i>sdf1a</i>	: gen que codifica para la quimioquina "factor derivado del estroma 1a"
SDF1a	: quimioquina "factor derivado del estroma 1a"
T1-T3	: 3 neuromastos terminales generados por la partición y cese de la migración del primI. A partir de estos, se originan los neuromastos de la LLC
WT	: <i>wild type</i> , cepa silvestre propia

RESUMEN

La línea lateral (LL) es un sistema mecanosensorial de peces teleósteos y anfibios, conformado por órganos discretos denominados neuromastos. Éstos poseen una organización en forma de roseta con un núcleo mecano transductor conformado por células ciliadas. El pez cebra, cuenta con dicho sistema distribuido sobre la superficie de su cuerpo, a través de líneas horizontales que recorren el cuerpo de rostral a caudal.

El pez cebra, es capaz de regenerar múltiples estructuras, por esta razón, este animal es utilizado en estudios de regeneración. Una de ellas es la aleta caudal, y se utiliza debido a su fácil acceso, a su simétrica estructura y el limitado número de tipos celulares.

Observaciones sobre la regeneración de los neuromastos de la LLC muestran que, luego de la amputación parcial de la aleta caudal, ésta crece nuevamente y regenera la LLC. Sin embargo, los estudios hechos hasta ahora, sólo han observado material fijado e hibridaciones *in situ*.

En este trabajo estudiamos la regeneración de la LLC en peces cebra adultos *in vivo* con el fin de identificar precursores de los neuromastos generados *de novo*. Para esto, utilizamos cepas transgénicas con un gen reportero, GFP, expresado en los distintos tipos celulares de la LL. Mediante microscopía de fluorescencia se realizó el registro sucesivo de imágenes, se determinó que el proceso regenerativo no recapitula el proceso ontogénico y se confirmó la participación de las células del manto e interneuromásticas dentro del proceso regenerativo, involucrándolas directamente en la generación *de novo* de los neuromastos y el restablecimiento estructural de la LLC.

ABSTRACT

Lateral line is a mechanosensory organ present in teleost fish and amphibians. It is composed of discrete bodies called neuromast, which have a rosette-like organization and a mechanotransducer core formed by hair cells. In zebrafish, this system is distributed over the surface of body by extending lines from rostral to caudal.

During adulthood, zebrafish can regenerate multiple structures. In regeneration studies caudal fin has been used due to its accessibility, symmetrical structure and limited cell types.

Observations on lateral line regeneration in caudal fin have been previously described. After partial caudal fin amputation, it grows back and soon after, caudal lateral line regenerate as well. However, studies until now have been carried out using fixed material and *in situ* hybridization.

In this work, we studied caudal lateral line regeneration of adult fish *in vivo*, in order to identify the precursors of the neuromasts generated *de novo* during the regeneration process. For this, we used different zebrafish transgenic lines, which express reporter gene, GFP, in different cells types of lateral line system. After surgery, images of the regenerative process were recorded successively using fluorescent microscopy. We established that regenerative process does not recapitule ontogenic process, and confirmed that both mantle cell and interneuromastic cells participate directly in new neuromast generation and structural restoration of the caudal lateral line.

INTRODUCCIÓN

Restablecimiento de estructuras o tejidos perdidos y/o dañados en vertebrados

La **regeneración** es definida como la reactivación del desarrollo en la vida post embrionaria con el propósito de restablecer de manera íntegra un tejido o estructura que fue pérdida (Gilbert, 2003). En los vertebrados, este mecanismo junto con la **reparación**, forman parte de la estrategia que les permite recuperar, de manera total o parcial, sus tejidos frente a algún daño producido durante la vida del individuo. La **reparación** se promueve con el propósito de sustituir un tejido por otro que permita de manera parcial la viabilidad del tejido u órgano, pero este mecanismo no mantiene la identidad estructural ni funcional (Durán, 2009). En el proceso se produce inflamación, fibrosis y un tejido conectivo cicatrizado rico en colágeno (Poss et al., 2003). En cambio, la **regeneración** produce la sustitución del tejido tanto estructural como funcionalmente. Existen tres tipos de regeneración: I) la **regeneración morfoláctica**, esta clase de regeneración consiste en un remodelamiento de los tejidos preexistentes y luego un pequeño crecimiento, sin proliferación, en donde tejidos presentes previos al daño se transforman en los tejidos que se han perdido; II) la **regeneración compensatoria**, en donde existe división celular pero cada célula mantiene su función diferenciada, sin formar una masa de células indiferenciadas; y III) la **regeneración epimórfica o intercalar**, que es la restauración morfológica y funcional de una estructura o tejido perdido, a través de la formación de una masa de células indiferenciadas conocida como **blastema** (Durán, 2009; Gilbert, 2003; Poss et al. 2003). El blastema es una estructura especializada característica, que diferencia al proceso regenerativo del embrionario. Se forma una vez que la herida ha cerrado por la migración y reordenamiento de las células epiteliales del muñón sobre el sitio del corte, las que forman la epidermis de la herida o "capuchón" apical. Es bajo esta epidermis donde se ubica el blastema conformado por células mesenquimáticas menos diferenciadas que las células maduras del tejido dañado, las que presentan propiedades proliferativas aumentadas y

propiedades migratorias. La procedencia de dichas células que conforman el blastema, se desconoce y se infiere que podrían proceder de células que experimentan desdiferenciación o de células madres quiescentes (Poss et al. 2003).

Un hecho concreto, extraído a partir de las múltiples pruebas experimentales, es que la regeneración epimórfica raramente ocurre en vertebrados superiores, como los mamíferos, a diferencia de lo que ocurre en otros vertebrados inferiores como lo son urodelos y teleósteos. Dentro de este último grupo se ha demostrado que el proceso de regeneración ocurre incluso durante la adultez, capacidad que muy pocos animales mantienen en dicho estadio. Uno de estos casos es el teleósteo *Danio rerio*, o comúnmente conocido como **pez cebra**, el cual es capaz de regenerar múltiples estructuras, como lo son: aletas, nervio óptico, escamas, corazón, médula espinal, entre otros (Poss et al. 2003).

Regeneración en sistemas sensoriales de vertebrados

La regeneración en vertebrados ha sido observada en muy pocos casos, siendo aún más difícil que conserven la capacidad regenerativa en estadio adulto, y cuando es así, son tejidos con limitados grupos celulares. La capacidad regenerativa depende del animal, de su estadio de desarrollo y del tejido.

Algunos animales vertebrados son capaces de regenerar grupos de células y/o tejidos que se encuentran expuestos al medio ambiente y que por lo mismo, se encuentran propensos a sufrir alguna lesión o pérdida de células indispensables en la percepción de su entorno. El bulbo olfatorio es un ejemplo de una estructura que ocurre regeneración hasta en estadio adulto en mamíferos y durante toda la vida. En el bulbo y nervio olfatorio ocurre regeneración neural vía células madres neurales presentes en el epitelio olfatorio. Las neuronas de la retina de aves y mamíferos adultos son incapaces de regenerar después de una lesión, sin embargo la retina de peces teleósteos y tritones, puede regenerar, así como la de embriones de algunos vertebrados. En ranas, también se ha observado regeneración del nervio óptico y acústico. Las

neuronas del sistema auditivo de aves pueden regenerar cuando son sometidas a algún daño: las células ciliadas, tanto las de la cóclea como de la utrícula, son capaces de regenerar después de una lesión. Las células madres responsables de esta regeneración son las células de soporte presentes en el epitelio de ambas estructuras. Algo similar ocurre con el sistema de la línea lateral en salamandras. En mamíferos, el panorama no es tan esperanzador, ya que las células ciliadas normalmente no regeneran luego de un daño, causando sordera irreversible (Stocum, 2006).

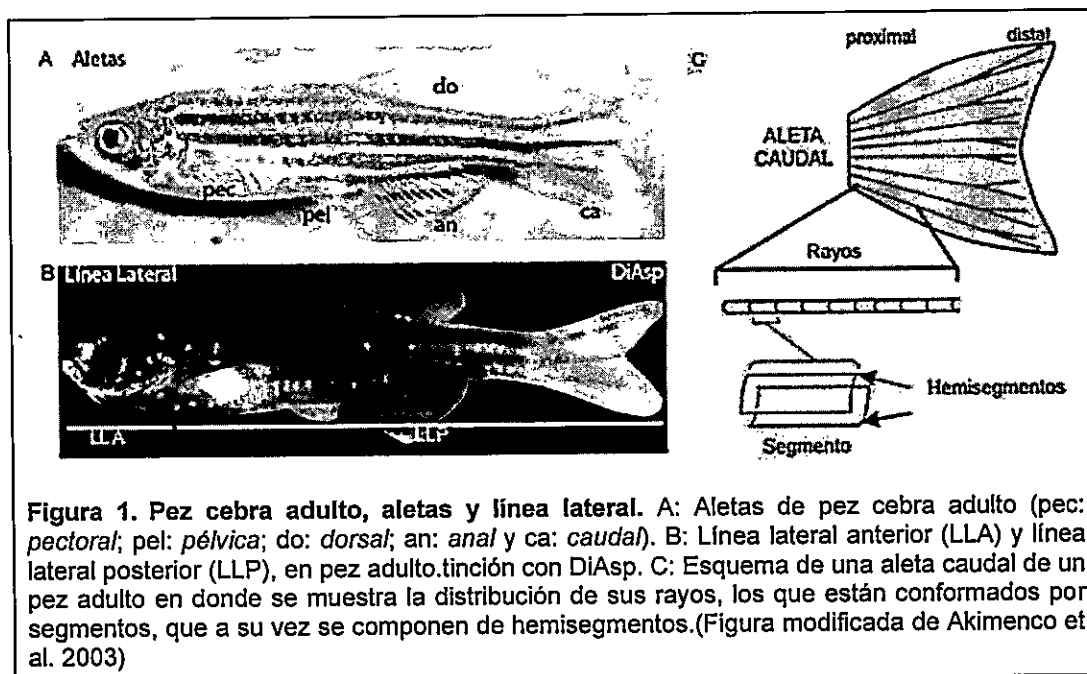
Pez cebra como modelo de regeneración

El pez cebra se ha introducido como un animal modelo más dentro del estudio de la regeneración, en el cual se abarcan preguntas que conciernen proliferación, coordinación celular, migración, entre otros.

En estudios de regeneración se ha utilizado ampliamente al pez cebra como modelo de estudio debido a su fácil manejo, al considerable número de individuos adultos con el que uno puede trabajar simultáneamente, a la rápida y total regeneración de diversas estructuras.. Además, se cuenta con una serie de herramientas genéticas como lo son: la amplia gama de cepas mutantes y transgénicas existentes debido al conocimiento total de su genoma y a la fácil manipulación de éste mismo (Poss et al. 2003).

Diversos estudios han demostrado que las cinco aletas del pez cebra adulto: pectoral (pec), dorsal (do), pélvica (pel), anal (an) y caudal (ca), (Figura 1A) son capaces de regenerar luego de una amputación parcial (Poss et al. 2003). Estos estudios se han focalizado casi exclusivamente en la aleta caudal debido a su fácil acceso y a los limitados tipos celulares que esta presenta. Dentro de las estructuras presentes en la aleta caudal se encuentran: segmentos óseos que conforman los rayos paralelos, esqueleto que da sostén a la aleta (Figura 1C); capilares arteriales, ubicados dentro de cada hemirrayo que forman el esqueleto, mientras que

los capilares venosos se ubican junto con los axones sensoriales entre los hemirrayos; tejido muscular, encargado del movimiento durante la natación (Akimenko et al. 2003); nervios sensoriales y el sistema de la línea lateral, el cual forma parte del sistema mecanosensorial del pez (Figura 1B) (Dufourcq (b) et al. 2006).



Componente sensorial del pez cebra: la línea lateral

La línea lateral del pez cebra es un sistema mecanosensorial distribuido de manera ordenada sobre la superficie de ambos lados de su cuerpo (Wada et al. 2008). Al permitirle percibir cambios en su entorno, se le relaciona con conductas de apareamiento, escape frente a depredadores, captura de alimento, entre otras (David et al 2002). Tanto la línea lateral como los nervios asociados a ella se desarrollan a partir de engrosamientos del ectoderma cefálico.

La línea lateral se ha dividido en dos partes de acuerdo con su ubicación: la primera es la **línea lateral anterior**, la que se encuentra en la epidermis de la cabeza del pez, alrededor del ojo y sobre la epidermis opercular; mientras que la segunda es la **línea lateral posterior**, la que

se distribuye sobre toda la parte trasera del animal. Ésta última se subdivide en dos: la línea lateral que se distribuye a lo largo del tronco del animal, sobre el miosepto horizontal y la línea lateral que se encuentra en la aleta caudal del pez, la que se conoce con el nombre de **línea lateral caudal o LLC** (Figura 1B). Indistintamente de la ubicación, la línea lateral está conformada por órganos discretos llamados **neuromastos**, los que se encuentran distribuidos regularmente a lo largo del cuerpo y presentan un bajo número de células agrupadas en forma de roseta. Dichos órganos contienen el núcleo mecanotransductor compuesto por células ciliadas receptoras del estímulo, las que presentan conexiones neuronales que transmiten la señal. Cada neuromasto se encuentra conectado con sus neuromastos adyacentes a través de un grupo compacto y lineal de células conocidas como células interneuromásticas.

Son cuatro los tipos celulares que se pueden distinguir principalmente en la línea lateral: las **células ciliadas**, ubicadas al centro del neuromasto; las **células de soporte**, ubicadas rodeando a las células ciliadas y bajo las mismas; las **células del manto**, las cuales se encuentran en el borde del neuromasto; y las **células interneuromásticas**, las que forman una hilera que mantiene unido un neuromasto con otro (Ma et al. 2009) (Figura 2A). Un quinto tipo celular ha sido descrito, las células progenitoras, las que se albergan bajo las células de soporte (Hernández et al. 2007) (Figura 2B).

La producción de células ciliadas y de soporte depende de la especie: puede estar limitada a un período de desarrollo o puede ocurrir continuamente durante toda la vida (Williams et al. 2000). Las células ciliadas de la línea lateral del pez cebra presentan similitudes estructurales, funcionales y moleculares a las células ciliadas del oído interno de mamíferos (Poss et al. 2000b), pero difieren en el hecho de que en el pez cebra ocurre regeneración de estas células mecanosensoriales, posterior a un daño, mientras que las pertenecientes a oídos de mamífero son incapaces de regenerarse. Esta diferencia es trascendental en la búsqueda de estrategias que permitan reemplazar, en mamíferos, las células ciliadas perdidas, ya que la mayoría de las veces el daño se traduce en alguna deficiencia auditiva permanente (Whitfield et al. 2002).

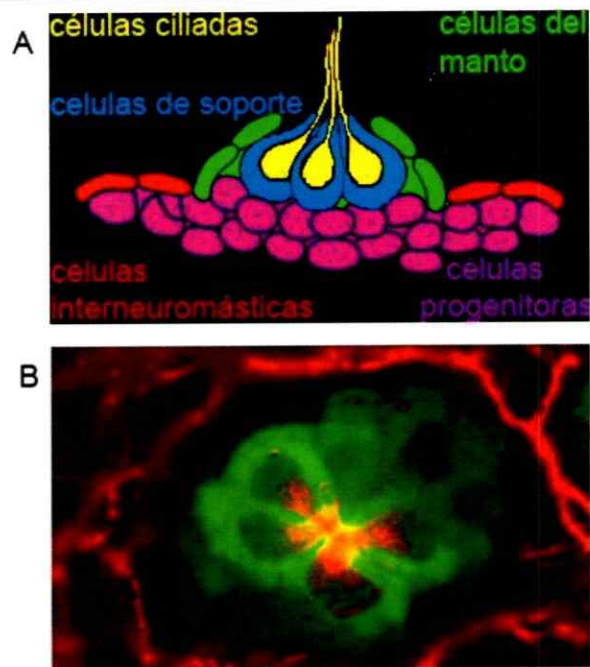
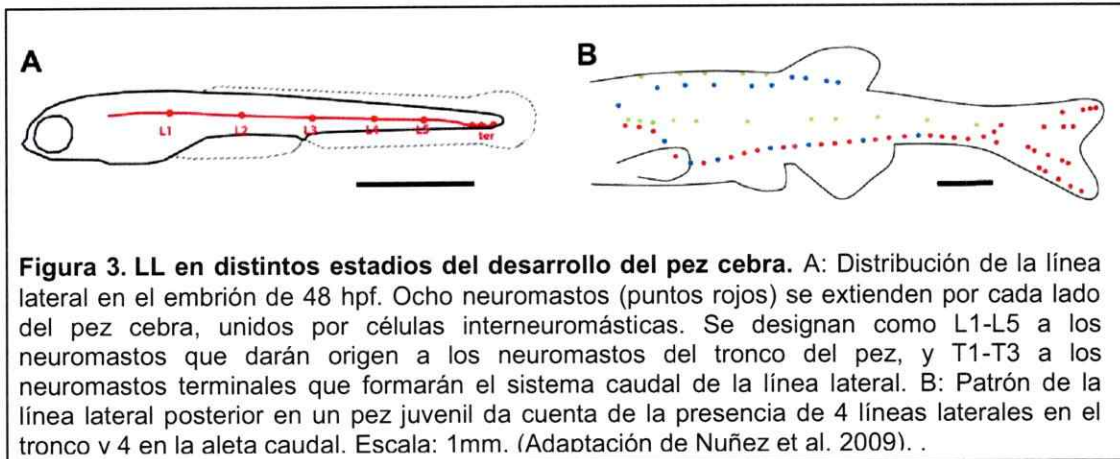


Figura 2. Tipos celulares de la línea lateral. A: Esquema de la vista lateral de un neuromasto, y los distintos tipos celulares que lo conforman: células ciliadas, son las células mecanotransductoras; células de soporte, son las que se encuentran bajo las células ciliadas; las células del manto, que le dan la conformación tipo volcán al neuromasto; células interneurómicas, que interconectan los neuromastos; y las células progenitoras. **B:** Imagen bajo iluminación fluorescente de la vista superior de un neuromasto en donde se puede apreciar la conformación de roseta (células ciliadas de soporte en verde, rodean a las células ciliadas). Gentileza de Pavla Navratilova, Laboratorio de Tom Becker.

Desarrollo embrionario y post-embrionario de la línea lateral

La línea lateral es inicialmente derivada de las placodas craneales, a partir de engrosamientos ectodermales que generan estructuras sensoriales específicas (Raible et al. 2000). En el pez cebra, la placoda de la línea lateral posterior (LLP), se forma tras la placoda ótica (Dambly-Chaudière et al. 2003) y polariza alrededor de las 20 horas post-fertilización, de modo que las células anteriores diferencian en neuronas mientras que el grupo posterior de alrededor de 100 células formarán el **primordio primario** de la línea lateral posterior (priml). En este momento el priml comienza a migrar de anterior a posterior a través del miosepto horizontal o línea media de los somitos del cuerpo (Metcalf et al. 1985), depositando, en intervalos regulares, grupos de aproximadamente 25 células agrupadas en forma de rosetas pero sin capacidades mecanotransductoras, los que se conocen como **proneuromastos** (Gompel et al. 2001), conectados por las células interneuromásticas. El fin de la migración se alcanza aproximadamente a las 42hpf (Metcalf et al. 1985). Ya a los tres días post-fertilización (3dpf) o fin de la embriogénesis, se han depositado alrededor de 8 neuromastos con capacidades mecanotransductoras por cada lado del cuerpo del pez: los cinco primeros (L1-L5, respectivamente), generarán la línea lateral posterior del cuerpo del pez, y los 3 terminales (T1-T3) que serán los precursores de la línea lateral caudal (Figura 3A) (Wada et al. 2008). Estos 8 neuromastos durante el estado juvenil alcanzan a ser unos 60, organizados en cuatro líneas que se prolongan de anterior a posterior: ventral, lateral, dorso-lateral y dorsal (Figura 3B). Estos nuevos neuromastos se adicionan mediante distintos procesos. Es así como, al aumentar el tamaño del pez aumenta el número de neuromastos que conforman el sistema de la línea lateral posterior: a las dos semanas existe un neuromasto por cada somito y varios neuromastos por somito en el primer mes de vida. El número de neuromastos del sistema de línea lateral posterior, continúa aumentando a través de la vida del pez mediante estos procesos, hasta alcanzar unos varios cientos de neuromastos durante la adultez (Figura 1B) (Nuñez et al. 2009).



Procesos de adición de neuromastos

A medida que el pez crece y avanza en su etapa del desarrollo, va adquiriendo un mayor número de neuromastos que le permiten al animal robustecer su sistema de interacción con el medio acuático. Se ha postulado que esta adición de neuromastos se produce por diferentes mecanismos, que combinados durante las distintas etapas, producen un mayor número de órganos a partir de los 8 iniciales generados durante la embriogénesis. Son tres posibles modelos por los que se adicionarían neuromastos durante el desarrollo:

- I. Un nuevo primordio que surge y se particiona a las 40 hpf, dando como resultado dos primordios: el primordio secundario o primII, que comenzaría a migrar por el mismo recorrido del primI; y un segundo primordio, el primordio dorsal o primD, que migra por la región dorsal del tronco del pez. Estos primordios depositan los neuromastos 2° (LII) y los neuromastos dorsales (D), respectivamente (Figura 4) (Nuñez et al. 2009).

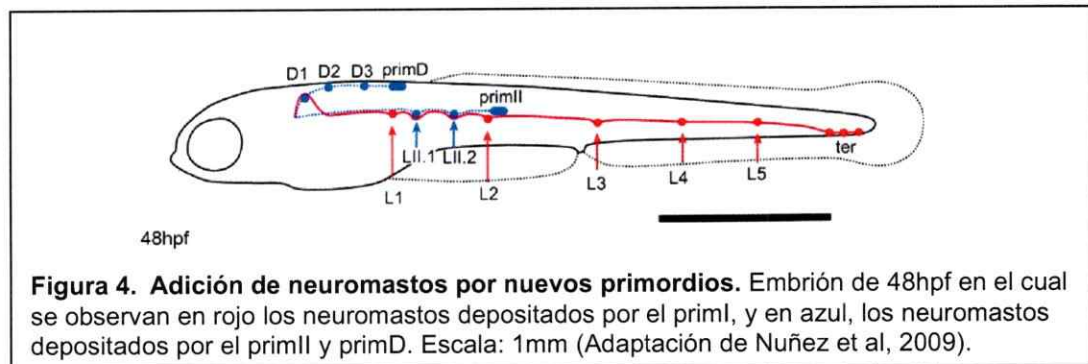


Figura 4. Adición de neuromastos por nuevos primordios. Embrión de 48hpf en el cual se observan en rojo los neuromastos depositados por el primI, y en azul, los neuromastos depositados por el primII y primD. Escala: 1mm (Adaptación de Nuñez et al, 2009).

- II. Luego de que los neuromastos 1° son depositados, estos proliferan, aumentando su número de células que los conforman. Estos experimentarían un proceso de escisión o “*budding*” que produciría los neuromastos 2° cercanos a los 1° (Ledent 2002).
- III. Existiría un tercer mecanismo que propone la existencia de precursores latentes, depositados por el primI, que darían origen a los neuromastos 2°: las células interneuromásticas (Grant et al. 2005). Es así como las células interneuromásticas se presumen como una fuente importante de progenitores de neuromastos post-embrionarios. Estudios atribuyen a las glías como moduladores de esta potencialidad y la capacidad de mantener quiescentes a las células interneuromásticas (López-Schier et al. 2004, Grant et al. 2005).

Regeneración de la aleta caudal del pez cebra

La regeneración en adultos es un proceso biológico complejo por el cual las partes del cuerpo de los animales se recuperan después de la lesión o amputación (Dufourcq (a) et al. 2006). Los mamíferos en general renuevan constantemente determinadas poblaciones celulares: como el epitelio del intestino, la sangre y la piel, entre otras), aunque este potencial de reemplazo no se extiende a la regeneración epimórfica, la que raramente ocurre en adultos de vertebrados superiores (Dufourcq (b) et al. 2006). En urodolos y teleósteos este proceso ocurre con varios

tejidos. El mecanismo de cómo ocurre la regeneración epimórfica es el mismo en todas las especies que se han estudiado: este proceso comienza con el **cierre de la herida**, evento que ocurre en pez cebra entre 0-12 horas post amputación (hpa), luego ocurre la **formación de un blastema** a partir de células progenitoras provenientes del muñón, estas células desdiferencian, migran a la frontera del epitelio de la herida y proliferan, esto ocurre entre las 12- 48hpa, finalmente el proceso termina con el **tejido regenerado**.

Las aletas de peces teleósteos, que presentan capacidad regenerativa, se componen de varios segmentos de rayos óseos, a su vez, cada rayo está compuesto por hemirrayos cóncavos que rodean tejido conectivo, incluyendo células tipo fibroblastos, nervios, los vasos sanguíneos y el sistema sensorial de la LL. Entonces, ya que posee pocos tipos celulares diferenciados y es totalmente restaurada en menos de 3 semanas después de la amputación, la regeneración de la aleta del pez cebra adulto ofrece un excelente modelo para el estudio de la reconstrucción de un órgano sensorial completo, lo que permite el estudio *in vivo* de procesos tales como la proliferación, la formación del blastema a partir de tejidos maduros y el reclutamiento de células progenitoras.

Trabajos han demostrado que la quimioquina "factor derivado del estroma" (SDF1) y su receptor CXCR4 juegan un papel esencial en procesos de quimiotaxis. La señalización CXCR4/SDF1 es un elemento esencial para la formación del blastema durante la regeneración epimórfica (Dufourcq (a) et al. 2006), y está implicado en la migración del primordio de la línea lateral en el pez cebra durante el desarrollo embrionario (David et al. 2002 y Li et al. 2004).

En pez cebra ya se ha comenzado a estudiar la regeneración de la estructura neural de la aleta caudal: la línea lateral (Dufourcq (b) et al. 2006 y Wada et al. 2008). Mediante estudios moleculares, tinciones y microscopía, se ha podido demostrar que la línea lateral también es capaz de regenerar luego de una amputación parcial, recobrando tanto su estructura (Dufourcq (b) et al. 2006). Estos mismos estudios han sugerido a las células del manto como progenitores de las células que conformaran la LLC generada *de novo*. Realizando experimentos con marcadores de tipos celulares (células ciliadas y soporte) y tinciones vitales han tratado de

describir el proceso de regeneración de la línea lateral. Así, estos estudios *in vitro* han dado aproximaciones de éste, atribuyéndole propiedades de progenitoras a las células del manto (Dufourcq (b) et al. 2006).

En este trabajo se pretende describir *in vivo* el proceso de regeneración de la línea lateral caudal en peces adultos, caracterizar su temporalidad y su potencialidad, mediante el uso de cepas transgénicas que marcan distintos tipos celulares de la línea lateral caudal.

HIPÓTESIS

“La línea lateral caudal es capaz de regenerar junto con la aleta luego de una amputación parcial, a partir de células pertenecientes a la línea lateral caudal preexistente”.

OBJETIVO GENERAL

Identificar el o los tipos celulares precursores de los neuromastos generados *de novo* mediante seguimiento *in vivo*, y comparar el proceso de regeneración con el proceso ontogénico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Identificación de precursores de neuromastos en regeneración en adultos.
 - i. Identificar y seleccionar cepas transgénicas que marquen distintos tipos celulares de la línea lateral en estadio adulto, mediante la visualización bajo la lupa de fluorescencia cepas transgénicas de peces cebra que expresan GFP de manera estable y específica, en algún tipo celular de la línea lateral en estado embrionario, verificando que la fluorescencia se mantenga y distinga en el estadio adulto.
 - ii. Utilizar las líneas transgénicas que expresan GFP en los distintos tipos celulares que conforman la línea lateral para realizar un registro *in vivo* del proceso de regeneración mediante la adquisición de fotografías secuenciales.
 - iii. Confirmar la funcionalidad de la línea lateral caudal regenerada mediante el recobro de sus capacidades mecanotransductoras.
 - iv. Estimar el potencial regenerativo de línea lateral realizando cortes sucesivos de la aleta caudal y examinando el proceso regenerativo.
- II. Descripción de mutantes de línea lateral en estado adulto
Patrón de línea lateral presente en mutante D17 y *odysseus*, mutantes de SDF1a y CXCR4b, respectivamente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cuidado, manejo y cirugía de peces

Se utilizaron peces cebra adultos entre 3 meses y 2 años de cepas silvestres (AB y cepa propia); transgénicas: Brn3c, Sox3h7, CldnB, Et#20, ath1a:tomato, α -tubulina; y mutantes: D17 (*sdf1a* mutado) y *ody* (*cxcr4b* mutado). Los peces fueron mantenidos en tanques bajo condiciones estándares determinadas: ciclo de luz/oscuridad (14 y 10h, respectivamente); temperatura aproximada a los 28,5° C, pH entre 7 y 7,3 pH; conductividad entre 500-600 μ S; y dieta alimenticia diaria de *Artemia salina* suplementado con un hojuelas Tetra (Nüsslein-Volhard y Dahm, 2002).

El crecimiento de nuevas líneas de peces se inició colectando los huevos y dejándolos crecer durante 5 días en E3 (5mM NaCl; 0,17mM KCl; 0,33mM CaCl₂; 0,33mM MgSO₄; 10⁻⁵ % de azul de metileno; diluido en dH₂O). Luego estos peces, ya en estado larval, se trasvasijaron a un recipiente con agua de sistema, de mayor volumen y de poca altura, en donde los peces se albergan hasta cumplir su primer mes de vida. En estado juvenil, los peces fueron transferidos a los tanques incorporados en el sistema. Cumplido los tres meses, los peces alcanzaron su madurez sexual y por ende, su adultez, siendo sexualmente viables hasta los 2 años.

En la manipulación y observación bajo la lupa/microscopio, los peces se anestesiaron con tricafna (etil-m-aminobenzoato metanosulfonato). Para esto se preparó una solución de Na₂HPO₄ a pH 7-7,3 en agua destilada y luego se disolvieron 4mg de tricafna por cada 1mL de la solución. Esta solución se almacenó a -20°C durante varios meses. Para anestesiarse peces adultos, se disolvieron 10mL de la solución stock en 250mL de agua de sistema. Los cortes de la aleta caudal se realizaron en el pez anestesiado y aproximadamente a 3mm hacia distal desde el tronco del pez.

Caracterización de transgénicos adultos

Se seleccionó un grupo de transgénicos a partir de las líneas de peces disponibles en el laboratorio, en los que la expresión de GFP estuviese circunscrita a algún tipo celular de la línea lateral durante su estadio embrionario. De cada grupo se eligieron 5 o más ejemplares para poder ser visualizados bajo la lupa de fluorescencia. De este grupo de peces transgénicos, finalmente se seleccionaron 4 cepas de peces transgénicos para trabajar, en las que fue posible visualizar algún tipo celular de la línea lateral en la aleta caudal. Estos fueron: Et#20, GFP en células del manto e interneuromásticas; Brn3c, GFP en células ciliadas, Sox3h7, GFP en subgrupo de células de soporte, y CldnB, GFP en todas las células de la línea lateral.

Tinción con DiAsp

El marcador vital DiAsp (4-(4dietilaminostiril)-N-metilpiridinium iodado) se utilizó a una concentración final de 50 μ M en agua de sistema. Los peces se incubaron durante 5 minutos y luego se realizaron 5 lavados de 5 minutos en agua de sistema. En DiAsp es incorporado por las células que poseen canales mecanotransductores, por lo que es incorporado por las células ciliadas que presentan sus canales activos. Luego se observaron los neuromastos de la aleta caudal bajo la luz UV de la lupa de fluorescencia (Collazo et al. 1994)

Observaciones en lupa/microscopio de fluorescencia y procesamiento de imágenes

Para registrar la regeneración progresiva de la línea lateral de la aleta caudal los peces fueron anestesiados y posteriormente observados bajo luz UV de la lupa de fluorescencia Olympus MVX10 y/o microscopio de epifluorescencia Zeiss AXYOVERT 200M. Luego las imágenes fueron procesadas con los programas Adobe Photoshop e Image J.

Marcaje con trazador celular Dil

Se utilizó el trazador lipofílico Dil (Vybrant® Dil cell-labeling solution, N° de Cat. V-22888; Invitrogen) para marcar las células del manto previas al corte. Para esto se acopló un micromanipulador a la lupa de fluorescencia. Las agujas fueron elaboradas con capilares de vidrio de borosilicato, (Sutter Instruments, ITEM#: BF120-69-10), con filamento interno (diámetro interno (ID) 0.69mm y externo (OD) 1.2mm) en un estirador vertical Narshige modelo PC-10. Ésta fue cargada con 5µL de Dil. El inyector, con la cargada, se acercó con el micromanipulador hacia las células del manto, GFP positivas en el pez transgénico ET#20, las que fueron inyectadas con Dil. Luego la aleta fue amputada y seguida durante el proceso regenerativo.

Conteo de células ciliadas.

Se utilizaron transgénicos Brn3c para realizar un conteo de las células ciliadas, antes y después de la amputación. El conteo se extendió a una semana de regeneración. Se cuantificaron los neuromastos finales, donde el neuromasto 1, fue el neuromasto distinguible, más próximo al sitio de corte. Para esto, se utilizó un microscopio Zeiss de epifluorescencia donde se montaron los peces anestesiados. Las células ciliadas fueron cuantificadas *in vivo*, luego fue fotografiado el neuromasto completo. El neuromasto más próximo al sitio de corte fue cuantificado en cada uno de los 10 casos observados, hasta 7dpa. Luego las células ciliadas de todos los peces en conjunto fueron sumadas por día obteniéndose un total de células ciliadas del NM1. Los valores de células ciliadas de cada neuromasto fueron normalizados con respecto al número de células del 0dpa, del mismo neuromasto. Luego, los valores fueron promediados por día, obteniendo tres grupos: Inicial = 0dpa; Medio = 4dpa y Final = 7dpa. Estos datos fueron estadísticamente tratados mediante un test T de Student con un nivel de significancia de $p < 0.01$, los que fueron agrupados en un gráfico de barras.

RESULTADOS

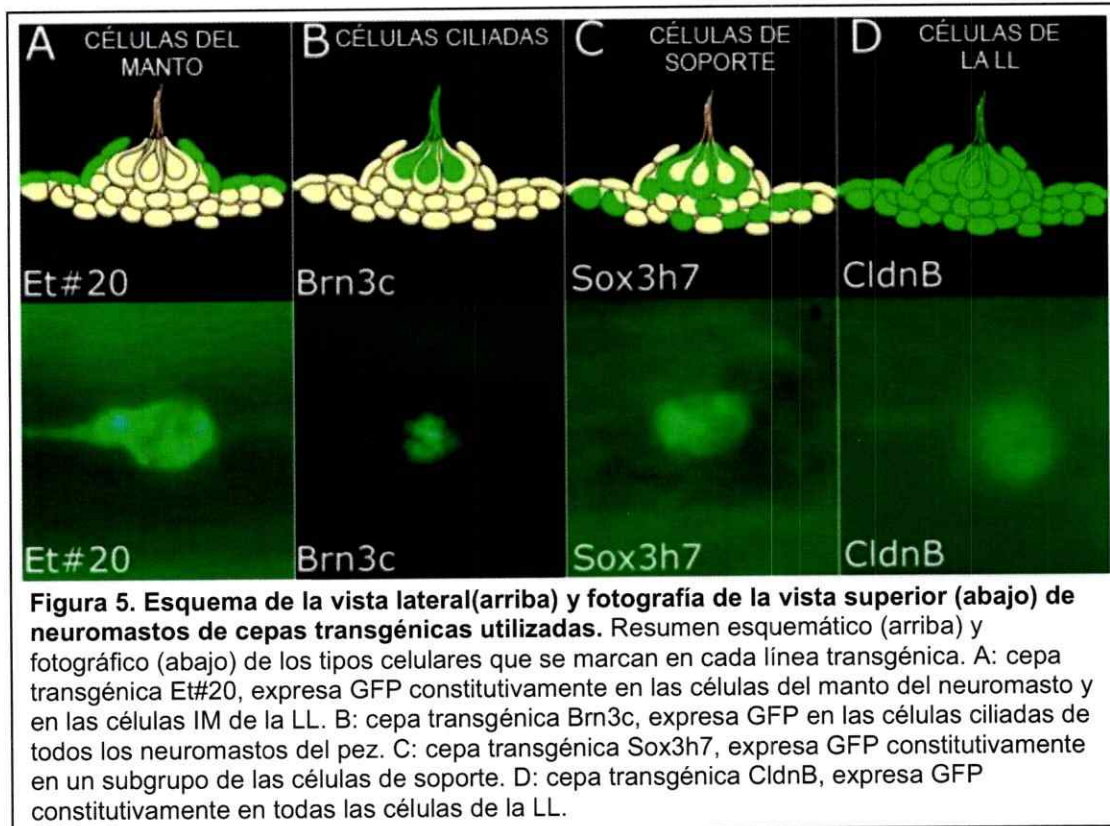
Identificación de precursores de neuromastos en regeneración en adultos

Con el fin de estudiar la regeneración del sistema sensorial de la LLC en estadios tardíos del desarrollo, se utilizaron peces adultos entre 1 y 2 años de edad, de distintas cepas transgénicas, las que expresan GFP bajo el control de un promotor o *enhancer* específico, que induce la expresión del gen fluorescente reportero en un tipo celular presente en la línea lateral. Las cepas transgénicas utilizadas fueron agrupadas y caracterizadas en la Tabla 1.

LÍNEA TRANSGÉNICA	NOMBRE OFICIAL	CONSTRUCTO TRANSGÉNICO	TIPO CELULAR QUE EXPRESA GFP
A) <i>Et#20</i>	<i>Et(krt4:EGFP)sqet20</i>	GFP ubicado bajo el control del promotor del gen epitelial queratina 8 de pez cebra.	Células del manto e interneuromásticas
B) <i>Bm3c</i>	<i>pou4f3:mGFP o</i>	GFP acoplado a la señal de membrana GAP43, fue ubicada río abajo del promotor del gen <i>bm3c</i> de pez cebra.	Células ciliadas
C) <i>Sox3h7</i>	<i>Bglo SOX3h7:GFP</i>	Enhancer <i>h7</i> (Región altamente conservada 7, HCNE7) río arriba del gen <i>Sox3</i> humano, acoplado al promotor basal de beta globina y GFP.	Un subgrupo de células de soporte
D) <i>CldnB</i>	<i>Tg(-8.0cldnb:lynGFP)zf106</i>	GFP transmembrana ubicada bajo el control del promotor de Claudina B de pez cebra.	Todas las células de la línea lateral: interneuromásticas, ciliadas, de soporte, y del manto.

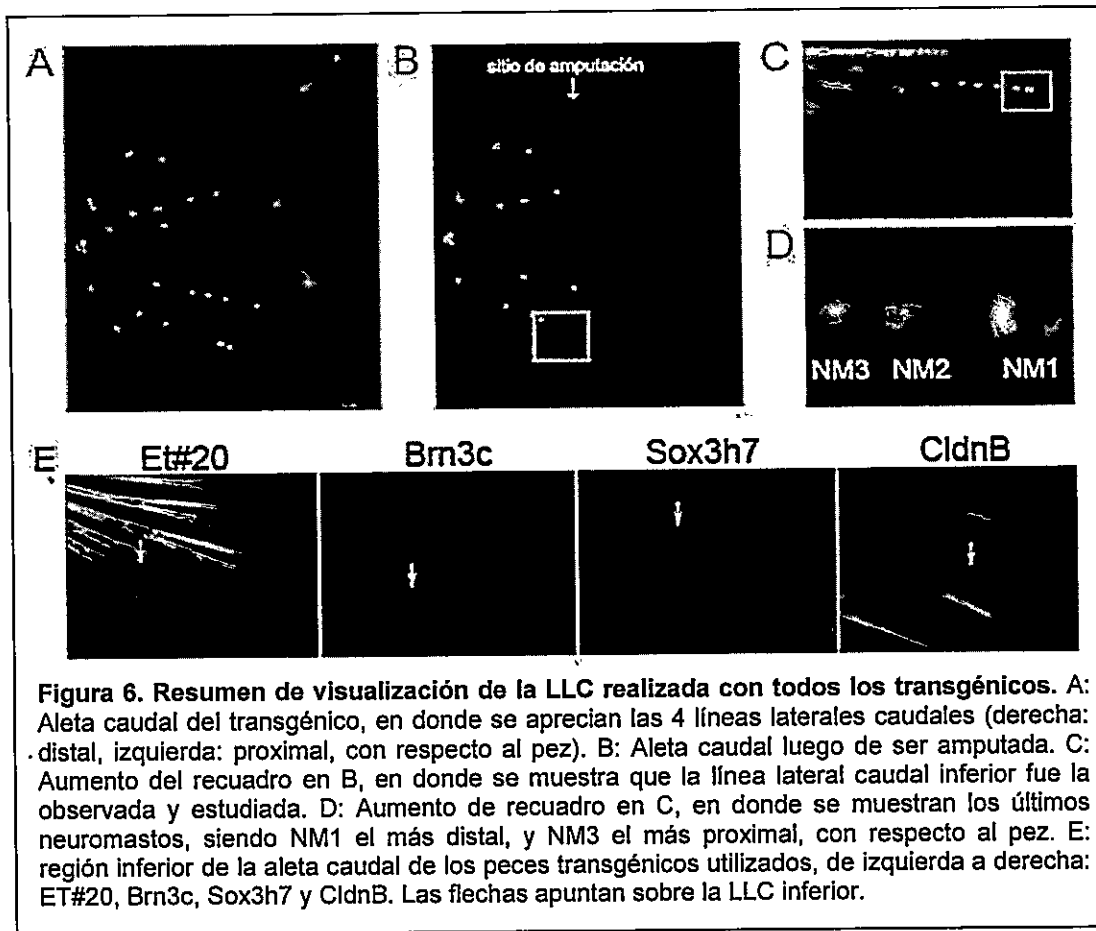
Tabla 1. Cepas transgénicas de peces cebra utilizadas en el estudio del proceso regenerativo de la línea lateral caudal. Las principales cepas de peces cebra transgénicos, se resumen en la tabla, en donde se muestra el nombre a utilizar en el trabajo, su nombre oficial, el constructor con el cual fue generado, y el tipo celular que es marcado con GFP.

El o los tipos celulares de la LLP que expresan GFP en cada cepa transgénica fueron resumidos en la Figura 5, donde en la parte superior se muestran esquemas de la vista lateral de un neuromasto y en verde, el tipo de célula que se marca con GFP, y abajo, se muestra una fotografía de un neuromasto de los distintos transgénicos (Figura 5 A: Et#20; B: Brn3c; C: Sox3h7; D: CldnB).



En la Figura 6 se resume el procedimiento realizado con todos los transgénicos durante el registro fotográfico: el pez transgénico anestesiado, se ubica bajo la lupa de fluorescencia, donde se observa la aleta caudal, los que nos permitió observar la LLC (Figura 6A). Esta aleta es cortada transversalmente a una distancia aproximada de 3mm desde el final del tronco del pez (Figura 6B), la LL estudiada fue en, todos los casos, la inferior (Figura 6C), en donde nos focalizamos en la región previa al plano de amputación, la que comprendía en promedio 3

neuromastos, a los que llamamos : NM3, NM2 y NM1, siendo el NM1, el más próximo al corte y el NM3, el más próximo al pez (Figura 6D). En la Figura 6E se muestran fotografías de la región inferior de la aleta caudal de los cuatro peces transgénicos utilizados.



1) Et#20 o Et(krt4:EGFP)sqet20

La cepa transgénica de pez cebra (*Danio rerio*) Et#20 fue generada en el Instituto de Biología Molecular y Celular IMCB, de Singapur (Parinov et al. 2004), usando la técnica de *enhancer trap* mediada por el transposón Tol2. Esta línea expresa GFP constitutivamente, bajo el control de 460 pares de base del promotor de queratina 8, en las células de soporte externas de los neuromastos. En la caracterización de la cepa, se determinó que la proteína de GFP en estadio embrionario, se localiza en el citoplasmas de células del manto e interneuromásticas de todo el sistema de la LL (Hernández et al. 2006).

Este transgénico se visualizó en estadio adulto en la lupa de fluorescencia para determinar si la expresión se mantenía en esta etapa del desarrollo del pez. Para esto, se anestesiaron peces cebra entre 1 y 2 años de vida, tanto homocigotos y como heterocigotos para el transgén y se analizó la expresión.

En ambos peces transgénicos se observó un patrón de expresión similar al descrito en embriones. Células del manto e interneuromásticas de la línea lateral anterior y posterior expresaron GFP. La expresión se extendía al sistema de LLC, donde se observó en promedio 4 líneas laterales caudales en la aleta por cada lado, tal como fue descrito previamente (Dufourcq (b) et al. 2006). La expresión citoplasmática de GFP, da cuenta de la forma de tipo similar a un volcán que presentan las células del manto y la distribución periférica que tienen estas células dentro del neuromasto. Las células interneuromásticas se distribuyen de manera asociadas unas con otras formando una línea que conecta neuromastos adyacentes. Los casos estudiados fueron 14, cuatro de los cuales se resumen en las Figuras 7, 8, 9 Y 10.

2) Brn3c o pou4f3:mGFP

La cepa transgénica de pez cebra (*Danio rerio*) Brn3c fue generada en el Laboratorio de Herwig Baier, en la Universidad de California. Esta cepa, expresa GFP unido a membrana bajo el control del promotor/*enhancer* del gen *brn3c* (Xiao et al. 2005). La expresión de la proteína de

GFP se localiza en la membrana de distintos subgrupos de las células retino-ganglionares, además de las células ciliadas o mecanotransductoras de la línea lateral y del oído interno, en de larvas de 56hpf.

Peces adultos, entre 1 y 2 años de vida, de esta cepa transgénica fueron visualizados en la lupa de fluorescencia para confirmar la expresión de la proteína GFP en las células ciliadas de la línea lateral en este estadio. Así, fue confirmada la continuidad de la expresión de esta proteína en la adultez: las células ciliadas de la línea lateral anterior, posterior y caudal presentaban expresión de la proteína GFP, de manera similar al caso de tinción con el marcador vital DiAsp. Dicha expresión dio cuenta de la forma esférica que presenta la base de las células y el cilio en la parte apical. Además, reflejó el agrupamiento central que presentan dentro del neuromasto. El registro fue realizado con 7 peces cebras, tres de los ejemplos son resumidos en las Figuras 12, 14 y 16.

3) Sox3h7 o β gloSOX3h7:GFP

La cepa transgénica de pez cebra *β gloSOX3h7:GFP* fue generada en el Instituto de investigación del Cerebro y la Mente de Camperdown, Australia, en el laboratorio de Thomas S. Becker (Pavla Navratilova et al, 2008). Estos animales transgénicos expresan la proteína GFP bajo el *enhancer* h7 (*enhancer* del gen humano HCNE7 altamente conservado) y el promotor basal de β -globina. Los embriones y larvas de este animal transgénico expresan GFP citoplasmático en un subgrupo de células de soporte de los neuromastos de la línea lateral, que se presume, son las progenitoras (datos del laboratorio, aún no publicados).

Para comprobar que la expresión se mantiene en estado adulto, se seleccionó un grupo de peces cebras de esta línea y se visualizaron bajo la lupa de fluorescencia.

El patrón de expresión fue similar a las cepas anteriormente descritas: un grupo de células expresa GFP en la aleta caudal del pez cebra en la región interrayos, linealmente separadas por una distancia regular. Por lo tanto, esta cepa se utilizó para estudiar el proceso regenerativo

a nivel de las células de soporte. Se trabajó con un total de 10 peces de esta línea transgénica, de los cuales dos de los casos se resumen en las Figuras 18 y 19.

4) CldnB o Tg(-8.0cldnb:lynGFP)zf106

La cepa transgénica CldnB fue desarrollado por Petra Haas en el laboratorio de Darren Gilmour, en el EMBL, Heidelberg, Alemania. Dicha cepa transgénica fue creada para estudiar el comportamiento celular durante la migración del primordio de la línea lateral. Para esto crearon distintas cepas de pez cebra transgénicas, en las que una versión transmembrana de GFP está ubicado bajo el control del *enhancer*-promotor del gen Claudina B (Haas et al 2006).

Por observación en la lupa de fluorescencia, se determinó que la expresión de la proteína GFP era mantenida en estadio adulto. Fue necesario analizar un número mayor de peces transgénicos debido a que la fluorescencia presenta un alto nivel de ruido en el resto del cuerpo (probablemente la piel, que expresa altos niveles de las claudinas). Se visualizó la totalidad de los peces cebras adultos CldnB positivos presentes en el bioterio, encontrándose sólo tres peces donde la fluorescencia de los neuromastos era distinguible del ruido de fondo de la fluorescencia. Posiblemente dichos animales, eran homocigotos para el transgén. La Figura 20 muestra uno de los tres casos estudiados.

Seguimiento *in vivo*: Visión global del proceso regenerativo de la LLC

La amputación fue realizada a una distancia constante en todos los casos de los peces estudiados. Por esta razón la distancia a la que se encontraban los neuromastos próximos al sitio del corte fue variable en todos los casos estudiados. Observamos tres situaciones diferentes: el neuromasto más distal de la LLC estudiada, NM1, coincidió con el sitio de corte; el NM1 estuvo próximo al plano de amputación, aunque sin contacto directo con este; y

finalmente, que el NM1 se encontró a una distancia considerable con respecto al lugar de la cirugía.

El día de la amputación se consideró como 0dpa. El proceso de regeneración fue visualizado y registrado fotográficamente durante los días siguientes.

Durante el primer y segundo día post-amputación (1 y 2dpa), en la región de la LL que se encontraba próxima al sitio de amputación (una distancia equivalente a dos segmentos de rayo) fue posible visualizar cambios en su estructura. Es así, como en los peces Et#20, neuromastos que se encontraron bajo una distancia equivalente a 13 diámetros de neuromastos, presentaron cambios en la morfología y tamaño. El aumento de tamaño se visualizó como resultado de un aumento en la región que expresaba GFP, adquiriendo además una apariencia alargada y aplanada. Las células interneuromásticas presentes en esta región también presentaron modificaciones, las cuales fueron visibles como un engrosamiento en esta hilera que conecta los neuromastos. En los peces transgénicos Brn3c una reestructuración se observó en los núcleos mecanotransductores de neuromastos ubicados hasta una distancia de 14 diámetros de neuromastos. Los neuromastos que se encontraron muy cercanos al plano de amputación, entre el sitio de corte y una distancia aproximada de 3 diámetros de neuromastos en transgénicos Et#20, presentaron una evidente reestructuración en su morfología. Asimismo, en el transgénico Brn3c se pudo observar una disminución de la expresión de GFP en neuromastos ubicados dentro de una distancia equivalente a 5 diámetros de neuromastos, lo que hacía imperceptible la expresión de GFP al día posterior al corte. Junto con estos cambios, y en toda la región próxima al plano de amputación, la hilera de células interneuromásticas presentó un ligero engrosamiento. En los peces Brn3c, la expresión de GFP en las células ciliadas pertenecientes a neuromastos adyacentes al sitio de corte desapareció. Ya en el 1dpa los neuromastos no eran distinguibles en el transgénico CldnB, por el contrario, en el transgénico Sox3h7 no se observó desaparición de fluorescencia en neuromastos próximos al sitio de corte, pero sí en los neuromastos que se encontraron adyacentes al plano de amputación.

Ya al 3 y 4dpa, en los peces transgénicos **Et#20**, la fluorescencia que había disminuido en los neuromastos más próximo al sitio de corte, volvía a alcanzar niveles de expresión similares a los que tenía previo a la cirugía. Así también ocurrió con los neuromastos de transgénicos **Brn3c**. Además el **NM1** comienza a presentar un desplazamiento hacia regiones más distales, acercándose al plano de amputación. Lo mismo fue observado en el transgénico **Brn3c**, donde las células ciliadas de neuromastos cercanos al sitio de corte presentaron desplazamientos hacia distal, y en algunos casos neuromastos que se encontraron cercanos se fusionaron. Esto pudo ser observado en transgénicos de **Et#20** como **Brn3c**. Transgénicos **Et#20** presentaron expresión de GFP en la región regenerada, pero sin que formara parte de una estructura definida (Figura 7D). En transgénicos **CldnB** ya era posible distinguir nuevamente la LLC, aunque los neuromastos presentaron morfología más plana y alargada con respecto a un principio. La hilera de células interneuromásticas se encontró engrosada, lo mismo se observa en el transgénico **Et#20** (Figura 19, 6B y 10). El transgénico **Sox3h7** no presentó cambios en este período de tiempo.

Al 5 y 6dpa, fue notorio el desplazamiento de **NM1** próximos al sitio de corte en todos los transgénicos estudiados, menos **Sox3h7**, siempre en dirección distal. En el transgénico **Et#20** otro aspecto distintivo fueron las ramificaciones producidas en la hilera horizontal de células interneuromásticas que interconectan los neuromastos consecutivos (Figura 7B y 11). Además, la expresión de GFP que se encontraba días anteriores en la región regenerada, comenzó a organizarse formando la LLC (Figura 7E). Los neuromastos de transgénicos **Brn3c** próximos al sitio de corte presentaron aparentemente mayor número de células. Al 6 día ya eran visibles neuromastos generados *de novo* en todos los transgénicos.

Al 7 y 8dpa fue visible más de un neuromasto en la región regenerada en todos los transgénicos estudiados. En cada uno de los transgénicos hubo casos en los que aparecieron neuromastos entre neuromasto. Cercano al 8dpa, los neuromastos no presentaron desplazamientos, alcanzando su posición final (Figura 7C). Ya al 14dpa la LLC se encontraba regenerada completamente.

La Tabla 2 resume el proceso global en distintos períodos de tiempo de la regeneración.

Día post amputación	CARACTERÍSTICAS DEL PROCESO REGENERATIVO
1-2dpa	<p>Fluorescencia de neuromastos adyacentes al sitio de corte deja de ser perceptible, en todas las líneas transgénicas.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Neuromastos que se encuentran próximos al plano de amputación, presentan alteración en su morfología y tamaño. Se observa una disminución de la fluorescencia a niveles inferiores a los iniciales. Las células que conforman dichos neuromastos presentan variaciones en su ubicación, dando cuenta de una desorganización del órgano mecanotransductor.
3-4dpa	<ul style="list-style-type: none"> - Disminución aparente del número de células ciliadas. - Comienza a hacerse más notoria la expresión de GFP en células interneuromásticas, reflejado como un engrosamiento en la hilera que interconecta los neuromastos, y se observan ramificaciones de esta lineal agrupación de células. Estas células comienzan a desplazarse hacia la región distal de la aleta. - Las células GFP positivas que rodean el neuromastos presentaron mayores niveles de expresión. - Existen células provenientes de la línea lateral caudal previa al corte que se ubican en la zona regenerada, pero sin forman una estructura definida.
5-6dpa	<ul style="list-style-type: none"> - Las células que conforman los neuromastos más próximos al sitio de corte experimentan un desplazamiento hacia distal, comenzando a visualizarse neuromastos en la región regenerada. - Los neuromastos próximos al corte aparentemente presentaron un mayor número de células ciliadas.
7-8dpa	<ul style="list-style-type: none"> - En la zona regenerada se depositaron más neuromastos generados <i>de novo</i>. - Además se generaron nuevos neuromastos entre neuromastos previos al plano de amputación
14dpa	<ul style="list-style-type: none"> - El engrosamiento y las ramificaciones de la hilera de células interneuromásticas se veía disminuido. - El patrón de la LLC es restablecido a su estructura previa al corte. - Los neuromastos alcanzan su posición definitiva.

Tabla 2 Resumen del proceso global de regeneración. La tabla resume los principales hitos que fue posible visualizar en el proceso de regeneración de la LLC individual de cada cepa transgénica en distintos días post-amputación.

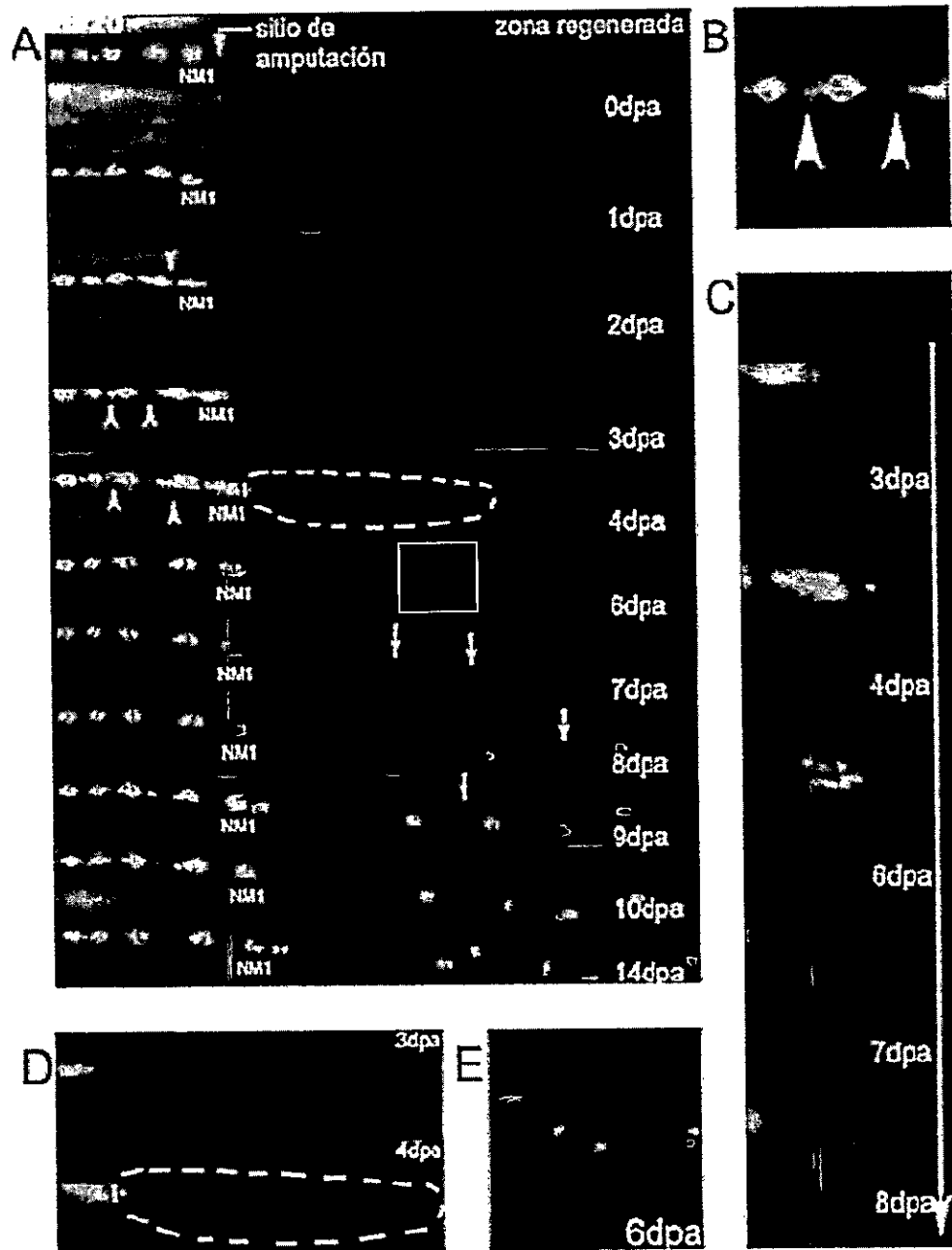


Figura 7. Ejemplo 1: Regeneración de línea lateral caudal de pez cebra transgénico Et#20. A: Resumen de regeneración de LLC desde 0 dpa hasta 14dpa. Se muestra una zona previa al sitio de amputación y otra zona regenerada. B: Ramificaciones de las células interneuromásticas al 3dpa. C: Desplazamiento del NM1 desde la zona previa al corte hacia la zona regenerada entre 3 y 8dpa. D: Aumento de zona regenerada de los días 3 y 4 post amputación que da cuenta de la aparición de células GFP positivas dispersas en la región regenerada previo a la formación de los neuromastos. E: Aumento de una región de la zona regenerada en el 6dpa que muestra la morfología de las células GFP positivas. Las puntas de flecha indican los puntos en donde comienzan las ramificaciones de las células interneuromásticas, mientras que las flechas indican un neuromasto generados *de novo*. Línea vertical: plano de amputación. dpa: días post- amputación. La zona punteada encierra células GFP positivas en D.

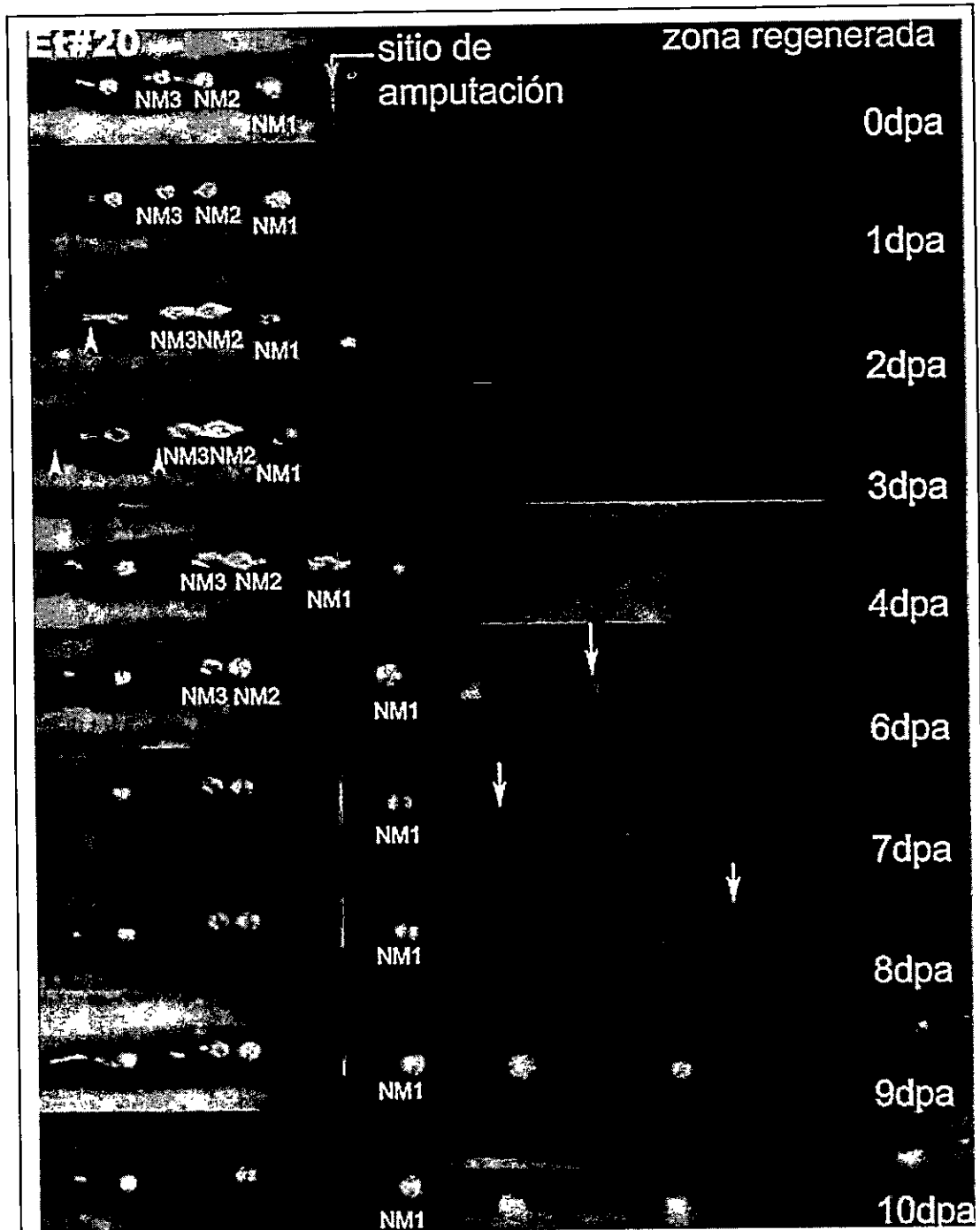


Figura 8. Ejemplo 2: Regeneración de línea lateral caudal de pez cebra transgénico Et#20. Resumen de regeneración de LLC desde 0 dpa hasta 10dpa. Las puntas de flecha indican los puntos en donde comienzan las ramificaciones de las células interneuromásticas, mientras que las flechas indican un neuromasto generados *de novo*. Línea vertical: plano de amputación. dpa: días post- amputación. NM1: neuromasto más distal, NM3: neuromasto más proximal.

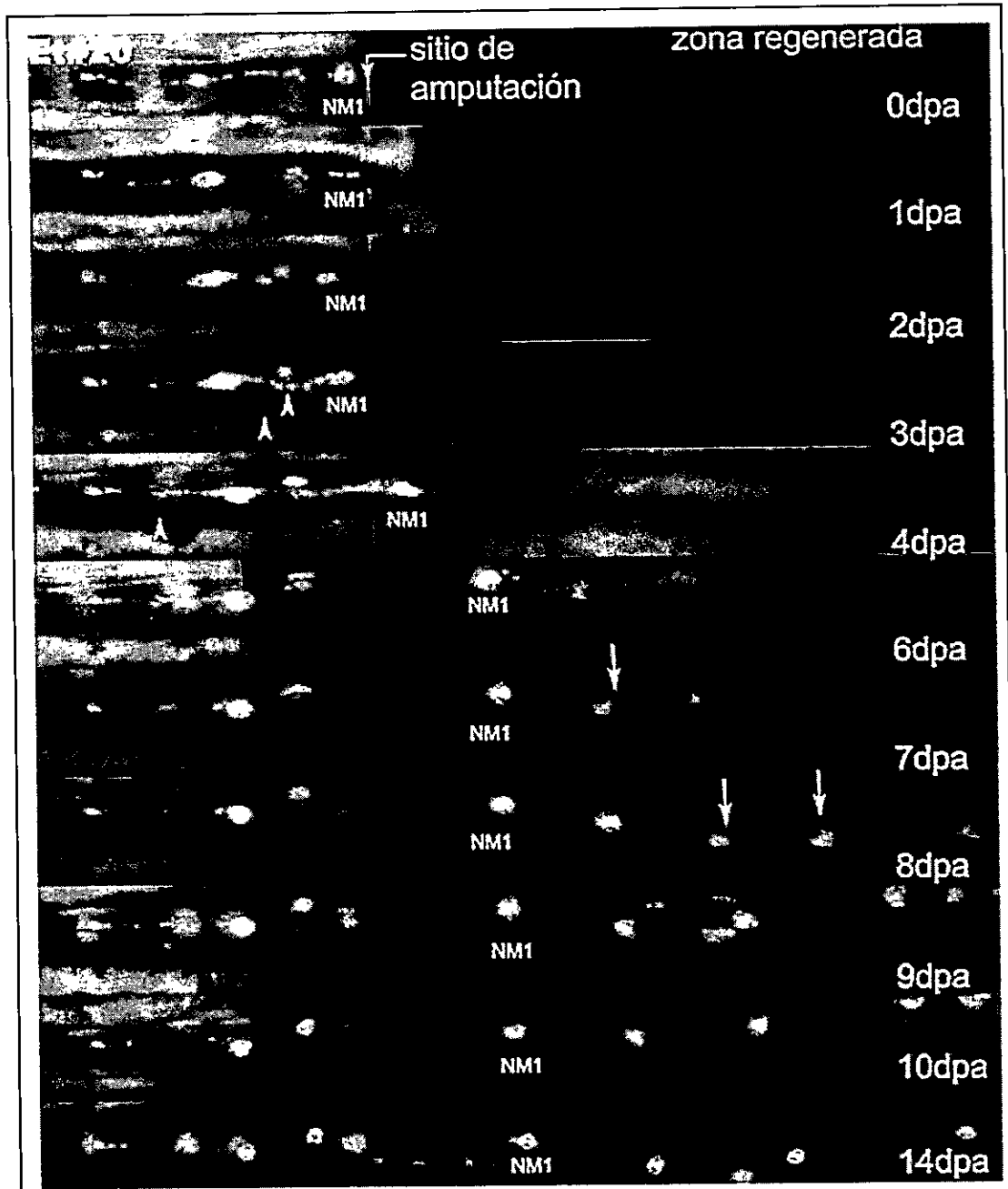


Figura 9. Ejemplo 3: Regeneración de línea lateral caudal de pez cebra transgénico Et#20. Resumen de regeneración de LLC desde 0 dpa hasta 14dpa. Las puntas de flecha indican los puntos en donde comienzan las ramificaciones de las células interneuromásticas, mientras que las flechas indican un neuromasto generados *de novo*. Línea vertical: plano de amputación. dpa: días post- amputación. NM1: neuromasto más distal (más cercano al sitio de corte).

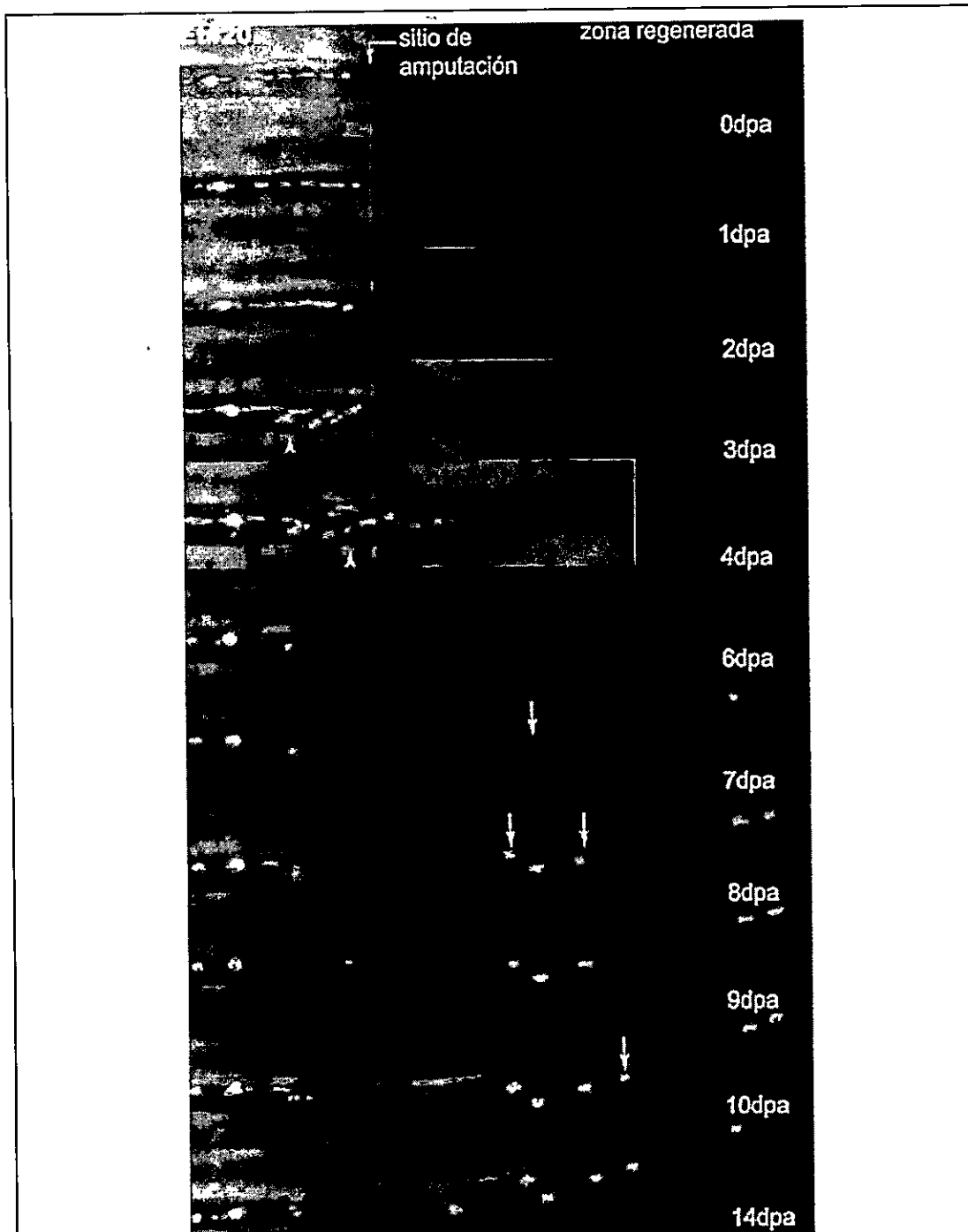
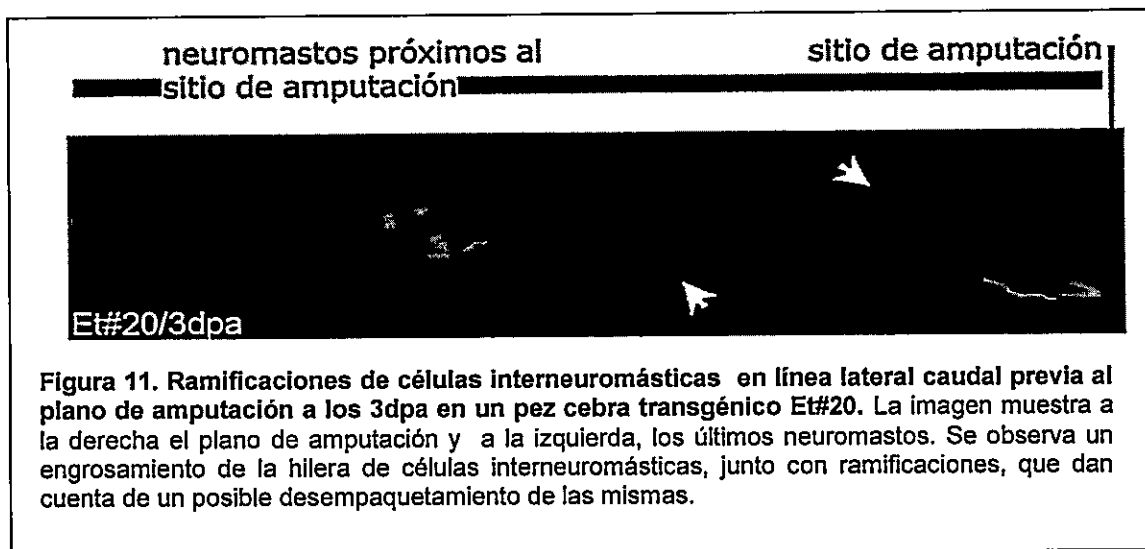


Figura 10. Ejemplo 4: Regeneración de línea lateral caudal de pez cebra transgénico Et#20. Resumen de regeneración de LLC desde 0 dpa hasta 14dpa. Las puntas de flecha indican los puntos en donde comienzan las ramificaciones de las células interneuromásticas, mientras que las flechas indican un neuromasto generados *de novo*. Línea vertical: plano de amputación. dpa: días post- amputación.



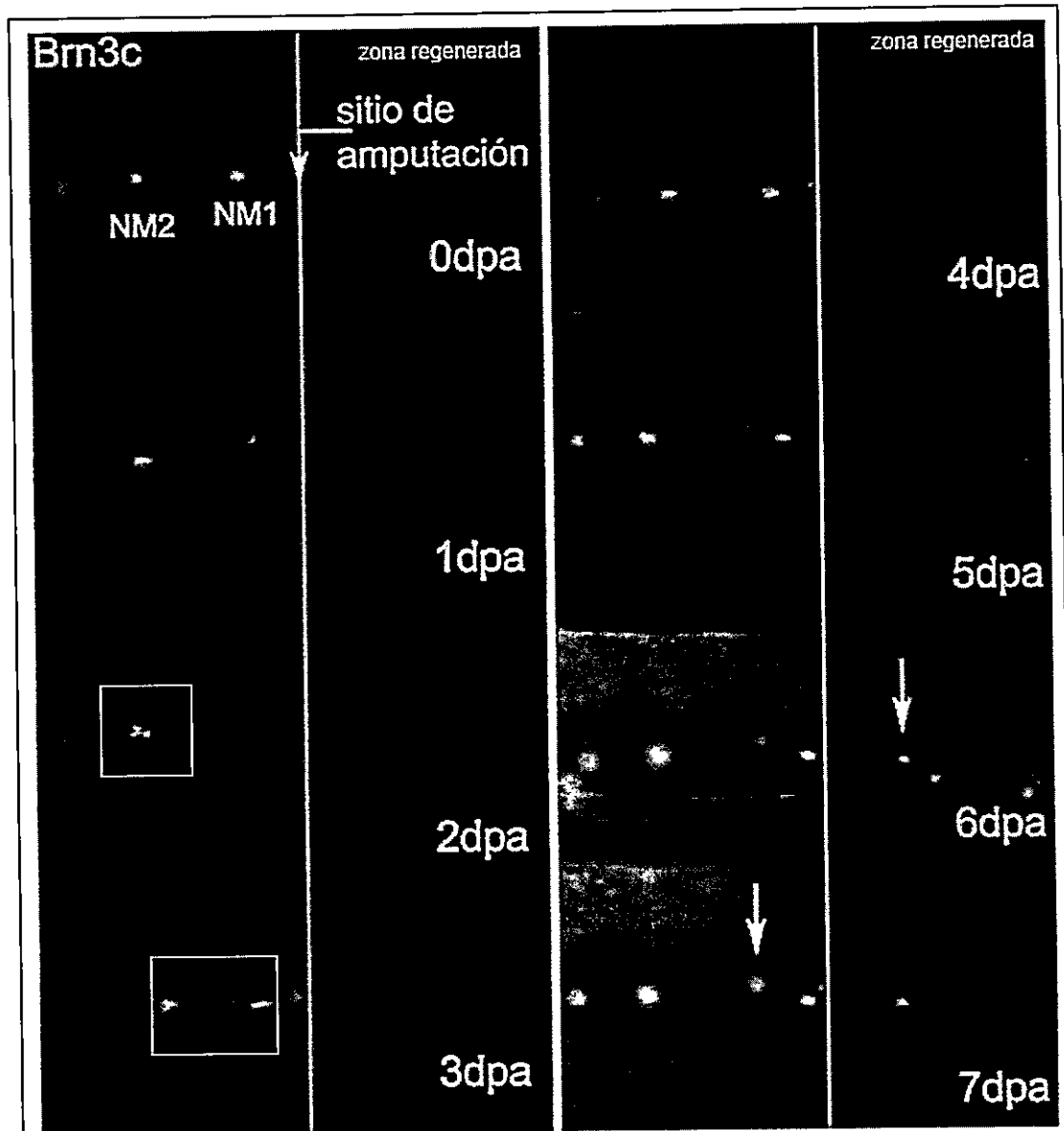


Figura 12. Ejemplo 1: Regeneración de línea lateral caudal de pez cebra transgénico Brn3c. Resumen de regeneración de LLC desde 0 dpa hasta 7 dpa. Las flechas indican un neuromasto generados *de novo*. dpa: días post- amputación. Línea vertical: plano de amputación, separando zona previa al corte (izquierda) de la zona regenerada (derecha). NM1: neuromasto más distal. Los cuadros blancos son ampliados en la Figura 13.

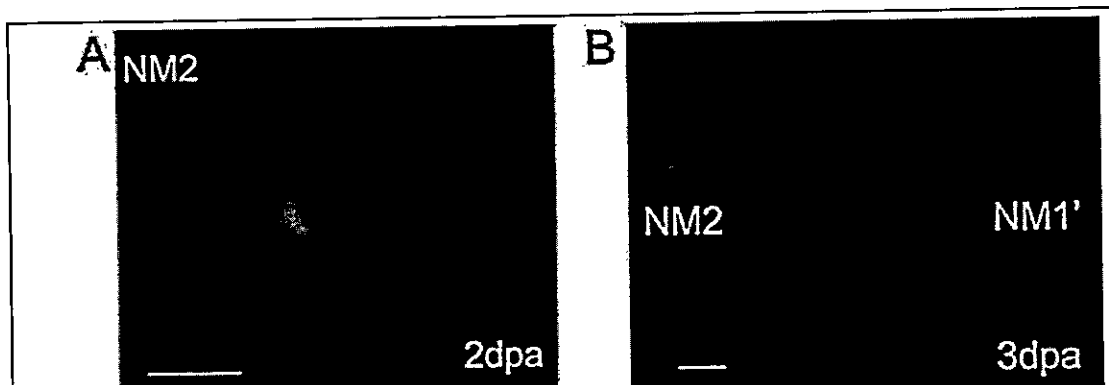


Figura 13. Variación de neuromastos finales durante regeneración. Ampliación de la Figura 11. A: Neuromasto 2, NM2, a los 2dpa, donde se muestra la desorganización del núcleo mecanotransductor. B: El mismo NM2 a los 3dpa, en donde es precedido por un nuevo neuromasto, NM1', con células ciliadas que se encuentran agrupándose. Escala: 10 μ m.

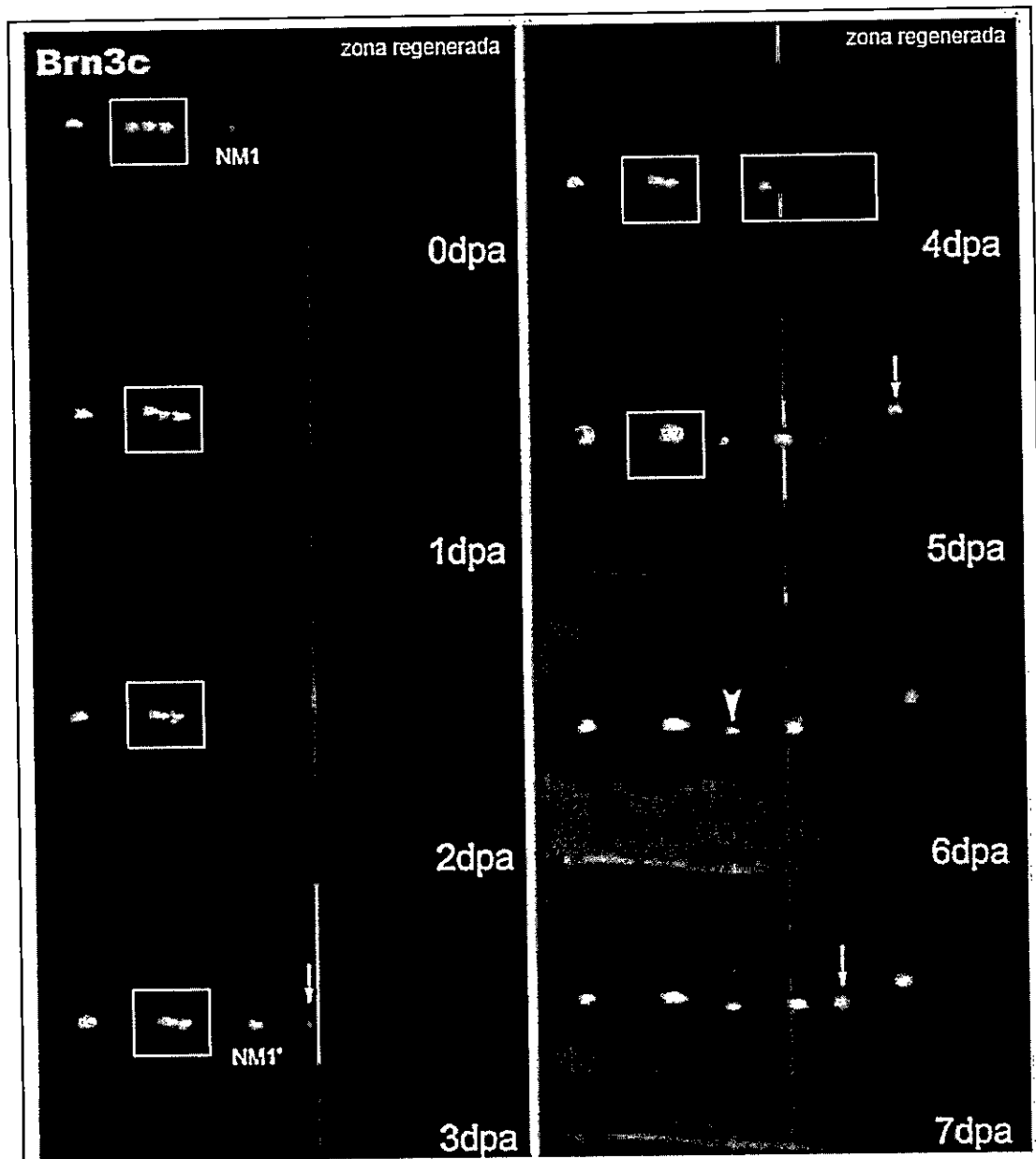


Figura 14. Ejemplo 2: Regeneración de línea lateral caudal de pez cebra transgénico Brn3c. Resumen de regeneración de LLC desde 0 dpa hasta 7dpa. Las flechas indican un neuromasto generados *de novo*. La punta de flecha muestra un neuromasto aparecido entre dos neuromastos en la región previa al corte. dpa: días post- amputación. Línea vertical: plano de amputación, separando zona previa al corte (izquierda) de la zona regenerada (derecha). NM1: neuromasto más distal, NM1': neuromasto que aparece durante la regeneración en la posición del NM1. Los cuadros blancos son ampliados en la figura 14.

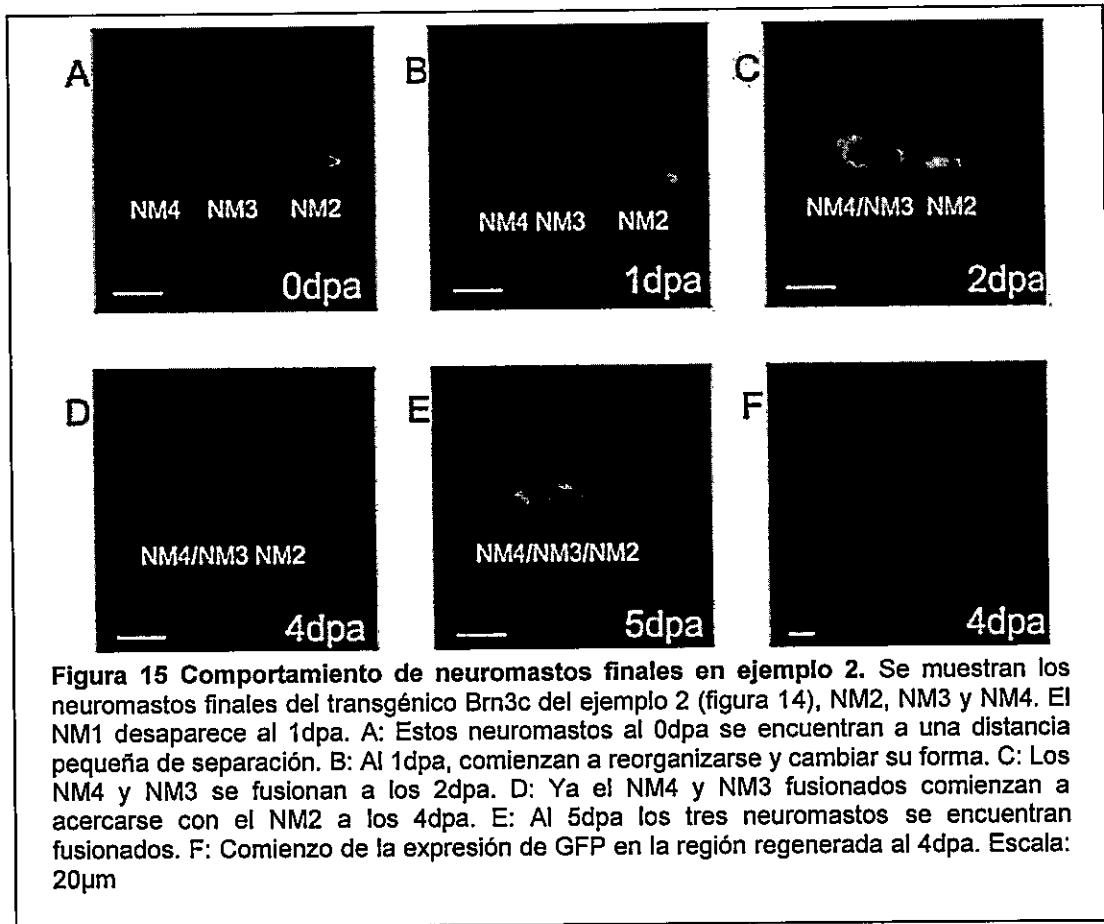


Figura 15 Comportamiento de neuromastos finales en ejemplo 2. Se muestran los neuromastos finales del transgénico Brn3c del ejemplo 2 (figura 14), NM2, NM3 y NM4. El NM1 desaparece al 1dpa. A: Estos neuromastos al 0dpa se encuentran a una distancia pequeña de separación. B: Al 1dpa, comienzan a reorganizarse y cambiar su forma. C: Los NM4 y NM3 se fusionan a los 2dpa. D: Ya el NM4 y NM3 fusionados comienzan a acercarse con el NM2 a los 4dpa. E: Al 5dpa los tres neuromastos se encuentran fusionados. F: Comienzo de la expresión de GFP en la región regenerada al 4dpa. Escala: 20µm

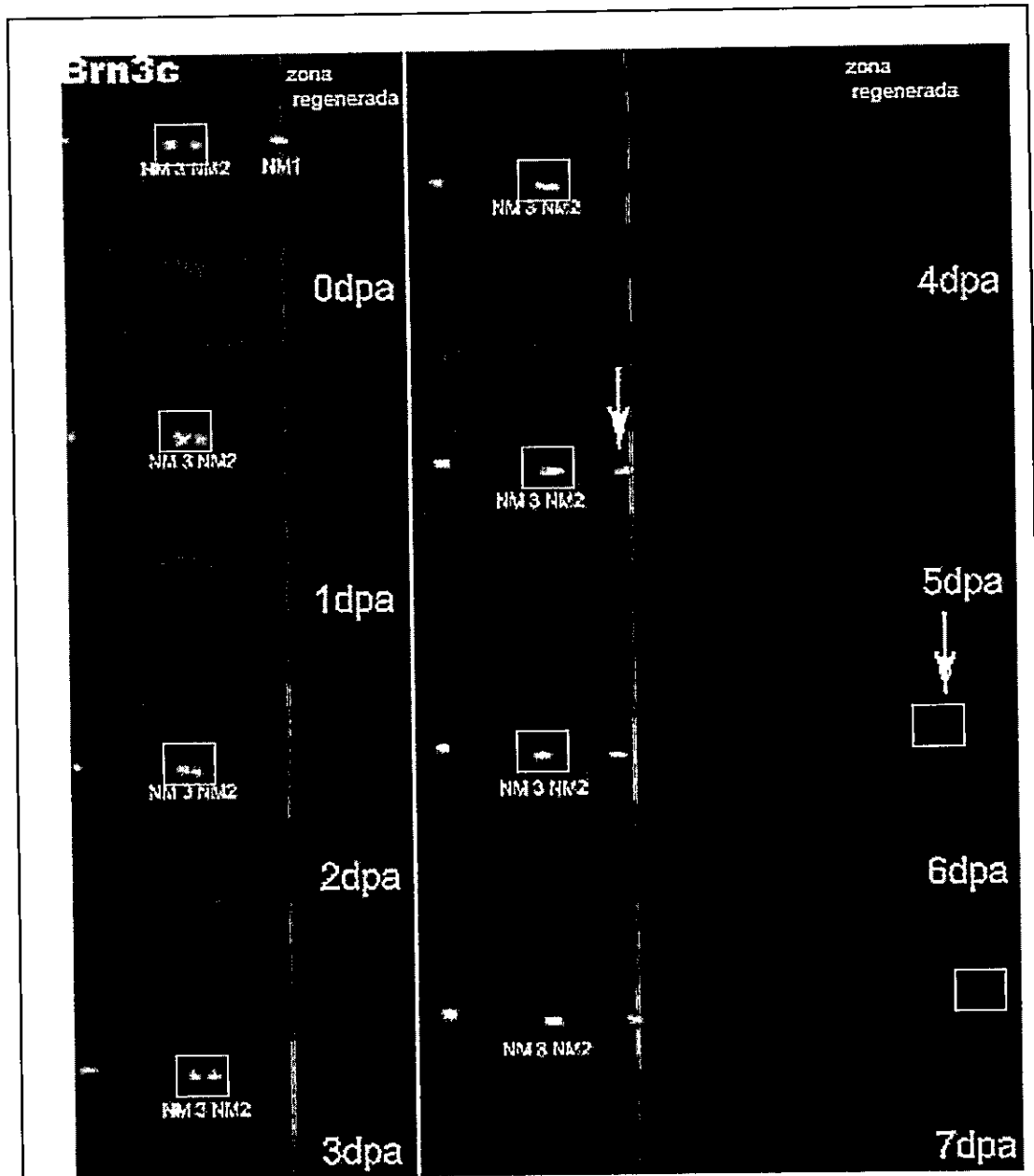
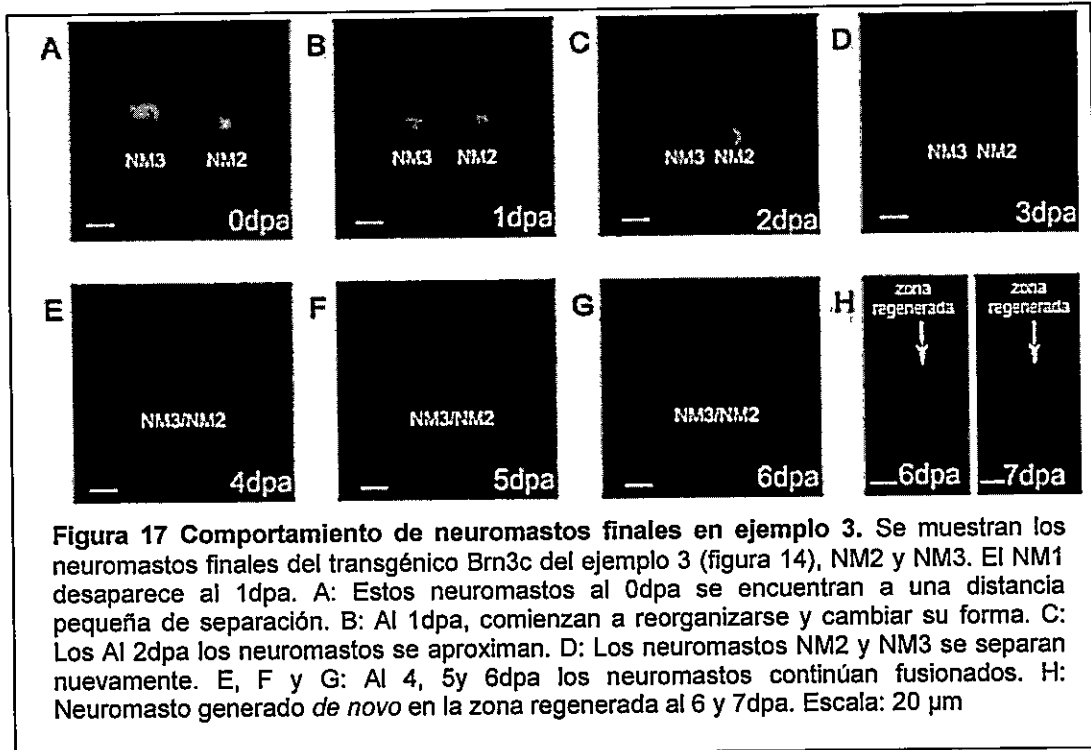


Figura 16. Ejemplo 3: Regeneración de línea lateral caudal de pez cebra transgénico Brn3c. Resumen de regeneración de LLC desde 0 dpa hasta 7 dpa. La flecha indica un neuromasto generado *de novo* (ampliado en la Figura 17H). dpa: días post- amputación. Línea vertical: plano de amputación, separando zona previa al corte (izquierda) de la zona regenerada (derecha). NM1: neuromasto más distal. Los cuadros blancos son ampliados en la Figura 17.



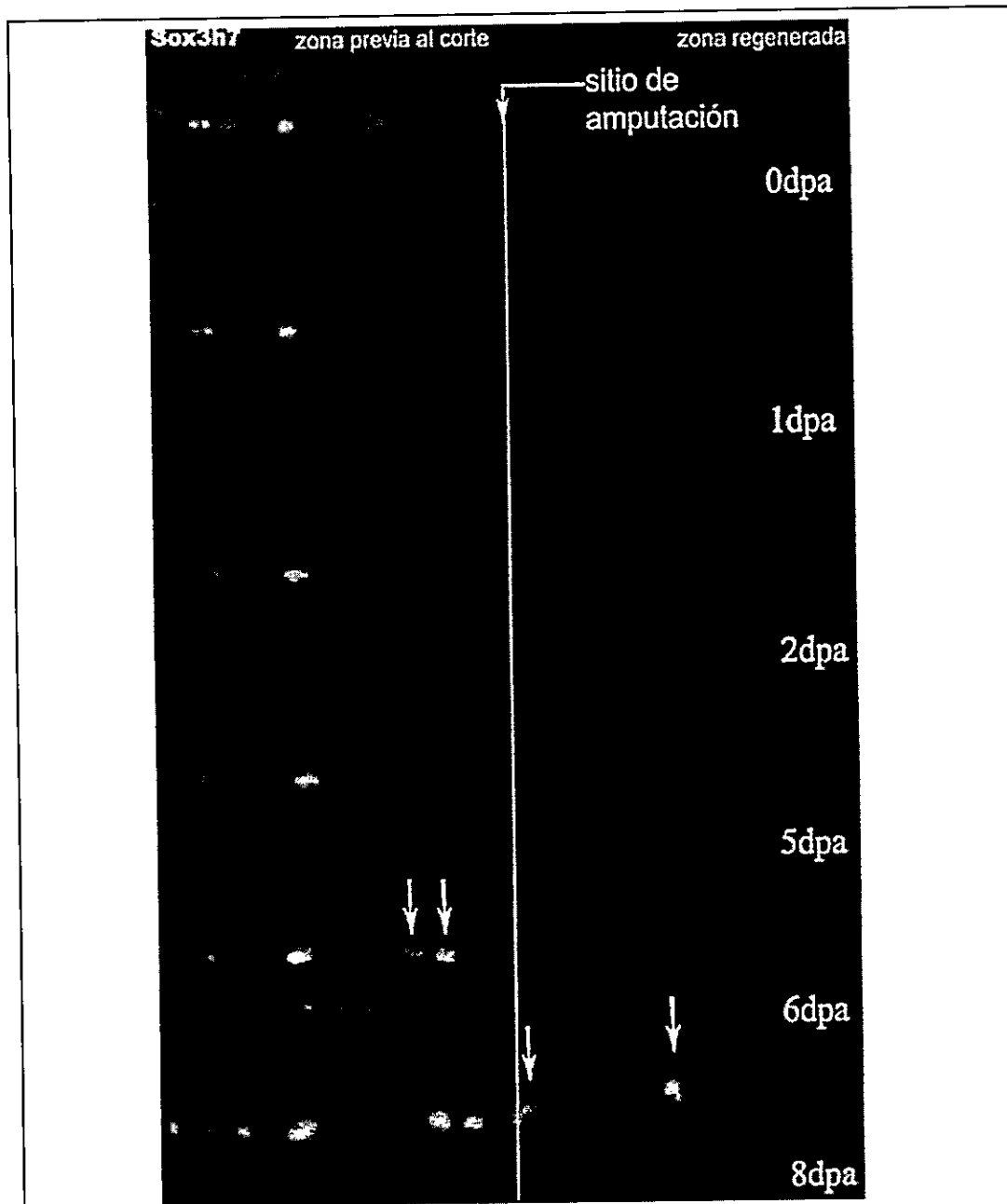
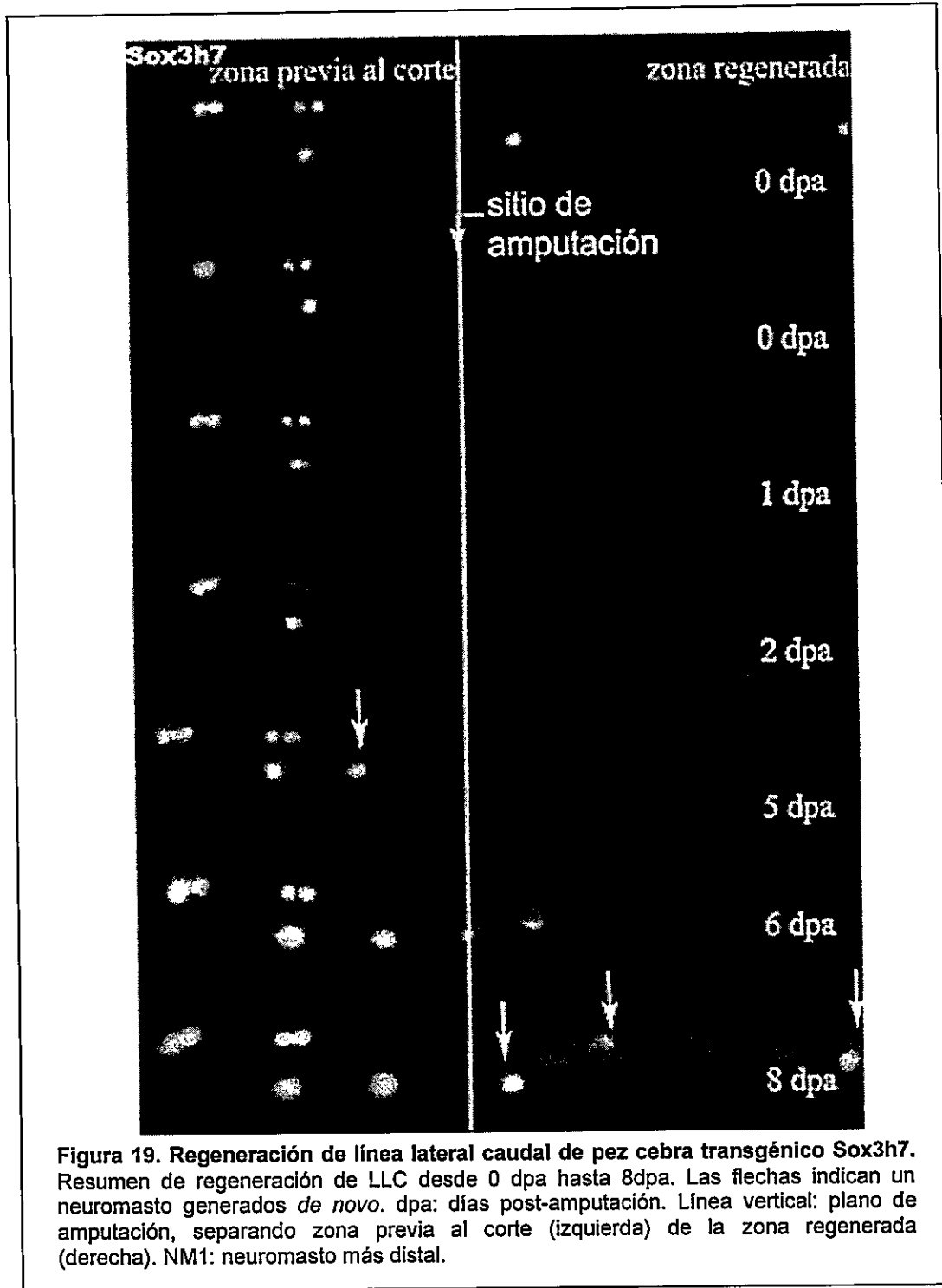


Figura 18 Regeneración de línea lateral caudal de pez cebra transgénico Sox3h7. Resumen de regeneración de LLC desde 0 dpa hasta 8dpa. Las flechas indican un neuromasto generados *de novo*. dpa: días post- amputación. Línea vertical: plano de amputación, separando zona previa al corte (izquierda) de la zona regenerada (derecha). NM1: neuromasto más distal.



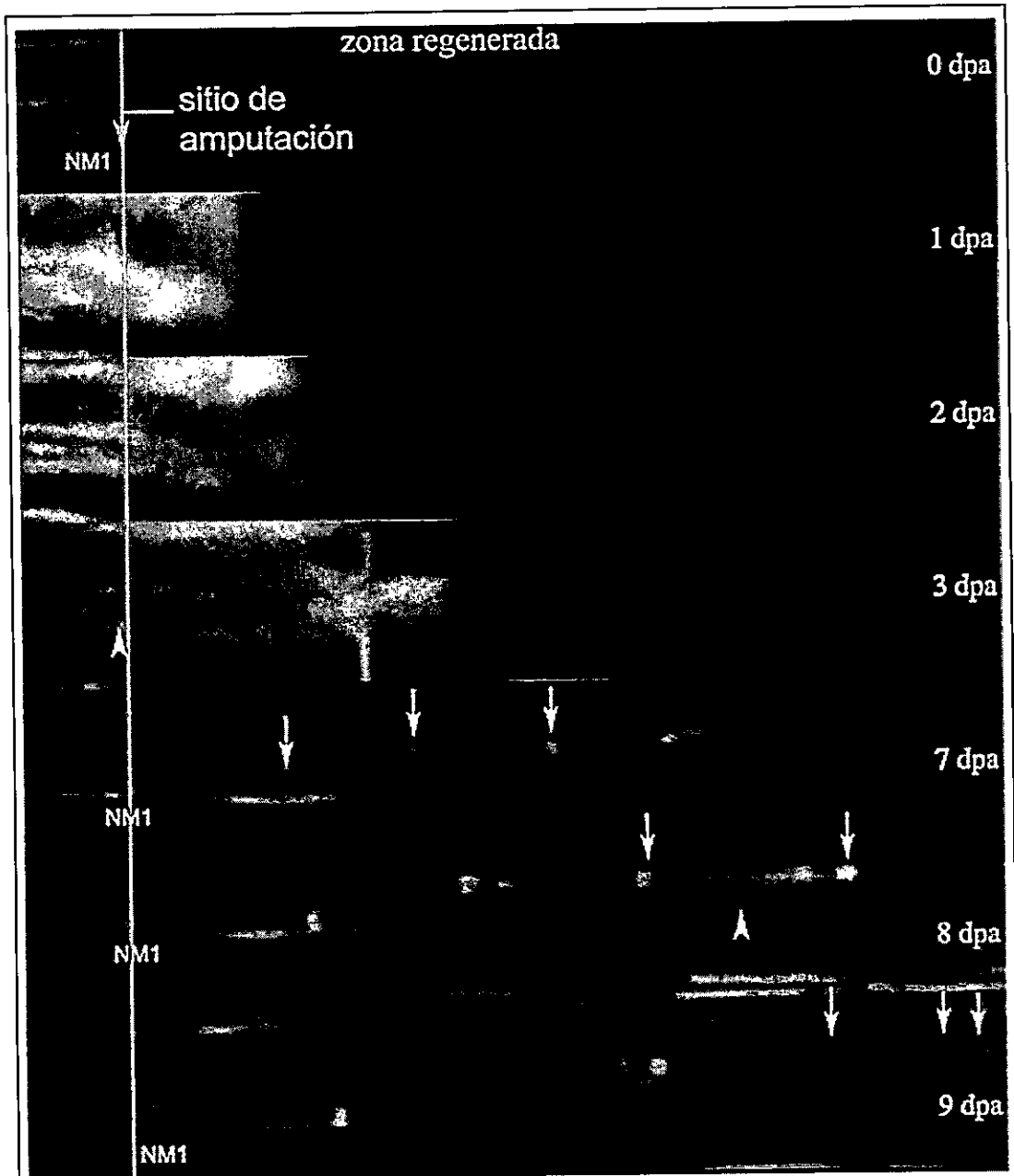


Figura 20. Regeneración de línea lateral caudal de pez cebra transgénico CldnB. Resumen de regeneración de LLC desde 0 dpa hasta 9dpa. Las puntas de flecha indican los puntos en donde comienzan las ramificaciones de las células interneuromásticas, mientras que las flechas indican un neuromasto generados *de novo*. Línea vertical: plano de amputación. dpa: días post- amputación.

Capacidad mecanotransductora de neuromastos generados *de novo*

Para corroborar la recuperación de la capacidad mecanotransductora de las células ciliadas en los neuromastos regenerados, se marcaron las células ciliadas de peces de 14dpa, con la tinción vital DiAsp. Estos peces fueron sumergidos por 5 minutos en agua de sistema con el marcador vital a una concentración de 50 μ M. Se compararon peces transgénicos con peces silvestre.

Ambos grupos presentaron incorporación de DiAsp en la región regenerada de la aleta caudal, al igual que en los neuromastos presentes en todo el cuerpo del pez. En el caso de peces de la línea transgénica Et#20, se observó una correspondencia entre los neuromastos determinados por la fluorescencia de las células del manto y las células ciliadas determinadas por la incorporación del marcador DiAsp. La Figura 21, muestra dos neuromastos de la línea lateral caudal regenerada y ejemplifica lo ocurrido a lo largo de toda la línea lateral. Todos los neuromastos visualizados con el GFP presentaron incorporación de DiAsp.

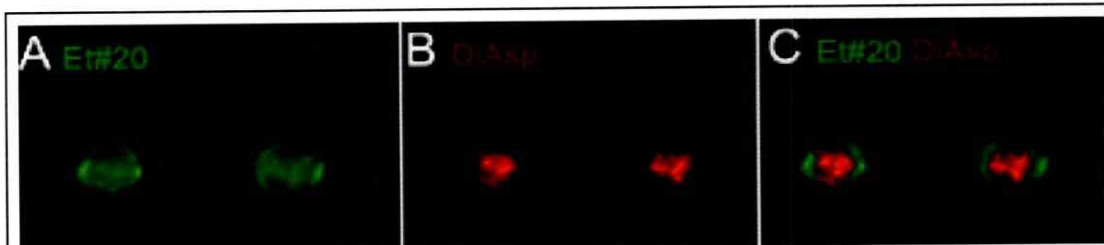


Figura 21 Capacidad mecanotransductora de neuromastos generados *de novo* de pez transgénico Et#20. Se muestran dos neuromastos pertenecientes a la línea lateral caudal regenerada de un pez cebra transgénico A: Se observan las células del manto GFP positivas de dos neuromastos. B: Los mismos neuromastos observados a través del canal rojo, en donde se da cuenta de la incorporación del DiAsp, y por ende, de su capacidad mecanotransductora. C: Merge.

Potencial regenerativo de la línea lateral

El proceso de regeneración de la aleta caudal ocurrió en todos los peces amputados, restableciéndose de manera íntegra la estructura de la aleta; regeneraron los segmentos de los rayos, la epidermis, los vasos sanguíneos, y el sistema mecanosensorial, compuesto por la línea lateral y el nervio que la inerva. La regeneración ocurrió tanto en los peces silvestre como en los transgénicos utilizados y no fue dependiente de la cepa utilizada, completándose luego de dos semanas posterior a la cirugía, momento en el cual se restableció la capacidad mecanotransdutora de las células ciliadas de la LL.

Se seleccionó un pez transgénico Et#20, al cual se le realizaron amputaciones sucesivas con un intervalo de 7 días entre cada una. Las amputaciones fueron en todos los casos realizadas en el mismo lugar, el cual fue fácilmente reconocible debido a la formación de un engrosamiento en la estructura ósea en el plano del corte. Se realizaron un total de 5 amputaciones, siendo en cada una de ellas, restaurada tanto la aleta caudal, como su línea lateral caudal, demostrando que la capacidad regenerativa permanecía luego de sucesivos cortes.

Regeneración en mutantes de línea lateral en estadio adulto

En el bioterio del laboratorio contamos con dos líneas mutantes que presentan defectos en la migración del primordio de la línea lateral: I) la línea mutante *odysseus*, gentileza de Darren Gilmour. Este mutante presenta una pérdida de función de la proteína Cxcr4b (Knaut et al 2003); y II) la línea mutante D17 generada por Leonardo Valdivia en nuestro laboratorio (no publicada), la cual presenta una mutación puntual recesiva en el gen *sdf1a*, molécula involucrada en la migración del priml (Valentin et al 2007). Como ya ha sido reportado previamente en varias publicaciones, la interacción entre el receptor CXCR4b expresado en las células migratorias del primordio y el quimioattractante SDF1a presente a través del miosepto horizontal, es lo que permite la migración del primordio de la línea lateral durante el proceso

embrionario (David et al 2002, Ghysen et al 2004, Li et al. 2004, Ghysen et al 2005, Valentin et al 2007, Ghysen et al 2007). También se ha relacionado a estas moléculas con el proceso regenerativo del aleta caudal (Dufourcq (a) et al 2006, Bouzaffour et al 2009).

En peces mutantes *odysseus* homocigotos adultos se observó previamente regeneración de la aleta caudal luego de amputación, mientras que en mutantes D17 aún no se ha reportado regeneración de la aleta caudal. Con la intención de realizar estudios funcionales con los mutantes, los usamos para estudiar qué ocurría con la línea lateral.

El mutante D17 homocigoto adulto no fue viable, mientras que el *odysseus*, luego de ser teñido con DiAsp, no presentaba neuromastos (Figura 22). Por lo que el estudio funcional no pudo ser realizado.

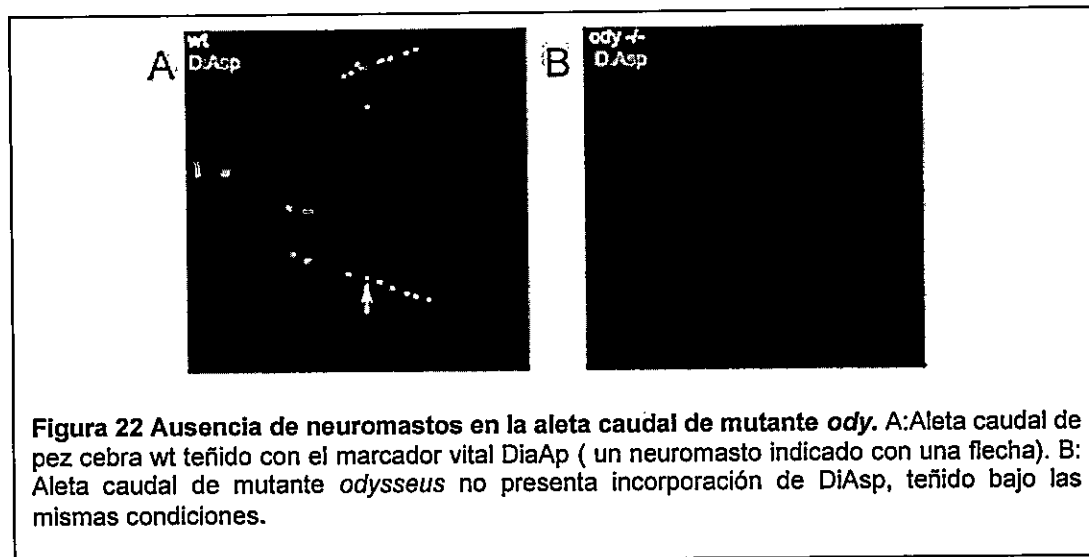


Figura 22 Ausencia de neuromastos en la aleta caudal de mutante *ody*. A:Aleta caudal de pez cebra wt teñido con el marcador vital DiaAp (un neuromasto indicado con una flecha). B: Aleta caudal de mutante *odysseus* no presenta incorporación de DiAsp, teñido bajo las mismas condiciones.

Conteo de células ciliadas

En primera instancia se realizó un registro fotográfico en 6 peces transgénicos de la línea Brn3c, utilizando la lupa de fluorescencia, de los últimos neuromastos previos al sitio de corte, donde sólo pudieron ser identificadas las células ciliadas. Visto de manera global y sin cuantificación, se apreció un aumento de la expresión de GFP en los neuromastos adyacentes al sitio de corte en los días posteriores de la regeneración (Figuras 12, 13, 16, 17).

Para comprobar si este era un hecho cuantificable, contamos las células ciliadas de los neuromastos previos al sitio de corte, desde el día de la amputación hasta 7 días posteriores a ella. El estudio se realizó registrando el proceso regenerativo de 10 peces cebras transgénicos Brn3c..

Cuantificamos el número de células ciliadas presentes en el neuromasto más próximo al sitio de corte observando en el microscopio de epifluorescencia. Se cuantificaron directamente y además se registraron fotos del último neuromasto, para luego corroborar la cuantificación con la visualización de las imágenes en el programa Adobe Photoshop. Se cuantificaron las células ciliadas como se ejemplifica en la Figura 23.

El comportamiento preferente que presentó el neuromasto terminal de los peces estudiados luego de la amputación, fue una disminución en el número de células ciliadas hasta los 4dpa. Luego, la tendencia se revirtió y el número de células ciliadas aumentó por sobre la cantidad que presentaban antes del corte. En la Figura 24, se grafica este comportamiento, considerando el total de células ciliadas de los NM1 de todos los peces . Los datos fueron tabulados en Tabla 3.

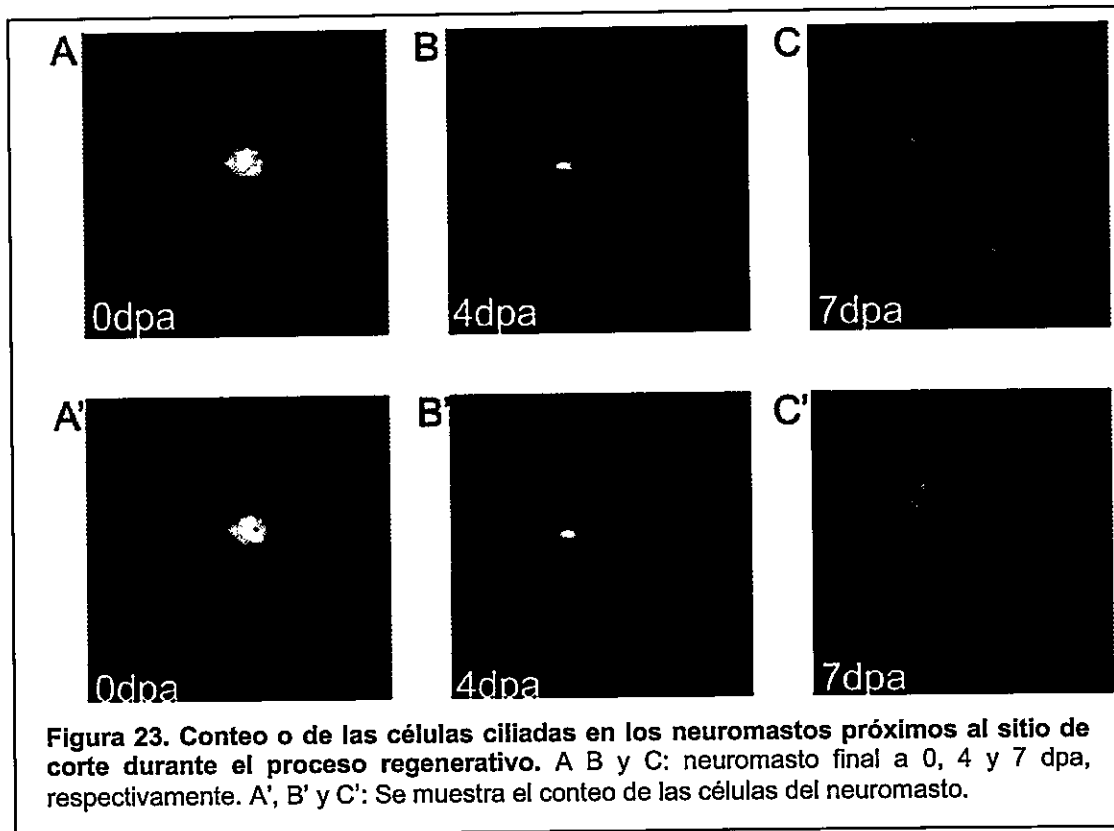


Figura 23. Conteo o de las células ciliadas en los neuromastos próximos al sitio de corte durante el proceso regenerativo. A B y C: neuromasto final a 0, 4 y 7 dpa, respectivamente. A', B' y C': Se muestra el conteo de las células del neuromasto.

NM 1	pez 1	pez 2	pez 3	pez 4	pez 5	pez 8	pez 10	HC totales/día
Día 0	7	4	10	6	14	12	8	61
Día 1	3	5	6	4	14	8	7	47
Día 2	0	4	4	4	14	1	7	34
Día 3	2	4	3	2	14	6	6	37
Día 4	2	2	2	6	14	5	6	37
Día 5	2	2	8	4	15	4	6	41
Día 6	9	5	9	6	18	11	9	67
Día 7	9	6	21	10	19	15	10	90

Tabla 3 Datos de la variación del número de células ciliadas del último neuromasto, de 7 peces cebra transgénicos Brn3c durante los 7dpa. Los peces fueron visualizados bajo el microscopio de epifluorescencia, y se cuantificaron el número de células ciliadas presentes en el último neuromasto (próximo al plano de amputación), estos fueron sumados y graficados en la figura 24. Dpa: Días post-amputación. HC: hair cells o células ciliadas.

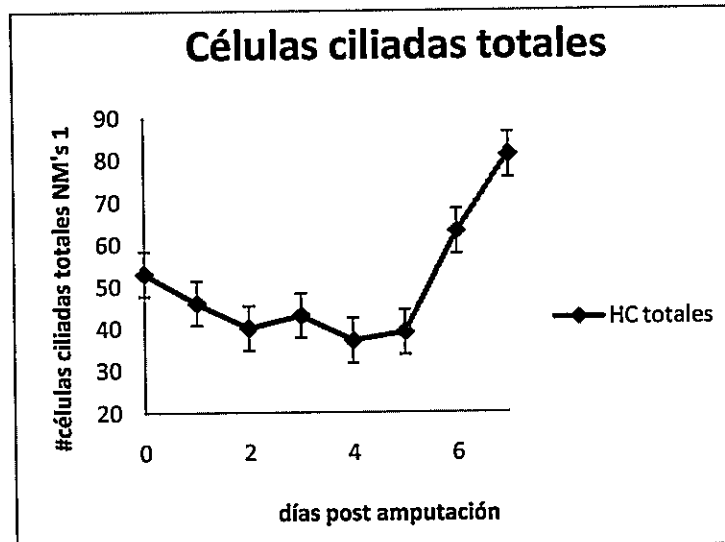


Figura 24 Comportamiento de las células ciliadas en los neuromastos próximos al sitio de corte durante el proceso regenerativo. El grafico refleja la disminución y posterior aumento de las células ciliadas, promediado de un total de 7 peces cebras transgénicos Brn3c, durante los 7dpa.

El gráfico se realizó finalmente con un n=7, debido a que un pez murió en la mitad del conteo durante el experimento, y otros dos presentaron un comportamiento distinto con respecto al promedio: uno luego del corte no presentó nuevos neuromastos, y en el otro, previo al corte, no se eran distinguibles neuromastos en la región de la aleta caudal estudiada (parte inferior). Este último caso, si bien no fue incluido en la recopilación de datos, se siguió observando. A los 4dpa aparecieron células ciliadas en la parte regenerada de este pez, en la región de la aleta que se estaba observando. En la Tabla 4 se tabulan los resultados vistos en los dos peces no incluidos en el gráfico anterior.

dpa	pez 6	pez 7
0	3	0
1	0	0
2	0	0
3	0	6
4	0	15
5	0	15
6	0	20
7	0	20

Tabla 4. Datos de la variación del número de células ciliadas del último neuromasto durante los 7dpa, de los 2 peces cebras transgénicos Brn3c que tuvieron una excepcional regeneración. Tanto el pez 6 como el pez 7 presentaron un patrón diferente al ocurrido en la mayoría de los otros estudiados, el pez 6 luego de realizada la amputación no presentó regeneración de esa línea lateral caudal, mientras que el pez 7 que inicialmente no presentaba evidencia de línea lateral caudal en la zona estudiada, luego de realizado el corte aparecieron células ciliadas en un nuevo NM1.

Se tomaron tres períodos de tiempo 0dpa, 4dpa y 7dpa. En la tabla 5 se recopilan los valores obtenidos de células ciliadas correspondientes a los NM1 de los 7 peces considerados en el estudio, los que fueron agrupados por período de tiempo.

pez	0dpa	4dpa	7dpa
1	7	2	9
2	4	2	6
3	10	2	21
4	6	6	10
5	14	14	19
8	12	5	15
10	8	6	10

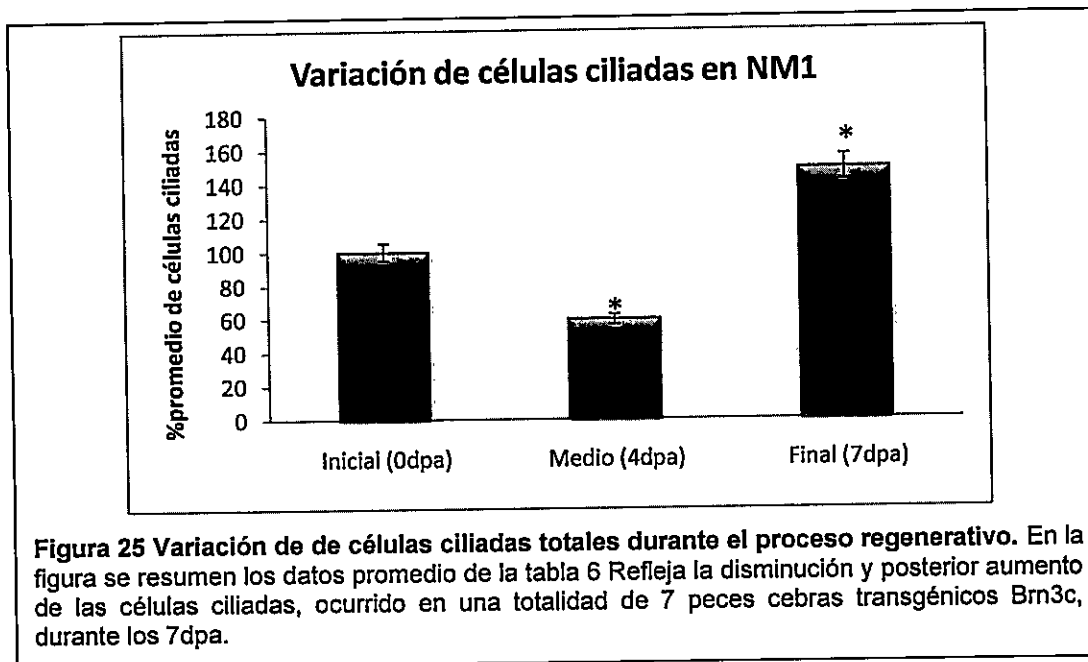
Tabla 5. Número de células ciliadas pertenecientes a los NM1 totales. Esta tabla reúne los el número de células ciliadas presentes en los NM1 de cada pez, en tres tiempos de la regeneración: 1 = 0dpa, 2 = 4 dpa y 3 = 7 dpa. El promedio de estos datos fueron graficados en la figura 25

Estos valores mostrados en la Tabla 5 muestra gran variabilidad entre ellos, por lo que, estos datos fueron normalizados con respecto a si mismo, antes de comparar los NM1 en distintos períodos de tiempo. Luego estos datos fueron promediados en cada uno de los períodos de tiempo, y fueron graficados, con el fin de ver la variabilidad total de células ciliadas de los NM1 en tres períodos distintos del proceso regenerativo.

Los datos normalizados son agrupados en la Tabla 6.

pez	Inicial (0dpa)	Medio(4dpa)	Final(7dpa)
1	100	28,6	128,6
2	100	50	150
3	100	20	210
4	100	100	166,7
5	100	100	135,7
8	100	41,7	125,0
10	100	75	125
Promedio	100	59,32	148,7

Tabla 6. Normalización de datos y comparación de los tres períodos de tiempo. En la tabla se muestra como valor inicial (0dpa) igual al 100%, y luego se calcula el porcentaje de células ciliadas del NM1 de cada pez, en dos períodos de tiempo posteriores; medio (4dpa) y final (7dpa), con respecto al valor inicial.



DISCUSIÓN

La regeneración es un mecanismo considerado como parte del desarrollo del individuo, debido a que comparte mecanismos celulares y moleculares con procesos ocurridos durante la embriogénesis y el desarrollo post-embriionario. La regeneración epimórfica, es iniciada con la generación de un blastema, estructura especializada que se forma durante este proceso, y el cual es la principal diferencia del proceso embrionario con el regenerativo. En esta estructura, se pueden encontrar células indiferenciadas, provenientes del tejido preexistente, que darán formación al tejido regenerado (Poss et al. 2003). Luego de una amputación parcial de la aleta caudal, la regeneración de esta misma permite restablecer de manera total e íntegra la conformación que poseía antes del daño. Dentro de las partes recobradas se encuentra el sistema caudal de la línea lateral (Dufourcq (b) et al. 2006). Una de las preguntas iniciales que se trató de resolver sobre este tema, fue el origen de las células que conforman esta línea lateral generada *de novo*. Las primeras aproximaciones comprobaron que dicho origen no se encontraba en las células que conformaban el blastema, sino más bien en células que conforman la línea lateral previa al sitio de corte. Estas células tendrían propiedades de células progenitoras, y aunque se desconoce su procedencia exacta se ha postulado que serían las células del manto, que contarían con un grado menor de diferenciación, pudiendo desdiferenciarse y adquiriendo propiedades migratorias. Estos estudios se han realizado *in vitro* mediante técnicas de inmunohistoquímica con material fijado (Dufourcq (b) et al. 2006).

Se ha demostrado que durante el proceso regenerativo, entre las 24 y 36hpa, un tipo celular con conformación alargada y ubicada en la periferia del neuromasto más próximo al sitio de corte, es capaz de incorporar el análogo de timidina, bromodeoxiuridina en su ADN, no ocurriendo así en neuromastos de zonas más proximales del aleta caudal del pez (Dufourcq (b) et al. 2006; Jones et al. 1996). Dada la forma y ubicación de estas células se sugirió que serían células del manto, y que estas células, en el neuromasto más distal, serían capaces de dividirse. Cabe destacar, que estos estudios no identifican de manera certera a la célula

progenitora, debido a que se carece de marcadores moleculares que permitan reconocer las células del manto. Además, como estos experimentos fueron realizados *in vitro*, los resultados dependieron en gran parte, de las condiciones de la muestra que se encontraban analizando. Es así, como dichos experimentos no reflejan lo que está ocurriendo durante el proceso regenerativo en los otros tipos celulares y en otros momentos de la regeneración, de manera global e integrada.

Mediante el uso de cepas transgénicas que expresan GFP en células de la línea lateral, en las que fué posible seguir diferentes tipos celulares en tiempo real y en un mismo individuo, realizamos una caracterización del proceso regenerativo de la línea lateral caudal de la manera más completa posible, tomando en consideración el hecho de que, a diferencia de como se trabaja en larvas y embriones, en peces adultos es se dificulta la realización *time lapse* (microscopía en tiempo extendido), ya que el pez puede permanecer sólo unos pocos minutos fuera del agua y anestesiado. Así fue como visualizamos el proceso *in vivo* y en un mismo individuo registrando los cambios producidos cada 24 horas luego de la amputación.

Combinando los eventos ocurridos en los distintos transgénicos, fue posible complementar la información obtenida *in vitro* y tener una mayor aproximación del proceso regenerativo del sistema caudal de la línea lateral.

El potencial regenerativo que subyace en el sistema caudal de la línea lateral posterior se ve reflejado en la persistente capacidad que posee dicho sistema para regenerar en su totalidad, es decir, para regenerar toda la estructura de la línea lateral posterior *de novo*, a partir de unas pocas células remanentes en la línea lateral luego de una amputación, como hemos visto en este trabajo.

En cuanto al proceso global, la regeneración de la línea lateral es restaurada a cabalidad a los 14dpa, al igual como ocurre con la regeneración de la aleta misma. En los distintos transgénicos, los peces amputados volvieron a presentar fluorescencia en la región regenerada a lo largo de toda la aleta, dando cuenta de una recuperación de la línea lateral: se recobraron las células ciliadas, las células del manto, interneuromásticas y de soporte, así como también la

capacidad mecanotransdutora de estos neuromastos. Así corroboramos que no sólo se establece estructural sino también funcionalmente (Figura 21).

Realizamos comparaciones de una misma línea lateral durante el proceso regenerativo en las distintas cepas transgénicas, utilizando todos los casos, las uniones de los segmentos de los rayos óseos como punto de referencia.

Los mayores aportes a este estudio los encontramos visualizando la línea transgénica Et#20, debido a que es posible seguirla durante todo el proceso regenerativo. Las células del manto GFP positivas presente en neuromastos próximos al sitio de corte, experimentaron variaciones en tamaño y forma: aumentaba su fluorescencia y su forma pasaba de ser circular a más aplanada que la que tenían normalmente. Este cambio de forma, tamaño y expresión de GFP se puede deber principalmente a un aumento en el número de células GFP positivas en la periferia del neuromasto, y como este aumento se producía no sólo en las células del manto, sino también en las células interneuromásticas, los neuromastos adquirirían una forma más alargada, que era traducida en un aplanamiento de la forma circular. Este hecho, ratifica la observación de proliferación en las células del manto vista en trabajos anteriores, pero añade la alteración producida en la hilera de las células interneuromásticas y en el desplazamiento hacia distal de las mismas, debido al corte. Estas hilera de células que unen los neuromastos, no aumenta sólo en grosor, sino además, presenta ramificaciones que da cuenta de una posible pérdida de adhesión de estas células, las que se encuentran en contacto con glías, que intervendrían en su estructura ordenada y empaquetada. Estudios previos ya le han otorgado, a este grupo celular, propiedades de precursoras de neuromastos: durante la generación de neuromastos secundarios en el desarrollo post-embriionario. De esta misma forma, la participación y contribución de las células interneuromásticas, junto con las células del manto, daría la origen a las células que posteriormente conformarían la línea lateral regenerada. Además, un evento importante observado en el proceso, es el desplazamiento de las células GFP positivas desde la región previa al corte, hacia la región regenerada. Esta migración no sucedió mediante el desplazamiento de una estructura compacta tipo primordio, sino más bien,

como ramificaciones de las células interneuromásticas que avanzaban de proximal a distal, hasta completar la nueva línea lateral. Cabe destacar que a medida que estas células avanzan van agrupándose, formando estructuras tipo proneuromastos que mantienen sus propiedades migratorias, y siguen avanzando hasta asentarse, momento en el cual, adquieren la forma circular de neuromasto y aumentan en su fluorescencia, y por ende, en su número de células. Todo indica que tanto las células del manto como las interneuromásticas contribuirían con precursores que no solo serían capaces de proliferar, sino también migrar a través de la nueva región regenerada. Posiblemente estas células serían potenciales progenitoras que se encuentran en un estado mínimo de diferenciación. Terminado el proceso regenerativo, la línea lateral completa adquiere su estructura original: neuromastos funcionales separado por distancias regulares, de tamaño promedio unidos por una hilera de células interneuromásticas fielmente empaquetada.

En los casos en que el último neuromasto (NM1) se encontraba muy cerca del sitio de corte (desde yuxtapuesto a este, hasta una distancia aproximada de 2 diámetros de neuromasto), su fluorescencia disminuyó significativamente. Esto pudo producirse porque las células presentes en dicho neuromasto fueron eliminadas producto del daño producido por el corte o porque estas células adquirieron una diferenciación distinta a la que tenían previamente, es decir, se transdiferenciaron. Esto ocurrió entre el día del corte y 2dpa. Este hecho puntual fue altamente desventajoso en el cumplimiento riguroso del propósito principal de este estudio, debido a que esta disminución de la fluorescencia hizo imposible seguir las células del manto que conformaban el neuromasto final y determinar el origen exacto de las células que migran. A pesar de lo anterior, se determinó que el neuromasto próximo al sitio de corte se reestructura, perdiendo su conformación ordenada tipo roseta.

En todos los casos de regeneración estudiados con transgénicos Brn3c, hubo neuromastos (identificados con la expresión de GFP en las células ciliadas de estos mismos), muy próximos al sitio de corte, incluso en el sitio del corte mismo, que permanecieron visibles en la lupa de fluorescencia, luego de realizado el corte. En la mayoría de estos casos, las células ciliadas de

estos neuromastos ya no eran visibles al 1dpa, y cuando esta fluorescencia aún permanecía, lo hacía con una intensidad de fluorescencia mucho menor que la que presentaban antes de la amputación. Además los neuromastos cercanos al corte, NM2, NM3 y NM4, en casi todas las ocasiones presentaron modificaciones en su forma y posición; se reorganizaron, perdiendo en un principio su forma conglomerada; varió su número de células (como confirmamos en el conteo de células ciliadas), disminuyendo en un principio (hasta 4dpa), y aumentando transcurrida la regeneración. Esto dependió de la posición en la cual estos se encontraban, mientras más cercana su posición con respecto al sitio de corte, mayores modificaciones experimentaban (Figuras 23, 24 y 25).

Los neuromastos generados *de novo* que primero aparecieron en la zona regenerada, comenzaron a visualizarse desde el 5dpa, hasta el 7dpa. Y si bien aparecieron muy cercanos a la posición final que estos tendrían, la fluorescencia, en algunos casos, comenzó a expresarse con anterioridad a su asentamiento definitivo. Esto puede deberse a que las células de los nuevos neuromastos comienzan a diferenciarse a medida que el proneuromasto se está formando, es decir, las células que conformaran este neuromasto, ya presentan grados de diferenciación antes de alcanzar la posición final. En los casos en que neuromastos finales en la región previa al corte, se encontraban muy próximos entre sí, estos comenzaron a juntarse hasta verse fusionados, generando un solo neuromasto con un gran número de células ciliadas. En los transgénicos Sox3h7 la única variación con respecto a los demás transgénicos, fue la temporalidad de aparición de fluorescencia en la región regenerada, la que ocurrió entre 7 y 13dpa. Se puede especular que los progenitores de ciliadas disminuyen sus niveles de *sox3* al migrar y proliferar, tal como ocurre en la regeneración de ciliadas luego del corte con *sox2* (Hernández et al, 2007)

Finalmente, en los transgénicos CldnB, no vimos la presencia de un primordio como el observado durante la embriogénesis que migrase de manera agrupada y cohesionada. La temporalidad de asentamiento de neuromastos en la zona regenerada y el movimiento de las células, fue similar a la observada con el transgénico Et#20.

En resumen, en los peces cebra transgénicos Et#20, Brn3c y CldnB, la temporalidad de aparición de neuromastos en la región regenerada, es similar: alrededor del 6dpa. Luego de 7dpa es posible distinguir neuromastos generados *de novo*, debido a la expresión de GFP en agrupaciones de células semejantes a un neuromasto. En cambio, en los peces transgénicos Sox3h7, los neuromastos fueron visibles a partir del séptimo día en adelante. Esta evidencia es consistente con el hecho de que, si asumimos que son las células del manto e interneuromásticas las que migran, una vez que se asientan, ya estarán expresando GFP en el transgénico Et#20, mientras que en el transgénico CldnB, todas las células de la línea lateral expresan GFP, por lo que sí son las células interneuromásticas, también se verá reflejado en este transgénico. En el transgénico Brn3c también es visible en este momento, debido a que una vez que los neuromastos se asientan, se diferencian las células ciliadas.

El corte genera un contexto distinto al existente antes de que este fuese realizado, las moléculas expresadas varían, comenzando a expresarse moléculas inductoras de proliferación: *lef1* y *wnt5*, las que se ha comprobado que intervienen en la proliferación necesaria para la formación del blastema. Además, se ha comprobado la expresión de β -catenina desde unas horas posteriores al corte, hasta finalizado el proceso regenerativo y esta estaría participando en la interacción célula-célula, necesaria en la migración de un grupo de células. Moléculas como estas pueden a su vez estar influyendo sobre las células de la línea lateral y participando en la regeneración de la misma. Un detallado estudio molecular sería necesario para asociar cada molécula, con los distintos eventos vistos en este trabajo.

El aumento del número de células ciliadas nos dio cuenta de una posible intervención del corte en este proceso, así como también se podría relacionar el aumento de la fluorescencia y tamaño de los neuromastos en el transgénico Et#20.

De haberse observado LLC en los mutantes de *cxcr4b* y *sdf1a* podríamos haber relacionado la participación de dichas moléculas en el proceso de regeneración, las cuales son responsables de la migración del primordio de la línea lateral durante la embriogénesis.

La caracterización global del proceso de regeneración, sería idealmente complementada con un estudio de linaje, lo que sería necesario para poder dilucidar el origen de los nuevos neuromastos regenerados. Por lo mismo, nosotros realizamos dos experimentos con el fin de complementar estos estudios, aunque estos no fueron mencionados en este escrito debido a los infructuosos resultados obtenidos.

Trabajo con dobles transgénicos: Realizamos un cruce de Et#20 con dos cepas transgénicas, generando así dos cepas nuevas:

- a) Et#20 x α tubulina
- b) Et#20 x atoh1a:tom

Estas cepas fueron generadas con el fin de poder seguir las células del manto en neuromastos adyacentes al corte a pesar de su "apagamiento" de GFP en transgénico Et#20. El primer doble transgénico fue desarrollado a partir de un cruce de Et#20 homocigotos con heterocigotos de α -tubulina, los que presentaban GFP nuclear en todas las células del pez.

En el F1 encontramos un 50% de dobles transgénicos, los que fueron crecidos hasta la adultez (3 meses). Los peces fueron visualizados bajo la lupa y el microscopio de epifluorescencia. Nuestra intención era reconocer las células del neuromasto próximo al sitio de corte, aún cuando éste presentase una disminución en la fluorescencia. Los neuromastos de los peces heterocigotos para α -tubulina eran fácilmente distinguibles, debido a que la estructura en forma de roseta que presentan las células del neuromasto, hacen que los núcleos se agrupen y sean fácilmente distinguibles. La desventaja se produjo cuando, al hacer el cruce con los peces transgénicos Et#20, el ruido de fluorescencia de este último "opacaba" la fluorescencia del GFP del transgénico α tubulina.

El transgénico de atoh1a:tom, marca la células ciliadas, temporalmente antes que el transgénico Brn3c, y con la diferencia que en vez de expresar GFP, expresa RFP.

Los dobles transgénicos (50% de la F1) fueron crecidos hasta el estadio adulto (3

meses), y al ser amputados los peces, los últimos neuromastos próximos al sitio de amputación también perdían la expresión de RFP.

Marcaje con el trazador celular: utilizamos Dil (1,1'-dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina perclorato ó DiIC₁₈(3)), un marcador de membrana lipofílico fluorescente rojo capaz de difundir lateralmente y marcar la célula completa. Nosotros microinyectamos en células del manto GFP positivas de peces transgénicos Et#20, utilizando un *set up* montado con la lupa de fluorescencia y microinyector. Pero al no poseer una tecnología acondicionada para realizar una precisa microinyección, el daño ejercido en el neuromasto generaba un desacoplamiento del neuromasto, y ya no se expresaba GFP, lo que impidió el seguimiento.

El potencial regenerativo que se encuentra en células de la línea lateral persiste aun después de reiteradas amputaciones, dando cuenta que dicho potencial se mantiene en la línea lateral que permanece previa al sitio de corte. Con esto podemos especular sobre la permanencia de células progenitoras en la línea lateral de manera. Las que permiten recobrar la estructura y función de la línea lateral luego de varias amputaciones.

Es así como se puede afirmar que, a diferencia de lo que ocurre en la regeneración de células ciliadas, las células progenitoras no provendrían de las células SOX3 positivas, sino que estarían involucradas las células del manto y las células interneuromásticas.

En síntesis:

- Seleccionamos cepas transgénicas que nos permitieron seguir el proceso regenerativo de manera secuencial *in vivo*.
- Dichas cepas transgénicas nos permitieron caracterizar en proceso a nivel global y establecer su temporalidad, describiendo el comportamiento experimentado por la LLC previa al plano de amputación durante la regeneración.
- La línea lateral regenerada provendría de células del manto e interneuromásticas presentes en la región previa al corte, la que genera una LL funcional en la región regenerada.

- La capacidad regenerativa de la LL persistió luego de sucesivos cortes y regeneraciones.
- No fue posible determinar la participación de las moléculas CXCR4b y SDF1a dentro de este estudio, con la utilización de mutantes para estas moléculas, debido a la ausencia de la LL en el mutante *ody* y a la letalidad del mutante homocigoto para *sdf1a*.

Es necesario complementar con estudios moleculares y de linaje más precisos que discrimine la contribución de las células del manto versus interneuromásticas en el proceso.

CONCLUSIONES

Este trabajo complementa los estudios de regeneración de la línea lateral caudal previamente realizados en pez cebra, corroborando la participación activa de las células del manto y sumando a éstas, las células interneuromásticas como potenciales progenitoras de las células que conformarían la línea lateral caudal regenerada, ampliando el espectro de células progenitoras presentes en el aleta caudal del pez cebra, y más específicamente aún, en la línea lateral caudal. Siendo este punto el tema central de una de las líneas de investigación del laboratorio: la búsqueda de células progenitoras quiescentes en los neuromastos. Además, si bien el proceso regenerativo de la línea lateral podría molecularmente ser similar al proceso embrionario de esta misma, no ocurre a través de un primordio que migra depositando los neuromastos, si no que ocurre por la migración directa de las células anteriormente mencionadas.

Sin duda, son necesarios estudios moleculares y de linaje celular, para dar un origen exacto a las células que conforman los neuromastos generados *de novo*.

PROYECCIONES

Para realizar estudios de linaje celular que nos permitan identificar directamente los precursores de las células que conforman la línea lateral posterior regenerada con sus neuromastos generados *de novo*, es necesario marcar un grupo restringido de células que pertenezcan a uno de los candidatos de progenitores: células del manto y células interneuromásticas. Una alternativa es realizar fotoactivación de una proteína fluorescente fotoconvertible, ubicada en uno de los grupos de células candidatas. La proteína que ha sido usada y estandarizada para el uso en embriones de peces cebra, es Kaede, una proteína que es fluorescente verde después de su síntesis, pero que es fotoconvertida a rojo usando luz violeta o ultravioleta. Esta debiera ser expresada por un pez transgénico estable en todas las células que lo conforman, incluidas las células del manto, las que son fácilmente identificadas en un microscopio debido a su morfología celular. Otra alternativa, es mejorar y estandarizar la técnica de marcaje de las células del manto con el trazador celular Dil en peces cebra transgénicos Et#20. Para esto es necesario acoplar el sistema de microinyección a un microscopio que permita precisión en la inyección, ya que para realizar el seguimiento, es necesario que las células no presenten un daño que pueda comprometer la permanencia del neuromasto.

Realizar un estudio detallado de la proliferación de los distintos tipos celulares y en distintos tiempos de la regeneración. Esto permitiría resolver de manera molecular si las células del manto e interneuromásticas experimentan proliferación. Para esto es necesario contar con marcadores de tipos celulares que nos permitan identificar dichas células y correlacionarlas con la incorporación de BrdU.

Además es necesario resolver cuáles son las moléculas responsables de la migración que experimentan estas células para alcanzar su posición final dentro de la línea lateral regenerada es una tarea que queda pendiente dentro de la investigación y es necesario para continuar la comparación con el proceso ontogénico, donde quimioquinas y sus receptores, sdf1a y

cxcr4/cxcr7, respectivamente, participan en la migración que dirige el primordio a través del miosepto horizontal ubicado en el centro a lo largo de todo el tronco del pez.

Complementar este estudio con la caracterización de una cepa transgénica que nos permita seguir el comportamiento de las células gliales, también podría contribuir a corroborar o descartar el desempaquetamiento de las células interneurónicas producto del corte.

BIBLIOGRAFÍA

- Akimenko, M.; Marí-Beffa, M.; Becerra, J. y Géraudie, J. 2003. Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration. *Developmental Dynamics*. 226: 190-201.
- Bouzafour, M.; Dufourcq, P.; Lecaudey, V.; Haas, P. y Vríz, S. 2009. Fgf and Sdf-1 pathways interact during zebrafish fin regeneration. *PLoS ONE*. 4(6): e5824
- Collazo, A.; Fraser, S. y Mabee, P. 1994. A dual embryonic origin of vertebrate mechanoreceptors. *Science*. 264: 426-430.
- Dambly-Chaudière, C.; Sapède, D; Soubiran, F.; Decorde, K; Gompel, N. y Ghysen A. 2003. The lateral line of zebrafish: a model system for the analysis of morphogenesis and neural development in vertebrates. *Biology of the Cell*. 95: 579-587.
- David, N., Sapède, D; Saint-Etienne, L; Thisse, C.; Thisse, B.; Dambly-Chaudière, C.; Rosa F. y Ghysen A. 2002. Molecular basis of cell migration in the fish lateral line: Role of the chemokine receptor CXCR4 and of its ligand, SDF1. *PNAS*. 99(25): 16297-16302.
- Dufourcq, P. (a) y Vríz, S. 2006. The chemokine SDF-1 regulates blastema formation during zebrafish fin regeneration. *Development Genes and Evolution*. 216: 635-639.
- Dufourcq, P. (b); Roussigné, M.; Blader, P.; Rosa, F.; Peyrieras, N.; Vríz, S. 2006. Mechanosensory organ regeneration in adults: The zebrafish lateral line as a model. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 33: 180-187.
- Durán, I. 2009. Modelos de regeneración. *Encuentros de Biología*. 122: 3-4.
- Gilbert, S. 2003. Chapter 18: Metamorphosis, regeneration and aging. *Developmental Biology*. Seventh Edition. Sinauer Associates, Publishers. 575-612,
- Ghysen, A. y Dambly-Chaudière. 2004. Development of the zebrafish lateral line. *Current Opinion in Neurobiology*. 14: 67- 73.
- Ghysen, A. y Dambly-Chaudière. 2005. The three-sided romance of the lateral line: glia love axons love precursors love glia. *BioEssays*. 27: 488- 494.
- Ghysen, A. y Dambly-Chaudière. 2007. The lateral line microcosmos. *Genes and Development*. 21: 2118- 2130.
- Gompel, N.; Cubedo, N.; Thisse, C.; Thisse, B.; Dambly-Chaudière, C. y Ghysen A. 2001. Pattern formation in the lateral line of zebrafish. *Mechanism of Development*. 105: 69-77.
- Grant, K. y Raible, D. 2005. Regulation of the latent sensory hair cell precursor by glia in the zebrafish lateral line. *Neuron*. 45: 69-80.
- Hass, P. y Gilmour, D. 2006. Chemokine signaling mediates self-organizing tissue migration in the zebrafish lateral line. *Developmental Cell*. 10: 673-680.
- Hernández, P.; Olivari, F.; Sarrazín, A; Sandoval, P. y Allende, M. 2007. Regeneration in zebrafish lateral line neuromast: expression of the neural progenitor cell marker sox2 and proliferation-dependent and independent mechanisms of hair cell renewal. *Developmental Neurobiology*. 67: 637-654.

- Jones, J. y Corwin, J.** 1996. Regeneration of sensory cell after laser ablation in the lateral line system: hair cell lineage and macrophage behavior revealed by time-lapse video microscopy. *The Journal of Neuroscience*. 16: 649-662.
- Knaut, H.; Werz, C.; Geisler, R.; The Tübingen 2000 Screen Consortium y Nüsslein-Volhard.** 2003. A zebrafish homologue of the chemokine receptor *Cxcr4* is a germ-cell guidance receptor. *Nature*. 421: 279-282.
- Li, Q.; Shirabe, K.; Kuwada, J.** 2004. Chemokine signaling regulates sensory cell migration in zebrafish. *Developmental Biology*. 269: 123-136.
- López-Schier, H. y Hudspeth A.** 2005. Supernumerary neuromasts in the posterior lateral line of zebrafish lacking peripheral glia. *PNAS*. 102(5): 1496-1501.
- Ma E, Raible D.** 2009. Signaling Pathways Regulating Zebrafish Lateral Line Development. *Current Biology*. 19: R381-R386.
- Metcalf, W. y Kimmel, C.** 1985. Anatomy of the posterior lateral line system in young larvae of the zebrafish. *The Journal of the Comparative Neurology*. 233: 377-389.
- Navratilova, P.; Fredman, D.; Hawkins, T.; Turner, K; Lenhard, B. y Becker, T.** 2008. Systematic human/zebrafish comparative identification of *cis*-regulatory activity around vertebrates development transcription factor genes. *Developmental Biology*. 327: 526-540.
- Núñez, V.; Sarrazin, A.; Cubedo, N.; Allende, M; Dambly-Chaudière, C. y Ghysen A.** 2009. Post-embryonic development of the posterior lateral line in the zebrafish. *Evolution & Development*. 11: 391-404.
- Nüsslein-Volhard, C. y Dahm, R.** 2002. Zebrafish: Practical Approach. *University Press*. Chapter 1 : 7-37.
- Parinov, S.; Kondrichin, I.; Korzh, V. y Emelyanov, A.** 2004. Tol2 transposon-mediated enhancer trap to identify developmentally regulated zebrafish genes in vivo. *Developmental Dynamics*. 231:449-459.
- Poss, K.; Shen, J. y Keating M.** 2000a. Induction of *lef1* during zebrafish regeneration. *Developmental Dynamics*. 219: 282-286.
- Poss, K.; Shen, J.; Nechipouruk, A.; McMahon, G.; Thisse, B.; Thisse, C. y Keating M.** 2000b. Roles for Fgf signaling during zebrafish fin regeneration. *Developmental Biology*. 222: 347-358.
- Poss, K.; Keating M.; Nechipouruk, A.** 2003. Tales of regeneration in zebrafish. *Developmental Dynamics*. 226: 202-210.
- Raible, D. y Kruse, G.** 2000. Organization of the lateral line system in embryonic zebrafish. *The Journal of the Comparative Neurology*. 421: 189-198.
- Sapède, D; Gompel, N.; Dambly-Chaudière, C. y Ghysen A.** 2002. Cell migration in the postembryonic development of the fish lateral line. *Development*. 129: 605-615.
- Stocum, D.** 2006. Chapter 5: Regeneration of neural tissue. *Regenerative biology and medicine*. First Edition. Academic Press, Publisher. 89-123.

Thatcher, E. Paydar, I.; Anderson, K. y Patton J. 2008. Regulation of zebrafish fin regeneration by microRNAs. *PNAS*. 105: 18384-18389.

Valentin, G.; Haas, P. y Gilmour D. 2007. The chemokine SDF1a coordinates tissue migration through the spatially restricted activation of Cxcr7 and Cxcr4b. *Current Biology*. 17: 1026-1031.

Wada, H.; Hamaguchi, S. y Sakaizumi, M. 2008. Development of diverse lateral line patterns on the teleost caudal fin. *Developmental Dynamics*. 237: 2889-2902.

Whitfield, T. 2002. Zebrafish as a model for hearing and deafness. *Neurobiology*. 53: 157-171.

Williams, J. y Holder, N. 2000. Cell turnover in neuromastos of zebrafish larvae. *Hearing Research*. 143: 171-181.

Xiao, T.; Roeser, T.; Staub, W. y Baier, H. 2005. A GFP-based genetic screen reveals mutations that disrupt the architecture of the zebrafish retinotectal projection. *Development*. 132: 2955-2967