

UCH-FC
Biotecnología
048
C. 1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

Seminario de Título

**“MUERTE CELULAR POR EXPOSICIÓN A COBRE Y REGENERACIÓN EN LA
LÍNEA LATERAL DEL PEZ CEBRA”**

Entregado a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al Título de
Ingeniero en Biotecnología Molecular
por

Francisco Andrés Olivari Bahamondes

Mayo 2008
Santiago – Chile

Director del Seminario de Título: Dr. Miguel Allende C.



UCH-FC
B. Mol
D. 48
C-1

ESCUELA DE PREGRADO - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE



“Muerte celular por exposición a cobre y regeneración en la línea lateral del pez cebra”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

FRANCISCO ANDRES OLIVARI BAHAMONDES

Dr. Miguel Allende Connelly
Director Seminario de Título

Comisión de Evaluación Seminario de Título

Dr. Marco Tulio Nuñez González
Presidente Comisión



Dr. Alvaro Glavic Maurer
Corrector

Santiago de Chile, Mayo 2008

Dedicatoria

Este seminario de título va dedicado a mis padres por su confianza en mi y a las personas que me enseñaron a trabajar, pensar y escribir en biología: Mauricio Báez, Pedro Hernández y Miguel Allende.

Agradecimientos

Agradezco primero a la familia: Mis padres Andrea y Francisco por su apoyo, a mis hermanas Elisa, Andreína y Carla que las quiero mucho, a mi sobrino Damián por la alegría, y también a Birgit, Martín y William. También agradezco mucho a Carla por quererme y existir. A la Amarí por su cariño. A la Dorothea por darme su amor y su caca para el jardín, a Godínez donde quiera que estés y a Oruro.

A mi jefe Miguel por la preocupación por su gente, comprensión y paciencia conmigo. A Mauricio y Pedro por aguantar mis condoros de aprendizaje y su entusiasmo por hacer las cosas siempre mejor. A todos los demás del lab y labs amigos (Undu, Leo, Rosario, Vivi, Carmen, Cata, Claudia, Pablo, Pelao, Javiera, Darko, Daniela, Andrés y Vivi, Floro, Juanito, Pato, Alvaro, Consuelo, Polo, Pablo Lois, Gisela, Claudio, Ricardo, Pame, Lorena) por comprender mi desadaptación social y ayudarme siempre con apoyo, hints científicos y reactivos.

Agradezco a todos los cabros amigos que también ayudaron a que pudiera estudiar por su compañía y apoyo en las buenas y malas y por comprender mi extrañeza: Shinto, Camilo, Richie, Saito, Rafita, Chino, Jacobo, Mono, Edgar, Negro Trobbiani, Ale, Víctor Hugo, Felipe, Simón, Muriel, Ramsi, Nico, Pía, Lucas y Alejo por la música. Julián, Saúl y Vero por las visiones. A la mamita, el papito, los niñitos y las escencias.

Finalmente quiero agradecer a mis compañer@s de curso por toda la ayuda y apoyo mutuo durante la licenciatura, sobretodo a Maca, Fernando, Matías, Rodrigo y Pilar. Por último a los muchachos de "la pitilla" por el campeonato obtenido



Índice de contenido



1. Introducción	1
2. Materiales y métodos	9
2.1 Materiales	9
2.2 Métodos	13
3. Resultados	24
Sección 1: Muerte celular inducida por cobre.	
3.1 Detección de vías de muerte de células ciliadas inducida por cobre mediante sondas fluorescentes.	24
3.2 Análisis de la ultraestructura de neuromastos tratados con cobre mediante microscopía electrónica de transmisión.	28
3.3 Caracterización de líneas transgénicas de pez cebra.	32
3.4 Efecto del cobre sobre las células de soporte.	34
3.5 Fragmentación del DNA detectada por TUNEL fluorescente en la muerte celular inducida por cobre en neuromastos.	35
3.6 Otoprotección con antioxidantes y producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en la toxicidad por cobre.	38
Sección 2: Regeneración celular en la línea lateral.	
3.7 Dinámica de la regeneración y recambio de las células ciliadas en neuromastos.	40
3.8 Proliferación celular en neuromastos y regeneración de células ciliadas.	43
3.9 Expresión del marcador de células troncales neurales Sox2 en la línea lateral del pez cebra.	45

3.10 Proliferación celular y expresión de Sox2 durante la regeneración en neuromastos.	48
4. Discusión y conclusiones	51
5. Bibliografía	60

Indice de figuras

Figura 1. Línea lateral en larvas de pez cebra y esquema de neuromastos.	24
Figura 2. Análisis morfológico de las células ciliadas con tinciones fluorescentes.	27
Figura 3. Ultraestructura de neuromastos (MET).	31
Figura 4. Caracterización de la expresión de GFP en neuromastos en las líneas transgénicas ET4 y ET20.	33
Figura 5. Inmunofluorescencia para la proteína ClaudinaB.	35
Figura 6. Detección de la fragmentación del DNA mediante TUNEL fluorescente.	37
Figura 7. Otoprotección con antioxidantes y producción de ROS.	39
Figura 8. Regeneración de células ciliadas.	42
Figura 9. Estimación del recambio de células ciliadas en los neuromastos.	42
Figura 10. Proliferación durante la regeneración de células ciliadas.	44
Figura 11. Expresión del mRNA de <i>sox2</i> mediante hibridación <i>in situ</i> y de la proteína Sox2 mediante inmunofluorescencia en la línea lateral del pez cebra.	47
Figura 12. Expresión de Sox2 y proliferación en los neuromastos luego de tratamientos con cobre.	50

Lista de abreviaturas

ANOVA	Analysis of variance (análisis de la varianza)
BrdU	Bromo-deoxi-uridina
CC	Célula ciliada
CM	Célula del manto
CS	Célula de soporte
H ₂ DCFDA	Diclorodihidrofluoresceína-diacetato
DCF	Diclorofluoresceína
DNA	Deoxi-ribonucleic acid (Ácido deoxiribonucleico)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMTU	Dimetiltiourea
Dpf	Días post fertilización
GFP	Green fluorescent protein (Proteína fluorescente verde)
GSH	Glutación reducido
Hpf	Horas post fertilización
Hpt	Horas post tratamiento
l-NAC	N-acetil l-cisteína
MET	Microscopía electrónica de transmisión
PBS	Buffer fosfato salino
PFA	Paraformaldehído
RNA	Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)
ROS	Reactive oxygen species (Especies reactivas del oxígeno)
TUNEL	Terminal transferase-mediated d-UDP-rodhamine nick-end-labeling (Marcaje de extremos libres con d-UDP-rodamina mediado por transferasa terminal)

Resumen

En el siguiente seminario de título se estudió la toxicidad producida por cobre disuelto y la regeneración celular en la línea lateral de larvas de pez cebra (*Danio rerio*). La línea lateral es un sistema mecanosensorial donde existen células ciliadas mecanotransductoras y células accesorias similares a las del oído de los mamíferos, pero que pueden regenerar luego de ser dañadas. En este contexto el estudio apunta a caracterizar en detalle un modelo útil y accesible para el estudio de la muerte y regeneración celular en sistemas sensoriales.

Se determinó mediante análisis morfológico utilizando tinciones fluorescentes y microscopía electrónica de transmisión, que el cobre disuelto en bajas concentraciones, que no afectan la sobrevivencia de las larvas, induce principalmente necrosis en las células ciliadas. El cobre produce daño sobre el DNA en los neuromastos (detectado por TUNEL) y un aumento del nivel de especies reactivas del oxígeno en las células ciliadas (detectado con diclorodihidrofluoresceína-diacetato). La muerte de las células ciliadas pudo ser parcialmente prevenida preincubando las larvas con compuestos antioxidantes.

Concentraciones de cobre que afectan las células accesorias de los neuromastos disminuyen la velocidad en que regeneran las células ciliadas. Utilizando una línea transgénica de pez cebra que expresa GFP en las células ciliadas se describió la dinámica de la regeneración y se demostró que luego del daño por cobre hay un aumento en la velocidad de generación de nuevas células ciliadas.

Existe proliferación celular sostenida en los neuromastos, la que aumenta al dañar las células accesorias con cobre. En dicho caso las células ciliadas regeneradas

proviene principalmente de células que han replicado su DNA, lo que fue detectado por incorporación del análogo de nucleótidos BrdU.

En los neuromastos existen células que expresan el marcador de células troncales neurales Sox2. La expresión de este marcador se restringe a las células accesorias y es en este dominio donde ocurre la proliferación que puede dar origen a nuevas células ciliadas.

Abstract

The present seminary is a study on toxicity produced by dissolved copper and cell regeneration occurring in the lateral line of zebrafish larvae (*Danio rerio*). The lateral line is a mechanosensory system containing hair cells responsible for mechanotransduction and accessory cells, similar to the mammalian ear, but they can be regenerated after damage. In this context, the aim of this study is to characterize in detail a useful and accessible model for studying cell death and regeneration in sensory systems.

Using fluorescent dyes and transmission electron microscopy to assess morphological analysis, it was determined that dissolved copper (in concentrations that do not affect fish survival) induces mainly necrosis in hair cells. Copper produces DNA damage in neuromasts (detected with TUNEL) and an increase in the levels of reactive oxygen species in hair cells (detected with dichlorodihydrofluorescein-diacetate). Hair cell death was partially prevented by pre-incubating larvae with antioxidant compounds. Copper concentrations that affect accessory cells diminish hair cell regeneration velocity. Regeneration dynamics were described using a zebrafish transgenic line

that shows GFP expression in hair cells, and an increase in hair cell generation velocity was demonstrated after copper-induced damage.

Sustained cell proliferation occurs in neuromasts, which is increased when accessory cells are affected by copper toxicity. In this case regenerated hair cells come mainly from cells that have replicated their DNA, detected using the nucleotide analog BrdU.

Cells that express the neural stem cell marker Sox2 can be found in neuromasts. It was revealed that expression of this marker is restricted to accessory cells, and in this domain takes place the proliferation that gives rise to new hair cells.

1. Introducción

Sección I: Muerte celular inducida por cobre en la línea lateral del pez cebra.

Se ha descrito que las células de los sistemas mecanosensoriales, como el que existe en el oído de vertebrados, pueden ser deterioradas por varios factores, entre ellos el ruido excesivo (Henderson *et al.*, 2006), la edad y agentes químicos en solución. Entre estos últimos encontramos antibióticos aminoglicósidos como la neomicina y gentamicina (Lowenheim *et al.*, 1999; Sha *et al.*, 1999), drogas antineoplásicas como la cisplatina (Cheng *et al.*, 2005) y metales pesados como el cobre (Hernández *et al.*, 2006; Linbo *et al.*, 2006).

El efecto de estos factores sobre las células de los órganos mecanosensores ha sido caracterizado en detalle en algunos modelos de vertebrados, observándose muerte principalmente en las células ciliadas mecanotransductoras, responsables de percibir los sonidos y algunos estímulos mecánicos del entorno.

Respecto de los posibles mecanismos implicados en la muerte de estas células, se reconoce que la apoptosis, un tipo de muerte celular programada, es el mecanismo común de muerte celular en los organismos superiores. Puede activarse por múltiples estímulos y suele asociarse a la actividad de distintos tipos de caspasas, proteasas que inician una cadena de eventos que llevan finalmente a la muerte y fragmentación de las células, mediante un proceso que favorece el reconocimiento y fagocitosis de los restos celulares. Rasgos centrales de la apoptosis son la degradación del material nuclear, exposición al medio de ciertos fosfolípidos, y ser un proceso muy controlado, donde se

conserva estable la membrana plasmática impidiendo que se libere el contenido celular en degradación, lo que de otro modo produce inflamación en la zona de muerte (Cummings *et al.*, 1997; Strasser *et al.*, 2000).

Otro mecanismo de muerte celular es la necrosis, donde el daño sobre las células provoca aumento del volumen, rompimiento de la membrana plasmática y liberación del contenido celular al medio (Schweichel *et al.*, 1973; Majno *et al.*, 1995) produciendo inflamación. Este proceso también culmina con la fagocitosis de los restos celulares y en algunos casos se observa degradación del material nuclear. Aunque clásicamente se ha mostrado que la necrosis es un proceso desordenado que no depende de un programa celular, estudios recientes muestran que podría tratarse de un proceso programado y con un orden particular (Boujrad *et al.*, 2007).

Estudios morfológicos y moleculares acerca de la muerte de células ciliadas expuestas a aminoglicósidos o cisplatina en varios modelos de vertebrados, describen activación de vías apoptóticas con actividad de caspasas (Cunningham *et al.*, 2002) y otros marcadores de muerte celular programada (Matsui *et al.*, 2004), muerte necrótica (Owens *et al.*, 2007), fragmentación del DNA, y producción de radicales libres (Sha *et al.*, 1999).

La neomicina, la cisplatina y el cobre dañan las células ciliadas de la línea lateral en peces, un sistema mecanosensorial similar al oído de los mamíferos, lo que ha sido estudiado en larvas de pez cebra (Harris *et al.*, 2003; Ton *et al.*, 2005; Hernández *et al.*, 2006; Linbo *et al.*, 2006). La línea lateral consiste en un arreglo regular de órganos llamados neuromastos, los que están expuestos directamente al ambiente y se desarrollan tempranamente en las larvas de peces (Dambly-Chaudiere *et al.*, 2003). En un neuromasto existen células ciliadas mecanosensoras rodeadas de células accesorias.

Estas células ciliadas comparten las características fisiológicas y moleculares con aquellas presentes en el oído de mamíferos (Balak *et al.*, 1990), sin embargo regeneran robustamente en los neuromastos y oído de vertebrados acuáticos (Harris *et al.*, 2003).

Los mecanismos que subyacen el efecto tóxico de estas drogas y del cobre sobre la línea lateral del pez cebra se encuentran en estudio, sin embargo se han descrito ciertos aspectos importantes del efecto de estos compuestos. Para la neomicina se ha mostrado que es capaz de penetrar en las células ciliadas y producir compactación nuclear (Santos *et al.*, 2006). Se ha mostrado también una respuesta mitocondrial temprana y la presencia de células apoptóticas y necróticas mediante microscopía electrónica (Owens *et al.*, 2007).

A pesar de ser un elemento traza esencial, el cobre puede dañar algunas células debido a la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) vía reacción de Fenton (Lloyd *et al.*, 1997), capaces de oxidar prácticamente cualquier molécula biológica y también provocar quiebres en el DNA (Brezova *et al.*, 2003). Esto ha sido investigado también en neuronas observándose la inducción tanto de apoptosis como necrosis (Levenson, 2005).

El cobre daña la línea lateral en concentraciones subletales que no afectan la estructura gruesa ni la fisiología de larvas de pez cebra si la exposición es corta. No se observó esta toxicidad con concentraciones equivalentes de otros iones metálicos (Hernández *et al.*, 2006). Para estudiar el efecto específico del cobre sobre la línea lateral se expusieron larvas a concentraciones desde un mínimo de 1 μM de sulfato de cobre (CuSO_4) durante un tiempo máximo de 2 horas. Este tratamiento elimina la totalidad de las células

ciliadas de la línea lateral. También se analizó el efecto de concentraciones más altas y la extensión del daño producido a los neuromastos. Este tipo de tratamiento con cobre brinda una forma rápida de dañar específicamente la línea lateral y permitiendo regeneración rápida de las células ciliadas.

1.1 Análisis morfológico de la muerte celular y degradación del DNA inducidas por cobre.

Para determinar posibles mecanismos de muerte se realizó un análisis morfológico de neuromastos expuestos a cobre mediante microscopía electrónica de transmisión (MET), inmunofluorescencia, líneas transgénicas y tinciones específicas para la línea lateral, observadas por microscopía confocal.

El criterio morfológico ha resultado útil para determinar mecanismos de muerte celular causado por ruido excesivo en el oído de mamíferos (Bohne *et al.*, 2007). Aunque este criterio no entrega información directa acerca de los eventos moleculares durante la muerte celular ha permitido distinguir vías de muerte en células ciliadas, esto debido a la morfología característica que se aprecia para las distintas vías que siguen las células al degenerar. Las células apoptóticas reducen su volumen y se fragmentan mientras que las células necróticas aumentan su volumen y se vuelven redondeadas.

La MET se ha utilizado ampliamente en el análisis de la muerte de células ciliadas, incluso para el efecto de la neomicina en el pez cebra (Murakami *et al.*, 2003; Owens *et al.*, 2007).

Se estudió también la degradación del DNA *in situ* en la muerte de células ciliadas inducida por cobre, utilizando líneas transgénicas de pez cebra que marcan con GFP

distintos tipos celulares en los neuromastos (Parinov *et al.*, 2004). Técnicas para detectar el DNA fragmentado han sido utilizadas extensamente en la literatura para caracterizar muerte celular inducida de múltiples formas incluyendo, la detección de daño causado por aminoglicósidos en la línea lateral del pez cebra (Williams *et al.*, 2000).

1.2 Otoprotección ante la toxicidad por cobre y producción de ROS.

En la línea lateral del pez cebra se ha observado el efecto de compuestos anti-apoptóticos que previenen la muerte de células ciliadas debida al recambio normal que ocurre en los neuromastos (Williams *et al.*, 2000; Cunningham *et al.*, 2002). También se ha demostrado que puede conseguirse protección ante la cisplatina aplicando compuestos antioxidantes sobre el medio de las larvas (Ton *et al.*, 2005). Estos últimos son capaces de reducir el efecto de especies reactivas del oxígeno o ROS que se generan en algunos tipos de toxicidad, ya sea por aplicación directa sobre las células o mediante aumento de los niveles normales por manipulación genética (Kawamoto *et al.*, 2004).

El cobre en su forma monovalente Cu (I) puede ingresar a las células a través de transportadores tipo Ctr1 (Kuo *et al.*, 2001) o puede generarse a partir del Cu(II) ingresado por transportadores del tipo DMT1, siendo reducido a Cu(I) por el glutatión intracelular en su forma reducida (GSH). Se ha demostrado que en condiciones normales la cantidad de cobre que existe en forma libre dentro de las células es extremadamente baja, alrededor de un átomo por célula (Rae *et al.*, 1999), lo que sugiere un exceso en la capacidad intracelular de quelar cobre dada por múltiples mecanismos.

El cobre es capaz de inducir toxicidad mediada por producción de ROS generadas por la reacción de Fenton: $\text{Cu(I)} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cu(II)} + \bullet\text{OH} + \text{OH}^-$ (Lloyd *et al.*, 1997). Se analizó la protección de las células ciliadas (otoprotección) ante el cobre, dada por la aplicación de compuestos antioxidantes (glutatión reducido (GSH), n-acetil l-cisteína (l-NAC) y dimetiltiourea (DMTU)) capaces de atenuar el efecto de las especies reactivas del oxígeno que pudieran generarse. Por otro lado se detectó su producción en las células ciliadas utilizando la sonda diclorodihidrofluoresceína-diacetato.

Sección II: Regeneración celular en la línea lateral.

La regeneración en la línea lateral de anfibios y peces puede inducirse utilizando distintas formas de daño (Balak *et al.*, 1990; Harris *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2006). A pesar de la aparente desaparición de la capacidad regenerativa en mamíferos, trabajos recientes han demostrado que la producción de nuevas células sensoriales sería una propiedad de las células de soporte del oído en ratón (White *et al.*, 2006), lo que ha activado el interés por estudiar la regeneración de células ciliadas en distintos modelos. En este contexto la línea lateral del pez cebra, gracias a su accesibilidad y la similitud que presentan sus células con las del oído de mamíferos, brinda un modelo experimental único para el estudio celular y molecular de la regeneración.

El tratamiento con cobre permite destruir la totalidad de las células ciliadas de la línea lateral en un tiempo corto, afectando de distinta forma las células accesorias de acuerdo a la concentración utilizada. Al retirar el metal del medio se obtiene una completa

regeneración funcional en los neuromastos. Esto indica que deben existir células progenitoras capaces de diferenciarse a células ciliadas y que no son afectadas por el tratamiento. Concentraciones más altas de cobre pueden retrasar e incluso abolir la regeneración (Hernández *et al.*, 2006).

Debido a que el daño se restringe a la línea lateral, se sugiere que estos progenitores residen en los neuromastos. Estos órganos se componen, además de las células ciliadas, de al menos dos tipos de células accesorias conocidas: células de soporte, que forman una capa interna que proyecta procesos apicales interdigitados con las células ciliadas; y células del manto, que conforman una capa plana que recubre las células ciliadas y forma un orificio central por el cual se proyectan los kinocilios (Figura 1.B). Ambos tipos celulares han sido implicados en la regeneración como posibles fuentes de las nuevas células ciliadas. Para este proceso se han propuesto mecanismos de transdiferenciación directa desde progenitores en oposición a proliferación seguida de etapas de diferenciación de precursores. Por otro lado no se ha determinado con exactitud la población celular que da origen a las células ciliadas regeneradas.

1.3 Estimación del recambio celular en los neuromastos.

En varios tejidos ocurre recambio celular debido a la destrucción de células por efecto del entorno o por procesos de muerte programada. En la línea lateral del pez cebra se ha descrito la presencia de grupos de células en proceso de muerte en la posición de las células ciliadas, y eventos mitóticos en la posición de las células de soporte en condiciones normales, sugiriendo un proceso de recambio constante de células ciliadas. La muerte celular en este caso sigue un mecanismo de apoptosis mediado por caspasas y

degradación del DNA (Williams *et al.*, 2000). En el presente estudio se analizaron las células en proceso de muerte y diferenciación utilizando tinciones específicas para las células ciliadas y una línea transgénica que expresa GFP en ellas. Se estimó la velocidad del recambio celular en los neuromastos durante el estadio larval en que posteriormente fue observada la regeneración para diferenciar la adición normal de células al neuromasto en desarrollo de la regeneración inducida luego de tratamientos con cobre.

1.4 Regeneración y proliferación celular en los neuromastos.

En este estudio se introduce el uso de líneas transgénicas que marcan con GFP las células ciliadas y las del manto. Las líneas transgénicas fueron generadas mediante la técnica de *enhancer trap* (Parinov *et al.*, 2004). El uso de estas líneas permitió seguir la ubicación de las células ciliadas y del manto al exponer las larvas a distintas concentraciones de cobre y durante la regeneración. Se realizó también un análisis de la proliferación celular en los para determinar su influencia en la regeneración de las células ciliadas.

1.5 Expresión del marcador de células troncales neurales Sox2 y su relación con la proliferación y regeneración celular.

La inducción de la muerte celular con neomicina y cobre produce un aumento de la proliferación en los neuromastos (Harris *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2006). Las células accesorias de los neuromastos son candidatas a dar origen a las nuevas células ciliadas, sin embargo se desconocen sus propiedades y si constituyen una población homogénea.

Estudios de nuestro laboratorio han mostrado en la línea lateral la presencia de células que expresan el marcador de células troncales neurales Sox2, un factor de transcripción expresado también en el oído interno de ratón, donde participa en el mantenimiento de células precursoras (Kiernan *et al.*, 2005).

Se determinó mediante hibridación *in situ* el patrón de expresión del mRNA de *sox2* en larvas de pez cebra. Mediante inmunofluorescencia se detectó la proteína Sox2 en distintos tipos celulares del neuromasto.

Para estudiar la posible participación de las células que expresan Sox2 en la formación de nuevas células ciliadas, se analizó la proliferación celular detectando simultáneamente Sox2 en condiciones normales y durante la regeneración. Se propone en esta tesis que la fuente permanente de nuevas células ciliadas en la línea lateral del pez cebra reside en células accesorias del neuromasto que expresan Sox2.

2. Materiales y Métodos

2.1 Materiales

2.1.1 Pez cebra.

Para los experimentos descritos en este trabajo se utilizaron embriones y larvas de pez cebra (*Danio rerio*), obtenidas realizando cruces naturales de peces adultos. Los peces se mantuvieron en acuarios con circulación constante de agua y aire a una temperatura de 28°C, con un ciclo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Se alimentaron tres veces al día y se monitorearon sus condiciones de temperatura y pH. Para realizar cruces, se

separaron los machos de las hembras durante la noche y se juntaron en la mañana siguiente en el momento en que la luz del vivero se enciende. De esta manera, es posible controlar el momento de la fertilización. El estadio de los embriones es expresado en horas post-fertilización (hpf) y días post fertilización (dpf). Durante el cruce, los peces se colocaron en estanques pequeños provistos de una rejilla para impedir que los peces se alimentaran de sus huevos. Las larvas se mantuvieron en incubadores a 28°C en medio E3 1X el cual contiene azul de metileno que funciona como funguicida, o medio E2 1x que solo contiene sales. Como anestésico se utilizó Tricaína 4% en ddH₂O aplicada al medio.

Las líneas transgénicas ET4 y ET20 fueron obtenidas de Vladimir Korzh (Parinov *et al.*, 2004).

2.1.2 Reactivos para inmunofluorescencia.

- Acetona (Merck, Alemania).
- Ácido clorhídrico (Merck, Alemania).
- Anticuerpo anti-BrdU (Dako MO744).
- Anticuerpo anti-ClaudinB (donado por Hernán López-Schier, Universidad de Rockefeller).
- Anticuerpo anti-GFP (Molecular Probes A11122).
- Anticuerpo anti-Sox2 (Chemicon AB5603).
- Alexa Fluor 488-conjugado anti-conejo IgG (Molecular Probes A21200).
- Alexa Fluor 594-conjugado anti-conejo IgG (Molecular Probes A21200).
- Alexa Fluor 594-conjugado anti-ratón IgG (Molecular Probes A21200).

- Cy5 AffiniPure anti-ratón IgG (Jackson Immunoresearch 115.175.146).
- Metanol (Merck, Alemania).
- Paraformaldehído (PFA) (J.T. Baker, Phillipsburg, USA).
- Proteinasa K (Merck, Alemania).
- Solución de bloqueo (10% suero de bovino, 1% DMSO, 0.3% Tween-20 en PBS, 0.5% tritón).

2.1.3 Reactivos para Hibridación *in situ*

- Anticuerpo Anti-Digoxigenina y NBT/BCIP (Nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4-chloro-3-indolphosphate) (Roche Diagnostics GMBH, Alemania).
- Formamida (Merck, Alemania).
- Solución MAB-T (100 mM ácido maleico, 150 mM NaCl, 0,1% tween, pH 7,5).
- Solución MAB+BMB+LS (2% reactivo de bloqueo Boehringer y 20% suero caprino en solución MAB).
- Metanol (Merck, Alemania).
- Peróxido de hidrógeno (Merck, Alemania).
- Proteinasa K (Merck, Alemania).
- PFA (J.T. Baker, Phillipsburg, USA).

2.1.4 Reactivos para cortes histológicos observables en MET.

- Cacodilato sódico (Merck, Alemania).
- Etanol, (Merck, Alemania).
- Glutaraldehído 4%. (J.T. Baker, Phillipsburg, USA).

- OsO₄, (Merck, Alemania).
- Resina epóxica Spurr's (Proscitech C035).

2.1.5 Reactivos para experimentos de otoprotección y detección de ROS.

- Glutación reducido (GSH) (Merck, alemania).
- N-acetil l-cisteína (l-NAC) (Merck, alemania).
- Dimetiltiourea (DMTU) (Merck, alemania).
- Diclorodihidrofluoresceína-diacetato (2',7'-diclorodihidrofluoresceína-diacetato) (H₂DCFDA) (Molecular probes D-399).

2.1.6 Soluciones de uso general.

- CuSO₄, (Merck, Alemania).
- DMSO (Winkler Ltda., Chile).
- PBS (Winkler Ltda, Chile).
- PBST (PBS+Tween-20 0.1%).
- Solución E3 1X (NaCl 5 mM; KCl 0.17 mM; CaCl₂ 0.13 mM; MgSO₄ 0.33 mM; Azul de Metileno 10⁻⁵ %, en ddH₂O).
- Solución E2 1X (1 mM MgSO₄; 120 μM KH₂PO₄; 74 μM Na₂HPO₄; 1 mM CaCl₂; 500 μM KCl; 15 mM NaCl; 500 μM NaHCO₃, en ddH₂O).
- Tricafna (3-etil ester ácido aminobenzoico, sal metasulfonato) (Sigma-Aldrich MS222).

2.1.7 Tinciones

- Bodipy TR C₅-ceramida (Molecular probes B34400).
- FM1-43 ([N-(3-trietilamonio)propil]-4-(4-[dibutilamino]piridino)dibromuro)
(Molecular probes T-35356).
- Sytogreen 24 (Molecular probes 57559).
- To-Pro-3 (Molecular probes T3605).

2.1.8 TUNEL

- DNAsa I (Fermentas EN0521).
- *In situ* cell death detection kit, TMR red (Roche 12.156.792.910).

2.2 Métodos

2.2.1 Análisis de datos, estadística y procesamiento de imágenes.

Los datos obtenidos en los experimentos de este trabajo fueron procesados inicialmente con Microsoft Excel 2004. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa SigmaStat 3.11, y los gráficos construidos con SigmaPlot 6. Las imágenes fueron procesadas con Adobe Photoshop CS.

2.2.2 Detección de la muerte celular inducida por cobre y análisis morfológico.

Larvas 76 horas post fertilización (hpf) de una línea silvestre y de la línea ET4 fueron expuestas a 0, 1, 10 o 50 μM de CuSO_4 disuelto en medio E3 1X. En larvas silvestres las células ciliadas de la línea lateral fueron previamente teñidas con bodipy TR para marcar membranas y sytogreen 24 para marcar el DNA nuclear como se describe en la sección de tinciones. Luego de una incubación de 5 o 10 minutos en Cobre a 28° C, las larvas fueron anestesiadas y transferidas a soluciones de concentración equivalente de E3 1X y cobre preparadas previamente con agarosa de bajo punto de fusión. Se montaron en un cubreobjetos y la fluorescencia fue observada en un microscopio confocal LSM META510, Carl Zeiss. Se tomaron fotografías de cortes de 2,4 μm cada 15 minutos para 1 μM de CuSO_4 y cada 3 minutos para 10 μM . Durante el proceso se verificó la temperatura (28° C) y la humedad de la solución con agarosa de bajo punto de fusión que mantiene a las larvas inmovilizadas.

2.2.3 Detección de la regeneración celular.

20 larvas 76 hpf de la línea ET4 fueron incubadas en placas petri con 0, 1 o 10 μM de CuSO_4 en medio E3 1X durante 2 horas. Luego fueron lavadas 3 veces en medio fresco y anestesiadas para contar el número de células ciliadas expresando GFP a las 0, 4, 8, 15, 28, 38, 55 y 77 horas post tratamiento (hpt). Se contaron las células en los neuromastos O y P1 (nomenclatura en Harris *et al.*, 2003) en un lado de cada larva y a partir de estos datos se calculó el promedio y desviación estándar para cada condición y tiempo.

2.2.4 Determinación del recambio celular.

15 larvas de la línea transgénica ET4 fueron crecidas en medio E2 1X hasta las 76 hpf. Luego fueron teñidas con FM1-43 como se describe en la sección tinciones, y se anestesiaron para contar el número de células teñidas o sólo expresando GFP, en los neuromastos O de la línea lateral anterior y P1 de la línea lateral posterior bajo un microscopio de fluorescencia modelo III, Carl Zeiss. Las larvas fueron lavadas y mantenidas por 24 horas a 28 °C, y entonces anestesiadas nuevamente para contar del mismo modo descrito. El mismo experimento se llevó a cabo con otro lote de 15 larvas ET4 teñiendo con FM1-43 desde las 99 hpf. Para estos datos se calculó el promedio y desviación estándar para cada condición. La adición de células con GFP que no han sido teñidas con FM1-43 es una estimación del número de células ciliadas nuevas desarrolladas durante 24 horas, mientras que la desaparición de las células que incorporaron la tinción es una estimación del el número de células ciliadas que mueren.

2.2.5 Ensayos de proliferación celular con Bromo-deoxi-uridina (BrdU).

15 larvas 76 hpf de la línea ET4 fueron incubadas en 0, 1 o 10 μ M de CuSO_4 durante 2 horas, lavadas 3 veces en medio E3 1X fresco e incubadas en 10 mM de BrdU y 1,5 % DMSO en E3 1X, durante un intervalo equivalente al tiempo de aparición de un promedio de 3 células ciliadas expresando GFP en los neuromastos O y P1. De acuerdo a los ensayos de regeneración, se determinó un tiempo de incubación en BrdU de 4 horas para 1 μ M de cobre y 24 horas para 10 μ M. Entonces se fijaron las larvas en PFA 4% durante la noche y se prepararon para inmunodetección de GFP (descrito en sección

de inmunofluorescencia) y posteriormente de BrdU. Para la inmunodetección del BrdU las larvas se digirieron en 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteinasa K por 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron en PBST y fueron fijadas en PFA 4% por 20 minutos. Luego de lavar con PBST se transfirieron a una solución 2 N de HCl en PBST por 1 hora a temperatura ambiente. Se volvió a lavar con PBST y se incubaron las larvas en solución de bloqueo por 30 minutos, entonces se incubaron con anticuerpo anti-BrdU, en solución de bloqueo por 4 horas a 4 °C. Posteriormente fueron lavadas 4 x 20 minutos en PBST e incubadas en anticuerpo Alexa-594 conjugado anti-ratón por toda la noche a 4° C. Se observaron y contaron células marcadas con BrdU o marcadas doblemente para BrdU y GFP para al menos 14 larvas en los neuromastos O y P1. Para estos datos se calculó el promedio y desviación estándar para cada condición y se sometió a un análisis estadístico (ANOVA de 1 vía). El conteo se realizó desde fotografías tomadas en un microscopio de fluorescencia modelo III, Carl Zeiss.

Para la detección simultánea de BrdU y la expresión de Sox2, 15 larvas 76 hpf de un cruce de las líneas ET4 y ET20 se trataron con CuSO_4 0, 1 o 10 μM durante 2 horas. Luego fueron lavadas 3 veces en medio E3 1X fresco e incubadas por 12 horas en 10 mM de Brdu y 1,5 % DMSO en E3 1X. Posteriormente fueron fijadas en PFA 4% y preparadas para la inmunodetección de Sox2 (descrito en sección inmunofluorescencia) y BrdU de la manera descrita previamente. Se contaron las células expresando GFP, Sox2 y marcadas con BrdU en alguno de los neuromastos en las posiciones P1, P2, o P3. Este conteo se realizó a partir de fotografías de cortes de los neuromastos de 2,4 μm

obtenidas en el microscopio confocal. Para los datos obtenidos se calculó el promedio y desviación estándar, y se sometió a un análisis estadístico (ANOVA de 1 vía).

2.2.6 Ensayos de otoprotección con antioxidantes.

Larvas 72 hpf de la línea ET4 fueron incubadas durante 4 horas en GSH 200 μ M, L-NAC 200 μ M y DMTU 400 μ M, disueltos en medio E3 1X. Se adicionó DMSO al 1% para facilitar la entrada de los compuestos. Un experimento preliminar mostró que el uso de DMSO en dicha concentración no produce diferencias en el número de células ciliadas en larvas sin tratar o tratadas con cobre. Luego las larvas fueron lavadas 3 veces en medio E3 1X e inmediatamente incubadas en 1 μ M de CuSO_4 durante 1 hora. Después del tratamiento, fueron lavadas 3 veces en medio E3 1X fresco y posteriormente fueron anestesiadas y montadas para contar el número de células ciliadas expresando GFP bajo el microscopio de fluorescencia en los neuromastos O y P1. Se compararon los datos con los de larvas sin tratar o tratadas con cobre, incubando en ambos casos con 1% DMSO por el mismo tiempo que en las larvas tratadas con antioxidantes. Para los datos obtenidos se calculó el promedio, desviación estándar y se realizó un análisis estadístico (ANOVA de 1 vía).

2.2.7 Ensayo de detección de ROS con diclorodihidrofluoresceína-diacetato (H_2DCFDA).

La detección de ROS fue realizada utilizando el compuesto permeable 2',7'-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (H_2DCFDA). Al entrar a las células es hidrolizado

a 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCF), pudiendo ser oxidado a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) el cual emite fluorescencia verde. La fluorescencia emitida por DCF es una medida directa del estado oxidativo intracelular.

Las células ciliadas de la línea lateral de larvas 72 hpf fueron teñidas con bodipy TR como se describe en tinciones. Luego fueron incubadas en medio E3 1X suplementado con 10 µM de H₂DCFDA por 1 hora y lavadas 3 veces con medio E3 1X. Se dejó un grupo de larvas sin tratar con cobre como control y el resto se incubó inmediatamente en 1 o 10 µM de CuSO₄ por 30 o 10 minutos respectivamente y luego se anestesiaron y montaron para observarlas en el microscopio de fluorescencia. Se obtuvieron fotografías representativas por los canales rojo (bodipy) y verde (DCF).

2.2.8 Hibridación *in situ*.

La sonda de RNA se preparó a partir de cDNA del gen *sox2* que fue comprado a la empresa Open Biosystems (Huntsville, AL). El clon con este gen posee el número de acceso a Genbank BC065656. El plasmidio fue digerido con la enzima KpnI y luego se realizó una extracción fenólica para eliminar las proteínas contaminantes. A continuación se procedió a la transcripción *in vitro* de la sonda de RNA marcada con digoxigenina a partir de aproximadamente 1,5 µg de DNA linearizado, 10 µL de NTP mix-digoxigenina, 5µL de tampón de transcripción 10x, 1 µL de RNAsin y 90 unidades de la RNA polimerasa T7. Esta mezcla se incubó durante dos horas a 37°C. Luego se agregaron 5 µL de DNAsaI 10 mg/mL durante 5 minutos y se incubó a 37°C para degradar el resto de DNA que quedó sin transcribir. Se detuvo la reacción agregando 5

μl de EDTA 0,2 M y se precipitó el RNA con 2 μL de LiCl 10 M y 200 μL de etanol absoluto durante toda la noche. A continuación se recuperó el RNA centrifugando a 14000 g durante 30 minutos, se eliminó el sobrenadante, se lavó el precipitado con etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente. La sonda recién sintetizada se analizó en un gel de agarosa al 1% para verificar la presencia del RNA. El precipitado de RNA se resuspendió en 1 mL de tampón de hibridación *in situ*.

Para la hibridación, se fijaron los embriones y larvas en PFA al 4% (en PBS) a 4°C durante toda la noche. Posteriormente se deshidrataron en metanol 100% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizó un cambio de metanol 100% y los embriones se incubaron a -20°C durante al menos 1 hora. Luego se rehidrataron durante 5 minutos en gradiente de metanol/PBST. Con el objetivo de eliminar los pigmentos se realizó el blanqueo de los embriones de más de 48 hpf con una solución que contiene 5,95 ml de agua destilada, 0,25 ml de SSC 20x, 0,5 ml de formamida y 3,3 ml de peróxido de hidrógeno al 30%. Los embriones se incubaron en esta solución 10 minutos expuestos a un tubo fluorescente de luz, la cual permite una reacción de oxidación de los pigmentos por parte de el peróxido de hidrógeno. Luego se realizaron tres lavados con PBST durante 5 minutos cada uno.

Se permeabilizó durante 10 minutos a temperatura ambiente con 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteinasa K en agua destilada. Para los embriones de 72 hpf se incubó con proteinasa K durante 40 minutos. Luego se volvió a fijar durante 20 minutos a temperatura ambiente en PFA 4% en PBS y luego se lavaron 5 veces durante 5 minutos cada una en PBST. A continuación los embriones se incubaron con tampón de hibridación a 65°C durante 10 minutos y

luego se incubó toda la noche a 60°C con la ribosonda-DIG disuelta en tampón de hibridación, previamente denaturada durante 5 minutos a 60°C.

Para el lavado de las sondas todas las soluciones se precalentaron a 65°C y luego se incubaron los embriones 10 minutos en formamida/SSC 2x al 75%, luego durante 10 minutos en formamida/SSC 2x al 50% y 10 minutos en formamida/SSC 2x al 25%, 10 minutos en SSC 2x y finalmente 2 veces durante 30 minutos en SSC 0,2x. Con el objetivo de bloquear los sitios inespecíficos, los embriones se incubaron durante 5 minutos en MAB-T, por 1 hora en MAB+BMB+LS a temperatura ambiente y luego de un recambio de la solución se dejaron toda la noche a 4°C. En forma independiente, el anticuerpo anti-digoxigenina (dilución 1:200) debe incubarse a 4°C mientras los embriones se están bloqueando a 4°C, para luego incubar los embriones durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti-digoxigenina. El lavado del anticuerpo se realizó 5 veces durante 20 minutos cada una con MAB-T y 3 veces durante 5 minutos cada una en tampón AP. Finalmente, la tinción de los embriones se realizó con el sustrato de la fosfatasa alcalina NBT/BCIP BM *Purple AP Substrate* en oscuridad y durante el tiempo necesario para que apareciera la tonalidad púrpura esperada en la zona de expresión del mRNA. Finalmente, se lavaron los embriones 3 veces durante 5 minutos en PBST.

2.2.9 Inmunofluorescencia.

Las larvas se fijaron incubándolas en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS durante 40 minutos a temperatura ambiente o durante toda una noche a 4° C. Luego se lavaron con PBST dos veces por 5 minutos, se traspasaron a metanol y se mantuvieron a -20°C durante 1 hora. Entonces fueron rehidratadas en gradiente de metanol en PBST. En este

punto, sólo para la inmunodetección de Sox2, se digirieron las larvas con 10 µg/ml de proteinasa K en agua destilada por 20 minutos, y se fijaron nuevamente en PFA 4% por 20 minutos. Luego se incubaron en agua destilada por 1 hora, para luego incubarse en acetona por 7 minutos a -20°C. Posteriormente se lavaron nuevamente con agua destilada por 5 minutos, se lavaron en PBST 5 minutos y se incubaron con solución de bloqueo por media hora. Luego se incubó con el anticuerpo primario correspondiente diluido en solución de bloqueo, a 4°C durante toda la noche (diluciones: Anti-BrdU 1:100, anti-ClaudinB 1:500, anti-GFP 1:500, anti-Sox2 1:100, anti-Tubulina Acetilada 1:1000). Al día siguiente se lavó con PBST 4 veces por 20 minutos y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente en dilución 1:200 (Cy5 AffiniPure anti-ratón IgG, Alexa 488 o 594 conjugado anti-ratón o anti-conejo IgG). Luego se lavaron 4 veces por 20 minutos en PBST. Las larvas fueron montadas en cubreobjetos para su observación en los microscopios.

2.2.10 Microscopía electrónica de transmisión.

Larvas silvestres 76 hpf fueron expuestas a 0 o 1 µM de CuSO₄ durante 2 horas, luego lavadas 3 veces en medio E3 1X fresco y fijadas en glutaraldehído 4% en 0,1 M de cacodilato sódico pH 7,4 y 0,001% CaCl₂ durante la noche a 4° C. Luego se transfirieron a fijador fresco por otra noche a 4° C. Se lavó en 0,1 M de buffer cacodilato y se fijaron con 1% OsO₄ en 0,1 M cacodilato y 0,001% CaCl₂ por una hora en hielo. Fueron lavadas nuevamente en cacodilato y deshidratadas en etanol graduado (1:25, 1:50, 1:75, en ddH₂O) infiltradas y embebidas en resina epóxica Spurr's vía óxido de propileno.

Se obtuvieron secciones semifinas (2 μm) de las colas de las larvas para observar alguno de los neuromastos en las posiciones P7, P8 o P9 (Harris *et al.*, 2003). Secciones ultrafinas (90 nm) fueron obtenidas usando un ultramicrotomo y contrastadas con acetato de uranilo. Luego fueron montadas en grillas y observadas en un microscopio electrónico de transmisión marca Zeiss modelo EM-109.

La magnificación baja (3000X) se utilizó para obtener vistas panorámica del neuromasto completo. La magnificación alta (12000X) se usó para observar detalles ultraestructurales de las células ciliadas y accesorias.

2.2.11 Tinciones.

Los siguientes protocolos de tinción para células ciliadas se realizaron a 28° C en medio E3 1X o en medio E2 1X. Se utilizó To-pro-3 en PBST para teñir los núcleos celulares de larvas fijadas.

- FM1-43. 3 μM por 30 segundos.
- Bodipy TR. 500 μM por 1 hora.
- Sytogreen 24. 3 μM por 1 hora.
- To-Pro-3. 10 μM por 5 minutos.

2.2.12 TUNEL.

Larvas 76 hpf de la línea ET4 y de un cruce de las líneas ET4 y ET20 fueron incubadas en 0, 1 o 10 μM de CuSO_4 por los tiempos detallados en los resultados, luego lavadas con medio E3 1X fresco y fijadas en PFA 4% durante la noche a 4° C. Luego se

incubaron en metanol por 1 hora y se rehidrataron en gradiente. Posteriormente fueron procesadas para marcaje mediante la técnica de TUNEL utilizando el kit *In situ* cell death detection TMR red, Roche. Se permeabilizaron las larvas digiriendo con proteinasa K por 30 minutos, se fijaron en PFA 4% por 20 minutos y luego se siguieron las instrucciones del fabricante. Como control negativo se realizó el marcaje de larvas sin uno de los componentes del kit no obteniéndose marca alguna. Como control positivo se trataron larvas con DNAsa I en buffer para esta enzima, por 20 minutos posterior a la permeabilización, y luego se procesaron normalmente obteniéndose marca en muchos núcleos a lo largo del cuerpo de la larva. Se observó la fluorescencia en el microscopio y se contaron los núcleos marcados por TUNEL en la posición de las células ciliadas y del manto para 25 neuromastos en alguna de las posiciones O, OC, D, P1, P2, y P3 (Harris *et al.*, 2003). Luego se calculó el promedio y desviación estándar de estos datos y se realizó un análisis estadístico (ANOVA de 1 vía).

3. Resultados

Sección 1: Muerte celular inducida por cobre en los neuromastos.

3.1 Detección de vías de muerte de células ciliadas inducida por cobre mediante sondas fluorescentes.

La línea lateral del pez cebra es un sistema mecanosensorial conformado por órganos llamados neuromastos. La organización estereotípica de los neuromastos en la línea lateral anterior que rodea la cabeza, y la línea posterior en la línea media de cuerpo, se ilustra en la Figura 1.A. La Figura 1.B muestra un esquema de un corte transversal de un neuromasto e indica los tipos celulares descritos hasta ahora. Cada neuromasto contiene un promedio de 8 células ciliadas a las 72 hpf, las que revelan una organización en racimo, lo que se muestra en la Figura 2.A en un neuromasto de una larva de línea transgénica ET4.

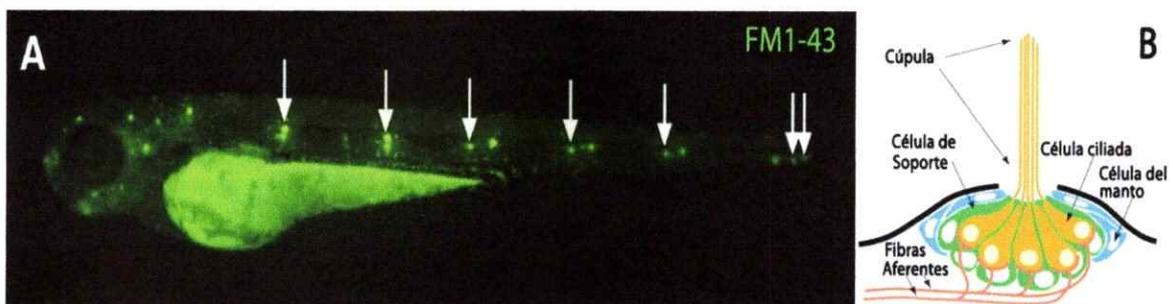


Figura 1. Línea lateral en larvas de pez cebra y esquema de neuromastos. (A) Organización estereotípica de los neuromastos de la línea lateral primaria en una larva de 72 hpf en la que se tiñeron las células ciliadas con FM1-43. La línea lateral anterior corresponde a los neuromastos ubicados en la cabeza, mientras que la línea lateral posterior corresponde a aquellos distribuidos a lo largo del cuerpo de la larva (flechas). (B) Esquema de un neuromasto. Se indican los tipos celulares que se conocen.

Se caracterizó la morfología de las células ciliadas en proceso de muerte por exposición a 1 o 10 μM de CuSO_4 utilizando dos tinciones fluorescentes en conjunto como marcadores estructurales de membranas y núcleos, observados por microscopía confocal. Bodipy TR C₅-ceramida es una molécula fluorescente roja capaz de unirse a las membranas celulares y se ha utilizado como marcador estructural en el pez cebra (Shimizu *et al.*, 2005). La Figura 2.A muestra la colocalización de bodipy TR con las células que expresan GFP en un neuromasto de una larva de la línea transgénica ET4 a las 72 hpf, obteniéndose marca de la membrana plasmática en el cuerpo y base de los cilios de las células ciliadas. Como se muestra mas adelante, existe colocalización entre el GFP de la línea ET4 y Tubulina Acetilada, un marcador de células ciliadas, detectado por inmunofluorescencia.

El marcador de ácidos nucleicos específico para DNA sytogreen 24 es una molécula fluorescente verde de la familia de las cianinas que puede utilizarse como marcador vital de células ciliadas (<http://depts.washington.edu/rubelab/>). En larvas silvestres a las 72 hpf marca específicamente las células ciliadas teñidas con bodipy TR. Otras tinciones nucleares se usan frecuentemente en los neuromastos para marcar células ciliadas *in vivo*, por ejemplo to-pro3 y yo-pro1 (Santos *et al.*, 2006), sin observarse efectos tóxicos al menos en 24 horas posteriores a la tinción.

Para descartar toxicidad a corto plazo de estas tinciones sobre las células ciliadas, se realizó el protocolo de tinción, se observó de inmediato y también luego de 15 horas, sin observarse cambios en la morfología que pudieran denotar efectos tóxicos.

Para 1 μM de cobre se obtuvieron imágenes representativas del proceso de muerte (Figura 2.C), mientras que para 10 μM se obtuvo una secuencia fotográfica del proceso de muerte completo en un neuromasto (Figura 2.B).

Con 10 μM de CuSO_4 se observan cambios morfológicos desde los 5 minutos de tratamiento. El material nuclear se compacta en la mayoría de las células y en algunas se fragmenta. La marca en las membranas muestra que todas las células observadas aumentan su volumen y se vuelven redondeadas, de manera similar a lo que se ha observado en células ciliadas necróticas en oído de chinchilla (Bohne *et al.*, 2007). Aparecen también algunas protuberancias en la membrana plasmática. De acuerdo a este criterio 10 μM de CuSO_4 produce principalmente necrosis en las células ciliadas.

Con 1 μM de CuSO_4 aparecen distintas morfologías en las células ciliadas. Se observan células necróticas con las mismas características que con la concentración más alta. Algunas células reducen su volumen y se compacta el material nuclear, indicando que siguen vías de muerte diferentes de la necrosis. La Figura 2.C muestra las distintas morfologías en las células ciliadas en proceso de muerte. Algunas de ellas se separan notablemente del racimo de células al que pertenecían y se fragmentan (Figura 2.C).

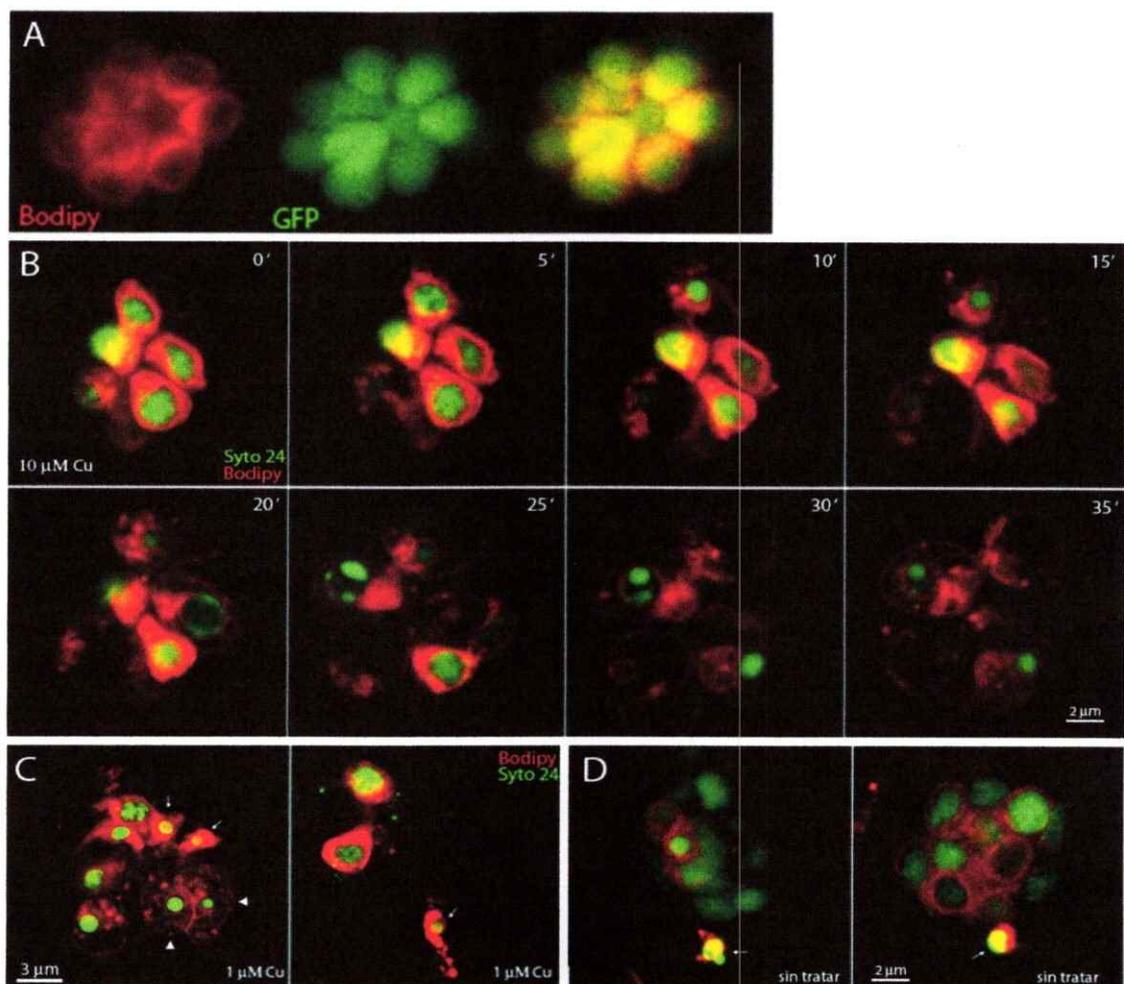


Figura 2. Análisis morfológico de las células ciliadas con tinciones fluorescentes. (A) Colocalización de Bodipy TR con GFP en las células ciliadas de la línea ET4. Puede apreciarse la conformación en racimo de las células ciliadas. (B) Secuencia de la muerte de células ciliadas en un neuromasto con 10 μM de cobre. Se aprecia aumento del volumen celular y compactación del material nuclear. (C) Células ciliadas de un neuromasto expuestas a 1 μM de cobre. Se observan células necróticas (cuadro izquierda, cabezas de flecha) y otras que reducen su volumen con compactación nuclear (cuadro izquierda, flechas). Algunas células ciliadas se desprenden del racimo al cual pertenecían, se reduce su volumen y se fragmentan (cuadro derecha, flecha). (D) Células ciliadas en proceso de muerte por apoptosis en el recambio normal. Se reduce el volumen celular y nuclear, se aprecia fragmentación (flechas).

Este método también permitió observar células ciliadas en proceso de muerte debido al recambio normal en los neuromastos, en el cual las células siguen apoptosis mediada por caspasas (Williams *et al.*, 2000). En este caso se realizó la tinción doble y se observaron las larvas inmediatamente, pudiendo identificarse ocasionalmente células ciliadas

muriendo. Éstas aparecen con un volumen muy reducido, núcleo compactado, y puede apreciarse fragmentación celular (Figura 2.D), al igual que en algunas células expuestas a 1 μ M de cobre.

3.2 Análisis de la ultraestructura de neuromastos tratados con cobre mediante microscopía electrónica de transmisión.

La microscopía electrónica tanto de barrido (MEB) como de transmisión (MET) han sido utilizadas en varios trabajos para investigar la ultraestructura de los neuromastos de larvas de pez cebra (Williams *et al.*, 2000; Murakami *et al.*, 2003; Owens *et al.*, 2007). Estas técnicas han permitido dilucidar la estructura del neuromasto en detalle, diferenciando los tipos celulares presentes de acuerdo a sus particularidades morfológicas. En este trabajo utilizamos MET para estudiar la ultraestructura de neuromastos en desarrollo a las 72 hpf y los cambios que ocurren al exponerlos a cobre en solución. Se establecieron las características basales de la ultraestructura en la línea lateral para utilizarlas como referencia al comparar con lo que se observa luego de la exposición al cobre.

La Figura 3.A muestra un corte transversal de un neuromasto de la cola obtenido mediante MET. Se observan las células ciliadas (CC) con forma de botella ubicadas al centro del neuromasto y rodeadas periféricamente las células del manto (CM). Las células de soporte (CS) se ubican en una capa bajo las células ciliadas. Su citoplasma se proyecta apicalmente interdigitando las CCs. El lado proximal del neuromasto presenta

una membrana basal (MB) a través de la cual pasan fibras nerviosas que contactan a las CCs en su base.

Las CCs presentan un citoplasma relativamente denso y granuloso con abundantes vacuolas y mitocondrias. Estas presentan forma tubular en muchos casos, aunque muchas parecen tener menor tamaño, lo que puede deberse a que sean ramas y terminaciones de mitocondrias que se aprecian así debido a la posición del corte, o una población de mitocondrias de menor tamaño (Figura 3.B).

Las estructuras nucleares (N) (Figura 3.C) son prominentes en todos los tipos celulares, presentando cromatina densa en la periferia y un contenido con regiones interiores de densidad heterogénea. En las CCs el núcleo se ubica en la base y el citoplasma se extiende apicalmente. Pueden apreciarse microvellosidades, estereocilios con zonas electrón-densas en su base, y un kinocilio apical (Figura 3.D).

Para analizar los cambios ultraestructurales que ocurren en el neuromasto debido a la exposición a cobre se trataron larvas 72 hpf con 1 μ M de CuSO_4 durante 2 horas y luego se procesaron para realizar cortes y observar por MET. Se utilizó esta concentración de cobre puesto que produce varias vías de muerte, dando un panorama general de lo que ocurre en este tipo de toxicidad. En la Figura 3.E se muestra un corte transversal de un neuromasto tratado con cobre. Se observa la aparición de 3 estructuras que corresponden a células muertas y también restos celulares. Las células muertas han perdido las características y posición de CCs, pero como se mostrará mas adelante, esta concentración de cobre no afecta las células accesorias, por lo que se trata de CCs muertas.

La Figura 3.F muestra una estructura que conserva en parte la morfología de una CC ubicada entre dos células de soporte de apariencia normal. El citoplasma aparece pálido con regiones internas de alta densidad electrónica y se aprecian algunas vacuolas. Se observa una gran estructura membranosa hacia la base de la célula, lo que evidencia daño sobre las membranas. Adyacente a ésta célula hay restos celulares en los que se aprecian mitocondrias dañadas que aparecen hinchadas, algo que ha sido descrito en el efecto tóxico de la neomicina (Owens *et al.*, 2007).

En la Figura 3.G se muestra un acercamiento a una célula muerta con abundantes vacuolas y múltiples zonas electrón-densas a lo largo de lo que queda del citoplasma. Aparecen restos de estructuras de membranas y se aprecian también los restos de mitocondrias que aparecen hinchadas. Esta estructura muestra una forma relativamente redondeada y con el volumen aumentado, característico de una célula necrótica.

Finalmente en la Figura 3.H se muestra un acercamiento a los restos de cilios de células ciliadas. Pueden verse aun varios estereocilios, vacuolas y mitocondrias en la cercanía de los cilios. Esta conservación de las estructuras ciliares también ha sido descrita en la toxicidad por neomicina (Murakami *et al.*, 2003).

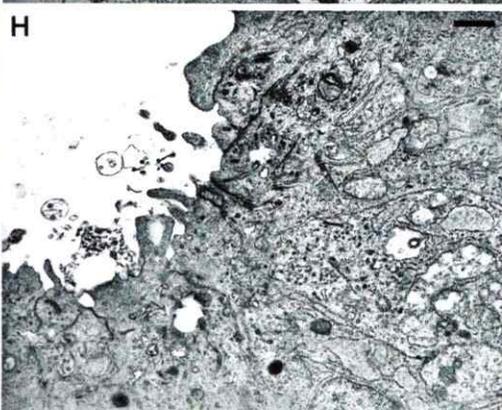
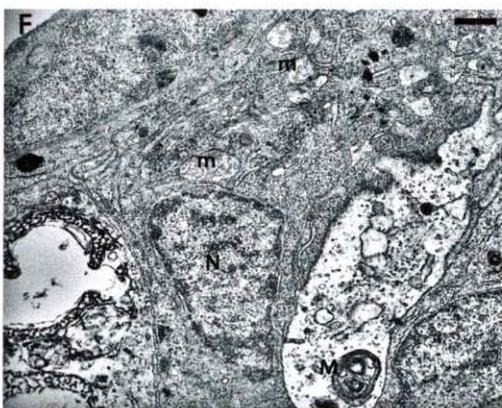
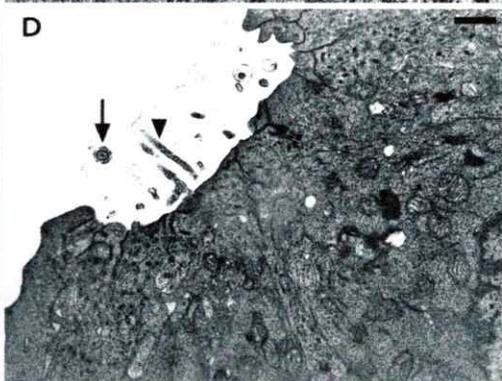
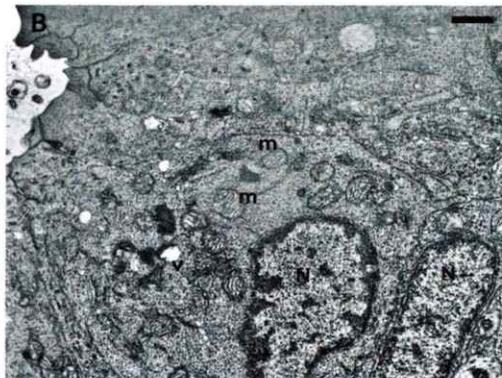
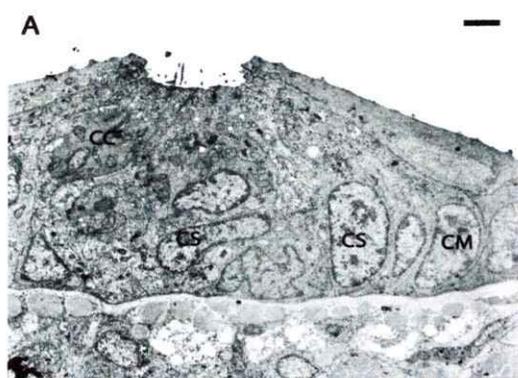


Figura 3. Ultraestructura de neuromastos (MET). (A) Corte transversal de un neuromasto (3000X). Se aprecian las células ciliadas (CC) al centro, células de soporte hacia la base (CS), células del manto (CM) y la membrana basal que limita al neuromasto. (B-D) Acercamientos a sectores de (A) (12000X). (B) Se observan las células ciliadas, se aprecian abundantes mitocondrias (m), los núcleos celulares (N) y vacuolas (v). (C) Acercamiento a los núcleos (N) de las células de soporte. (D) Acercamiento a los cilios. Se aprecian estereocilios (cabeza de flecha) y un corte transversal de un kinocilio (flecha). (E) Corte transversal de un neuromasto tratado con 1 μ M de cobre (3000X). Se aprecian células ciliadas (flechas) muertas además de células de soporte (CS) no dañadas. (F-H) Acercamientos a sectores de (E) (12000X). (F) Célula ciliada muerta. Se aprecian acumulaciones de membranas (M) y mitocondrias hinchadas en los restos adyacentes (m). (G) Acercamiento a una célula muerta que presenta múltiples vacuolas (v) y aumentó su volumen, probablemente necrótica. También se aprecian en su interior mitocondrias dañadas (m). (H) Acercamiento a los restos de los cilios. Estas estructuras se conservan en parte a pesar de la exposición a cobre. Barras: A, E = 2 μ m; B-D y F-G = 0,5 μ m.

3.3 Caracterización de líneas transgénicas de pez cebra.

Para estudiar la dinámica de la muerte y regeneración celular en la línea lateral del pez cebra, se tomó ventaja de líneas transgénicas disponibles (Parinov *et al.*, 2004). Dos de estas líneas resultaron útiles para este estudio. La línea ET4 expresa GFP en las células ciliadas, hecho confirmado mediante doble marcaje con anticuerpos para GFP y Tubulina Acetilada, un marcador conocido que se expresa en la base de los kinocilios en estas células. Se observó colocación de ambos marcadores en neuromastos de larvas 72 hpf (Figura 4.A). Como un segundo criterio para determinar la especificidad de la expresión de GFP se había utilizado el marcador vital FM1-43 (no mostrado), específico para células ciliadas funcionales (Seiler *et al.*, 1999) (mecanotransducción activa). FM1-43 colocaliza con varias células GFP-positivas de la línea ET4 en larvas 72 hpf. Algunas células ciliadas no incorporan la tinción vital (Hernández *et al.*, 2007), sugiriendo que la marca GFP aparece en las células ciliadas en un momento previo a su diferenciación terminal, cuando aún no son funcionales.

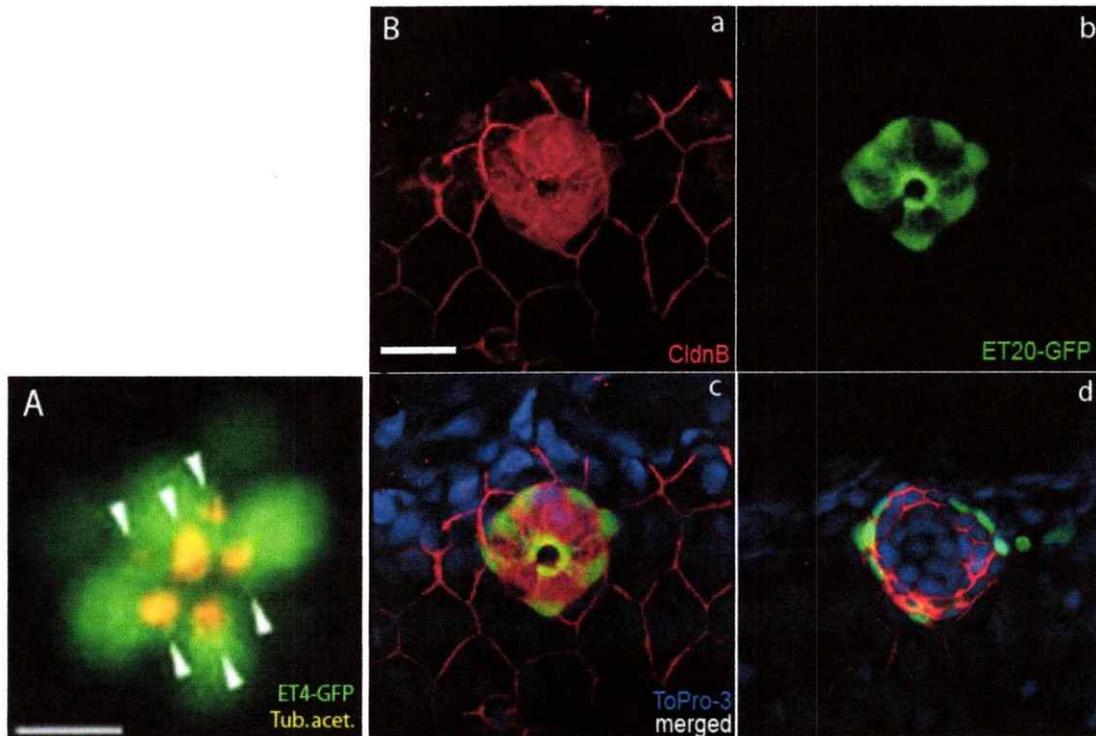


Figura 4. Caracterización de la expresión de GFP en neuromastos en las líneas transgénicas ET4 y ET20. (A) Colocalización de GFP de la línea ET4 (cuerpo de las células ciliadas) y la inmunofluorescencia para Tubulina Acetilada (base de los kinocilios, cabezas de flecha) Barra = 4 μ m. (B, a-d) Expresión de GFP en la línea ET20 e Inmunofluorescencia para ClaudinaB. Se aprecia colocalización en las células del manto (c), pero no en las células de soporte (d). Barra = 15 μ m.

La línea ET20 restringe la expresión de GFP en los neuromastos a las células del manto, una sub-población de células accesorias presentes en neuromastos de peces y anfibios (Ghysen *et al.*, 2004). Las células accesorias pueden marcarse en su totalidad con el anticuerpo para la proteína ClaudinaB (López-Schier *et al.*, 2004). Esta proteína pertenece a la familia de las Claudinas, proteínas mayores de las uniones estrechas celulares (tight-junctions). Pertenecen a la superfamilia de las tetraspaninas, proteínas que median la adhesión y migración celular. Se utilizó el anticuerpo para ClaudinaB en conjunto con uno para GFP en la línea ET20 observándose colocalización (Figura

4.B.c). Las células que no expresan GFP pero son ClaudinaB-positivas corresponden a células de soporte (Figura 4.B.d).

Ambas líneas transgénicas mantienen la expresión de GFP hasta el estado adulto, por lo que resulta útil como marcador vital de éstos tipos celulares en cualquier etapa del desarrollo del pez.

3.4 Efecto del cobre sobre las células de soporte.

La toxicidad por cobre sobre las células accesorias de los neuromastos fue caracterizada utilizando inmunofluorescencia contra la proteína ClaudinaB, utilizada como marcador estructural y observada mediante microscopía confocal. La Figura 5.A-D muestra fotografías de cortes en microscopio confocal correspondientes a la capa de células de soporte para cada concentración de cobre analizada. Con 1 μM de cobre no hay cambios en la estructura de las células accesorias en comparación al control sin tratar, mientras que 10 μM provoca un daño parcial. Con 50 μM de cobre se observan cambios severos en la estructura. Aparece debris celular y células hinchadas, la estructura normal de las células accesorias desaparece. Otros resultados del laboratorio muestran que con 50 μM de cobre se pierde la capacidad regenerativa en los neuromastos (Hernández *et al.*, 2006), lo que podría deberse a la destrucción de la población de células precursoras contenidas en las células accesorias.

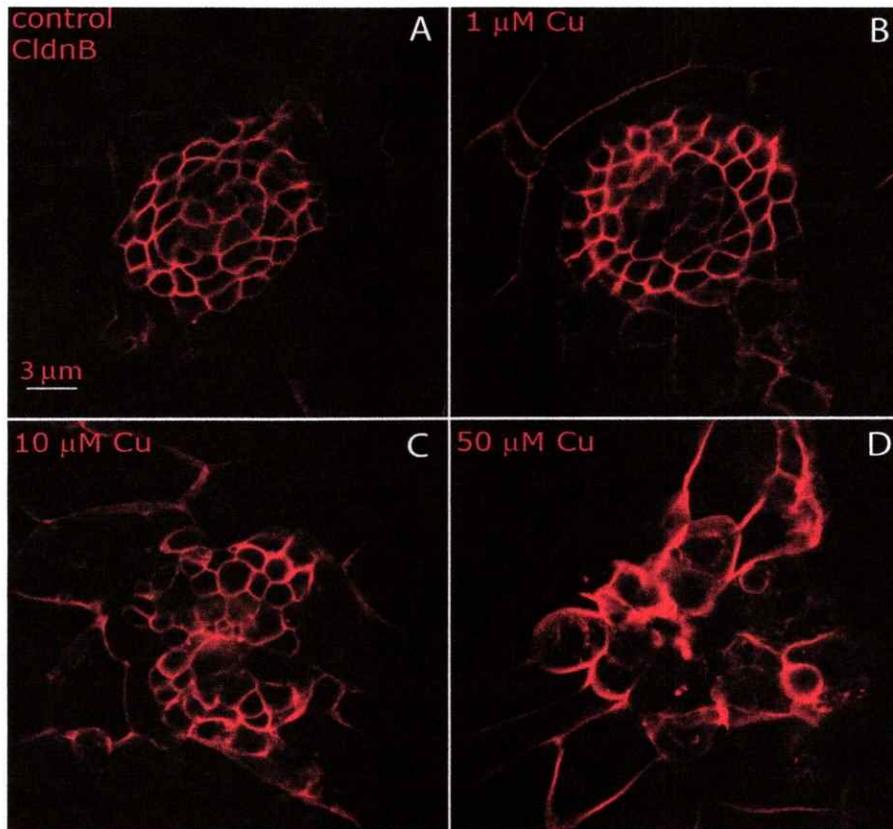


Figura 5. Inmunofluorescencia para la proteína ClaudinaB. Corte en microscopía confocal de la capa de células de soporte de un neuromasto tratado con 0 (A), 1 (B), 10 (C) o 50 (D) μM de cobre. Se aprecian cambios en la morfología de las células de soporte desde 10 μM de cobre. Con 50 μM se pierde completamente la morfología original, mientras que 10 μM produce un daño parcial.

3.5 Fragmentación del DNA detectada por TUNEL fluorescente en la muerte celular inducida por cobre en neuromastos.

La técnica de TUNEL (Terminal transferase-mediated d-UDP-rodhamine nick-end-labeling) se ha utilizado extensamente para determinar presencia de células apoptóticas en tejidos normales y patológicos. Esta técnica permite identificar quiebres en el DNA mediante marcaje enzimático de los extremos libres con una sonda fluorescente, en este caso d-UDP-rodamina. Aunque la fragmentación del DNA detectada por TUNEL es un evento clave en la apoptosis (Kressel *et al.*, 1994), no es absolutamente específica para

esta vía de muerte, ya que fragmentos nucleares de células necróticas y autolíticas también pueden ser TUNEL-positivas (Ben-Sasson *et al.*, 1995; Nishizaki *et al.*, 1999).

En este estudio se analizó si existe fragmentación del DNA durante la muerte de células ciliadas en la línea lateral del pez cebra expuestas a 1 o 10 μM de CuSO_4 . Para esto se realizaron 2 experimentos. Primero se utilizó la línea transgénica ET4 para encontrar especificidad de la marca de TUNEL sobre células ciliadas marcadas con GFP expuestas a 1 μM de cobre. En segundo lugar se utilizó un cruce entre las líneas ET4 y ET20 para determinar y cuantificar el número de células marcadas por TUNEL en los neuromastos expuestos a 1 o 10 μM de cobre, y la extensión de la marca a las células del manto.

Las observaciones realizadas muestran que pueden encontrarse células ciliadas con DNA fragmentado y aún expresando GFP al exponer a 1 μM de cobre tanto a los 40 como a los 90 minutos de tratamiento (Figura 6.A-C).

En otro experimento, larvas 72 hpf de un cruce de las líneas ET4 y ET20 fueron tratadas con 0, 1 o 10 μM de cobre, por 60 minutos para 1 μM y 15 minutos para 10 μM . En estos tiempos de tratamiento en que han desaparecido la mitad de las células ciliadas GFP-positivas en la línea ET4 (resultado no mostrado). La Figura 6.D-F muestra que luego del tratamiento con 1 μM de cobre aparecen núcleos TUNEL-positivos en la posición de las célula ciliadas y rara vez en la posición de las células del manto. Con 10 μM aparecen significativamente más núcleos marcados en la posición de las células ciliadas y del manto (ANOVA de 1 vía, $p < 0,01$) (Figura 6.G). Esta observación confirma que 10 μM de cobre produce más fragmentación del DNA en las células ciliadas y extiende el daño a las células accesorias de los neuromastos, lo que como se

mostrará más adelante, resulta relevante en el estudio de la regeneración celular en este sistema sensorial.

Para los dos tipos de experimento realizados se observó que en neuromastos de larvas sin tratar con cobre, pueden encontrarse células en proceso de muerte, principalmente en la posición de las células ciliadas como se encuentra descrito en la literatura (Williams *et al.*, 2000) y colocalizando con GFP de la línea ET4. Sin embargo esto ocurre con una frecuencia muy baja en comparación a lo que ocurre con tratamientos con cobre, indicando que en esta etapa del desarrollo la tasa de muerte de células en los neuromastos debido al recambio es baja. Esto es coherente con los experimentos que estiman la tasa de recambio de células ciliadas en la línea lateral como se mostrará más adelante.

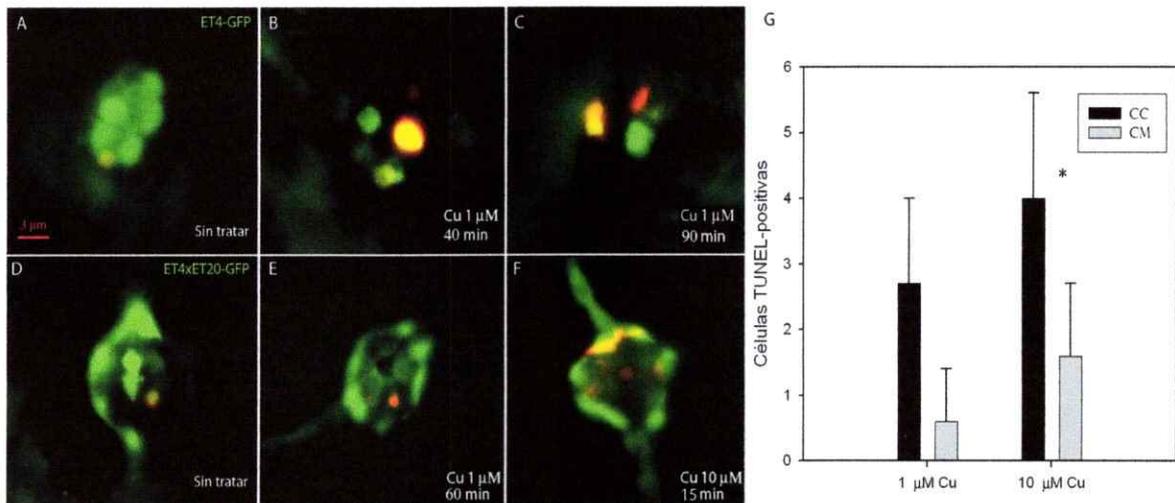


Figura 6. Detección de la fragmentación del DNA mediante TUNEL fluorescente. (A-C) Larvas 72 hpf de la línea ET4 tratadas con 0 (A) o 1 μM de cobre, por 40 (B) o 90 minutos (C). Se aprecia la colocalización de GFP y la marca de TUNEL en las células ciliadas. (D-F) Larvas 72 hpf de un cruce de las líneas ET20 y ET4 expuestas a 0 (D), 1 (E) o 10 (F) μM de cobre. (G) Hay un aumento significativo en el número de células con DNA fragmentado en 10 μM respecto de 1 μM , tanto para las células ciliadas (asterisco, $p < 0,01$) como para las del manto (asterisco, $p < 0,002$). Las barras representan el promedio \pm SD de las células TUNEL-positivas contadas.

3.6 Otoprotección con antioxidantes y producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en la toxicidad por cobre.

Se analizó el efecto otoprotector de tres antioxidantes ante la toxicidad por cobre en solución. Los agentes estudiados fueron el glutatión en su forma reducida (GSH), N-acetil l-cisteína (l-NAC) molécula precursora del glutatión y dimetiltiourea (DMTU) un compuesto con fuerte poder antioxidante utilizado en estudios experimentales (Tabuchi *et al.*, 2002).

La Figura 7.A muestra un efecto otoprotector estadísticamente significativo para los 3 antioxidantes utilizados en larvas de la línea ET4, alcanzándose el mayor efecto con GSH (ANOVA de una vía, $p < 0,05$). Esto demuestra que en las células ciliadas se reduce la toxicidad por cobre con agentes que atenúan el efecto de ROS mediante un efecto intracelular. Otros estudios de nuestro laboratorio (resultados no mostrados de P. Hernández) mostraron que el inhibidor de canales de mecanotransducción amilorida ejerce un efecto otoprotector similar al de los antioxidantes, sugiriendo un rol de la mecanotransducción activa en la toxicidad.

Para determinar si existe formación de ROS en presencia de cobre se utilizó el compuesto diclorodihidrofluoresceína-diacetato (H_2DCFDA), compuesto permeable que genera la molécula fluorescente verde diclorofluoresceína (DCF) al ser oxidado por ROS, y se ha utilizado para su detección en neuronas (Itoh *et al.*, 2006). Para distinguir las células ciliadas se realizó una tinción *in vivo* de larvas silvestres con bodipy TR.

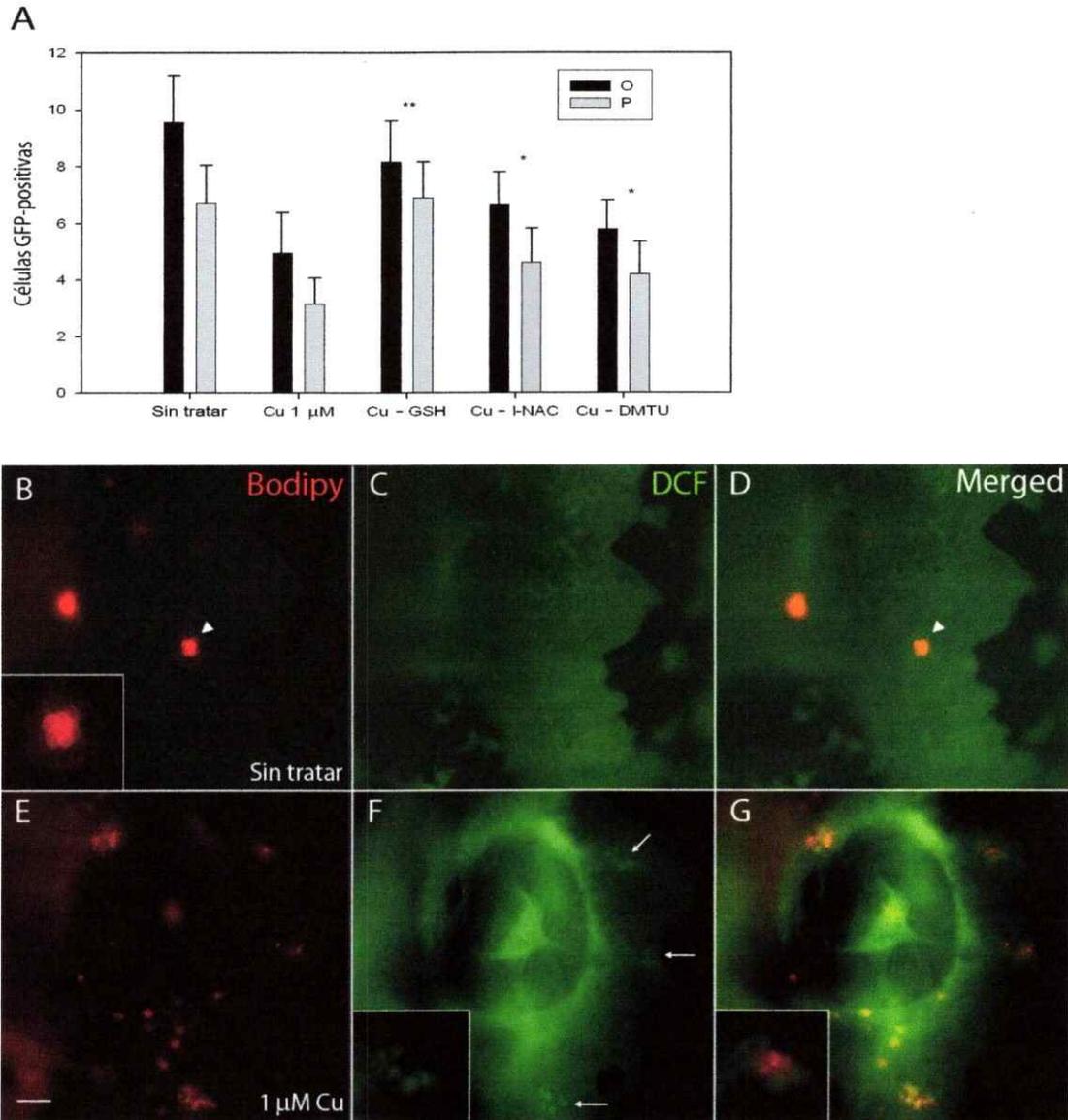


Figura 7. Otoprotección con antioxidantes y producción de ROS. (A) Larvas 72 hpf de la línea ET4 fueron incubadas en medio suplementado con antioxidantes (GSH, l-NAC o DMTU) y luego expuestas a 1 μ M de cobre por 60 minutos. Se contaron las células ciliadas GFP-positivas luego del tratamiento en los neuromastos O y P1 y se comparó con larvas sin tratar o expuestas a cobre sin incubarse en antioxidantes. Los antioxidantes aumentan la sobrevivencia de las células ciliadas al exponerlas al cobre ($p < 0,05$). Con GSH ocurre la protección más robusta, siendo el número de células contado significativamente mayor que en larvas expuestas a cobre sin incubarse en antioxidantes y no diferente al control (dos asteriscos, $p < 0,001$). Con l-NAC y DMTU hay significativamente más células GFP-positivas que solo con cobre, pero menos que en el control (asterisco, $p < 0,05$) ($n = 25$ larvas). (B-F) Larvas silvestres 72 hpf fueron incubadas en medio suplementado con la sonda H_2DCFDA y luego expuestas a 1 μ M de cobre. Previamente se tiñeron las células ciliadas con bodipy TR (rojo) para localizarlas. Las células ciliadas muestran la marca fluorescente verde debido a la generación de DCF (flechas y recuadros en F y G) en presencia de cobre evidenciando la producción de ROS. En el control sin tratar con cobre se aprecia el racimo normal de células ciliadas (cabezas de flecha y recuadro en B) y no aparece fluorescencia verde con DCF. Barra = 20 μ m.

Al incubar con 1 o 10 μM de cobre se aprecia la aparición de fluorescencia verde en las células ciliadas a los pocos minutos de exposición al metal, demostrando una correlación entre estrés celular y la posterior muerte celular. La Figura 7 muestra fotografías representativas de la formación de DCF con 1 μM de cobre, evidenciando la formación de ROS en las células ciliadas expuestas al cobre.

Sección 2: Regeneración celular en los neuromastos.

3.7 Dinámica de la regeneración y recambio de las células ciliadas en neuromastos.

Las células ciliadas de los neuromastos pueden regenerar completamente si las larvas son devueltas a medio fresco luego de tratamientos por dos horas con 1 o 10 μM de cobre (Hernández *et al.*, 2006). En este estudio se tomó ventaja de la línea transgénica ET4 para seguir este proceso bajo estas dos condiciones de tratamiento y describir la dinámica de regeneración de células ciliadas en los neuromastos O y P1 (Figura 8.A,B).

En larvas control se observa una adición constante de células ciliadas. En larvas expuestas a 1 μM de cobre por 2 horas, comienzan a aparecer células GFP-positivas desde las 4 horas y alcanzan niveles normales a las 24 horas luego del fin del tratamiento. Con 10 μM de cobre se observa que las células GFP-positivas comienzan a aparecer 8 horas después del tratamiento y existe una tasa de recuperación menor, con los niveles normales alcanzados a las 77 horas.

La tasa de adición de células ciliadas durante la regeneración es mayor que en larvas control. Una interpretación de este hecho es que la reaparición de células ciliadas

destruidas por el cobre implica un proceso regenerativo. Sin embargo también podría pensarse que la aparición de nuevas células ciliadas se debe solo a la continua adición de células que existe durante estos estadios de desarrollo.

En los neuromastos existe recambio celular, donde mueren células ciliadas siendo reemplazadas continuamente (Williams *et al.*, 2000). En este experimento se contó el número total de células GFP-positivas y esto no considera los posibles eventos de muerte de células ciliadas en las larvas control debido al recambio. La velocidad de adición de células en condiciones normales podría ser más rápida que lo observado si muchas células estuvieran muriendo, pudiendo ser igual a la observada durante la regeneración. Se determinó entonces la tasa genuina de adición de células en larvas control para los neuromastos O y P1 durante los estadios en que se observó la regeneración. La metodología utilizada se detalla en métodos y se esquematizó en la Figura 9 presentando los datos obtenidos.

Los resultados muestran que la muerte de células ciliadas en los estadios en que se estudió la regeneración es baja en comparación a la adición de éstas a los neuromastos. Por ejemplo para el neuromasto P1, durante 24 horas mueren en promedio entre 0,1 y 0,3 células, pero se adicionan entre 1,6 y 2. La adición de células ciliadas a los neuromastos en condiciones normales es menor que durante la regeneración, por lo tanto los datos presentados en la Figura 8.A,B muestran fidedignamente un incremento en la tasa de adición de células ciliadas a los neuromastos luego del daño por cobre. Esto demuestra que existe una auténtica regeneración de células ciliadas en los neuromatos de la línea lateral del pez cebra.

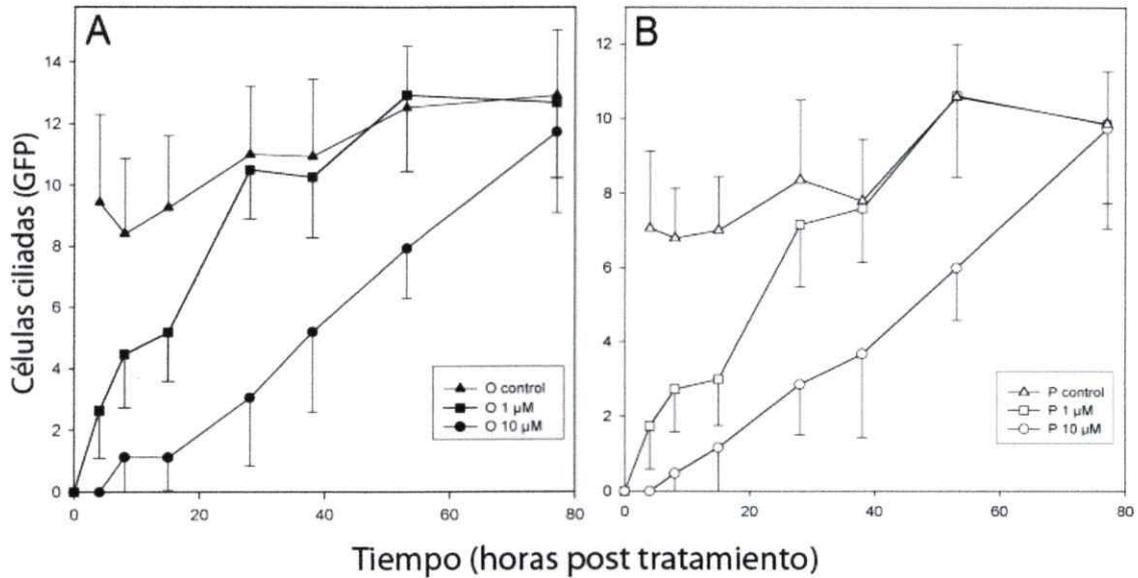
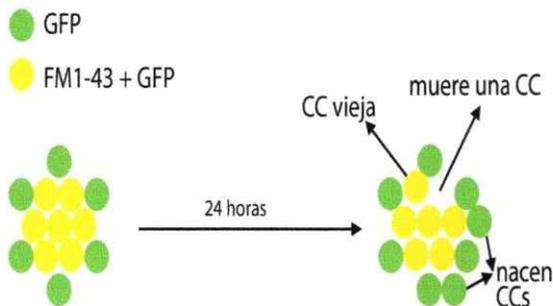


Figura 8. Regeneración de células ciliadas. Las larvas de la línea ET4 fueron incubadas por 2 horas en 0, 1 o 10 μM de cobre para eliminar las células ciliadas. Luego de traspasar a medio fresco, se monitoreó la reaparición de GFP hasta las 80 horas post-tratamiento (hpt). Se contó el número de células GFP-positivas en dos neuromastos: (A) O (línea lateral anterior) y (B) P1 (línea lateral posterior). Los puntos corresponden al promedio \pm SD. Con 1 μM las células ciliadas regeneran totalmente en 24 horas, mientras que con 10 μM tardan 77 horas, experimentando una tasa de recuperación más lenta. En los neuromastos de las larvas control hay una leve adición de células ciliadas durante este período de tiempo.

Estimación del recambio de células ciliadas (CCs) en los neuromastos de larvas entre los 3 y 5 dpf.

Se utilizó la línea ET4 y la tinción FM1-43.



Resultado:	3 dpf			4 dpf		
	FM1-43 + GFP	GFP	TOTAL	FM1-43 + GFP	GFP	TOTAL
O	4,8 \pm 1,5	3,8 \pm 1,4	8,3 \pm 1,8	4,5 \pm 1,5	6,7 \pm 1,1	11,1 \pm 1,3
P	4,0 \pm 1,8	1,8 \pm 1,1	5,5 \pm 1,8	3,7 \pm 1,0	4,0 \pm 1,8	7,6 \pm 1,5

Mueren 0,3 CCs y nacen 2 - 3 CCs

	4 dpf			5 dpf		
	FM1-43 + GFP	GFP	TOTAL	FM1-43 + GFP	GFP	TOTAL
O	7,2 \pm 1,2	2,5 \pm 1,9	9,8 \pm 1,3	6,3 \pm 2,5	3,8 \pm 2,2	10,1 \pm 2,0
P	5,9 \pm 1,3	2,7 \pm 1,3	8,3 \pm 1,5	5,4 \pm 1,4	3,3 \pm 1,8	8,6 \pm 1,7

Mueren 0,5 - 1 CCs y nacen 0,6 - 1,3 CCs

Figura 9. Estimación del recambio de células ciliadas en los neuromastos. La tinción de células GFP-positivas de línea ET4 con FM1-43 permite distinguir células ciliadas activas e inactivas. Se estimó la tasa de adición de células ciliadas los neuromastos contando las marcadas sólo con GFP. La tasa de muerte de células se estimó contando las marcadas con FM1-43 y GFP.

3.8 Proliferación celular en los neuromastos y regeneración de células ciliadas.

Se estudió la proliferación celular en los neuromastos y su relación con la regeneración de nuevas células ciliadas luego de tratamientos con cobre. Para esto se utilizó la línea transgénica ET4, en la que se detectó la aparición de células ciliadas regeneradas observando la reexpresión de GFP. La proliferación celular se observó por inmunodetección de la incorporación del análogo de nucleótidos Bromo-Deoxi-Uridina (BrdU) a los núcleos celulares de los neuromastos. Se visualizaron ambos marcadores simultáneamente y se identificaron las células ciliadas provenientes de células que han replicado su DNA, durante la regeneración y en condiciones normales.

En la Figura 10.A-L se presentan los datos obtenidos e imágenes representativas para cada una de las condiciones estudiadas. En los neuromastos tratados con 1 μ M de cobre, la marca de BrdU se distribuye periféricamente y rara vez se encuentra colocación con GFP de células ciliadas regeneradas. Por el contrario, neuromastos de larvas tratadas con 10 μ M de cobre muestran marca de BrdU centralizada y existe una colocación significativa con GFP de células ciliadas regeneradas. Rara vez se encontró colocación de las marcas en células ciliadas de larvas sin tratar incubadas por 4 o 24 horas. La cuantificación de los datos (Figura 10. M, N) no muestra diferencias significativas entre 1 μ M y los controles sin tratar para el número de células BrdU-positivas que dan origen a nuevas células ciliadas. Sin embargo para los tratados con 10 μ M la diferencia con el resto de las condiciones si es significativa (ANOVA de una vía, $p < 0,02$).

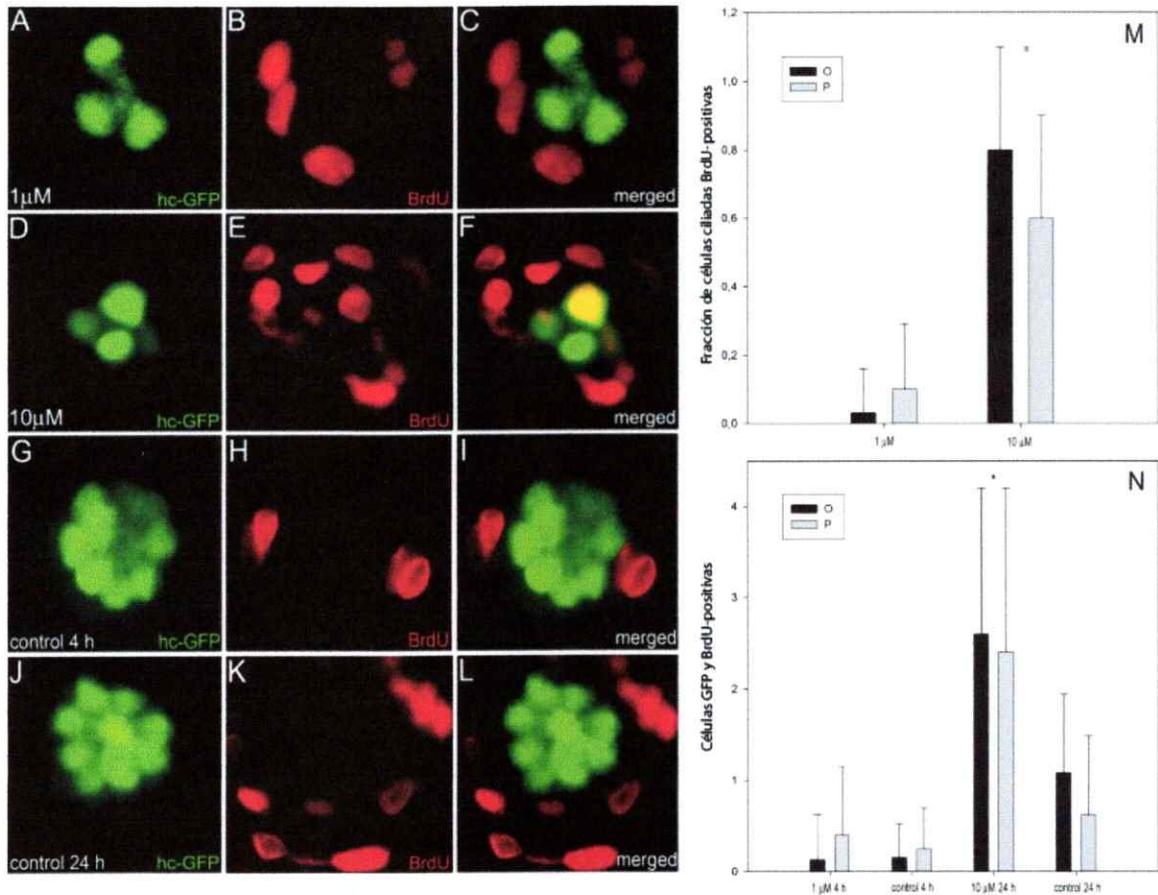


Figura 10. Proliferación durante la regeneración de células ciliadas. Se trataron larvas de la línea ET4 con 1 o 10 μM de cobre y se incubaron en BrdU por 4 o 24 horas respectivamente para permitir la regeneración de células ciliadas. Paralelamente se incubaron larvas sin tratar con cobre en BrdU durante los tiempos mencionados. Luego se procesaron las larvas para observar la expresión de GFP (verde) e incorporación de BrdU (rojo). (A-C) El tratamiento con 1 μM de cobre genera incorporación de BrdU en células ubicadas en la periferia del neuromasto que no están marcadas con GFP. (D-F) La regeneración de células ciliadas luego de 10 μM de cobre produce varias células que expresan GFP e incorporaron BrdU en el centro del neuromasto. (G-L) Larvas control incubadas por 4 horas (G-I) o 24 horas (J-L) muestran muy pocas células con doble marca. (M,N) Se cuantificaron los resultados usando 15 larvas (neuromastos O y P1) para cada condición. (M) Se muestra el promedio \pm SD de la fracción de células GFP-positivas que incorporaron BrdU en cada neuromasto luego de los tratamientos con cobre. Para ambos neuromastos las diferencias entre los dos tratamientos son significativas (asterisco, $p < 0,005$). (N) Promedio \pm SD del número de células GFP-positivas que incorporaron BrdU para cada tratamiento. Larvas tratadas con 10 μM muestran significativamente más células ciliadas marcadas con BrdU en comparación a larvas sin tratar incubadas por 24 horas en BrdU (asterisco, $p < 0,02$ válido para ambos neuromastos).

También se expresaron los datos como la fracción de células ciliadas en los neuromastos que presentan marca de BrdU, para todas las condiciones. En este caso existe una diferencia significativa entre el tratamiento con 10 μM y el resto de las condiciones (ANOVA de una vía, $p < 0,005$). Este resultado indica que las células ciliadas regeneradas luego del tratamiento con 1 μM de cobre se diferencian principalmente desde grupos de células que han completado su ciclo de replicación del DNA, en cambio las células ciliadas regeneradas, luego del daño con 10 μM , provienen más frecuentemente de precursores en los que ha transcurrido al menos un ciclo de replicación del DNA.

3.9 Expresión del marcador de células troncales neurales Sox2 en la línea lateral del pez cebra.

Las células progenitoras capaces de generar nuevas células ciliadas en la línea lateral podrían residir entre las células de soporte (Balak *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 1993, 1996; Williams *et al.*, 2000). Las propiedades de este grupo de células no ha sido caracterizado en el pez cebra, y tampoco se conoce si conforman una población homogénea. Estudios recientes en ratón muestran que las células de soporte del oído interno expresan el marcador de células troncales neurales Sox2, un factor de transcripción importante para la mantención de células precursoras (Kiernan *et al.*, 2005).

En este estudio se describió mediante hibridación *in situ* la expresión de *sox2* en la línea lateral hasta las 72 hpf. El RNA mensajero de *sox2* se expresa primero en la vesícula ótica y más tarde se observa expresión tanto del mRNA como de la proteína Sox2 en el

primordio desde las 28 hpf y en los proneuromastos depositados. Esta expresión se excluye del centro del neuromasto a medida que maduran los proneuromastos. A las 72 hpf la expresión es fuerte en la línea lateral anterior y posterior. Todo esto se muestra en la Figura 11.A-F.

Para detectar la expresión de Sox2 se utilizó el anticuerpo dirigido a la proteína de ratón. El péptido utilizado para generar este anticuerpo comparte 10 de 12 aminoácidos con la secuencia de Sox2 de pez cebra, y se trata de un epítoto no compartido con otros miembros de la familia de factores de transcripción SoxB. Análisis de Western blot muestran la presencia de una sola banda en extractos de proteína de pez cebra (resultado no mostrado).

La inmunotinción para Sox2 en los neuromastos en conjunto con visualización de GFP en larvas de la línea ET4, muestra que no se expresa en las células ciliadas pues no existe colocalización de anti-Sox2 y GFP. Las células marcadas con anti-Sox2 se ubican bajo las ciliadas y hacia la periferia de los neuromastos, dentro de la población de células accesorias. El mismo doble marcaje sobre la línea ET20 muestra frecuente colocalización de Sox2 con GFP de las células del manto (Figura 11. G-I). Con estos resultados se concluye que Sox2 no se expresa en las células ciliadas de la línea lateral, pero si en las células accesorias, incluyendo células de soporte y del manto.

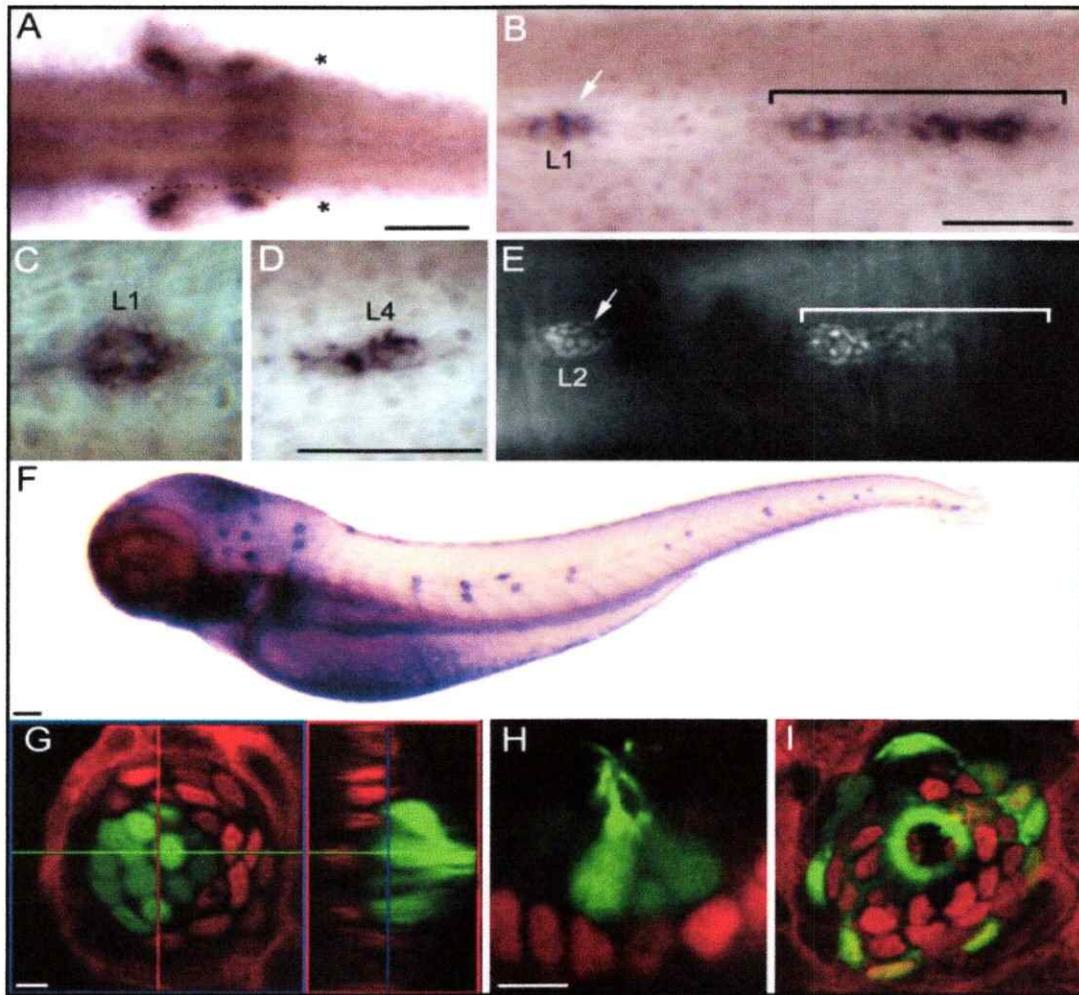


Figura 11. Expresión del mRNA de *sox2* mediante hibridación *in situ* y de la proteína Sox2 mediante inmunofluorescencia en la línea lateral del pez cebra. (A) Vista dorsal de una larva de 22 hpf mostrando expresión de *sox2* en la vesícula ótica (delineado de puntos), pero no en la placoda de la línea lateral posterior (asteriscos). (B) A las 28 hpf se detecta expresión en el primordio migratorio (corchetes) y en el proneuromasto L1 depositado recientemente (flecha). (C) A las 36 hpf se aprecia que la expresión de *sox2* se excluye (neuromasto L1 varias horas después) del centro del neuromasto. (D) La expresión en el neuromasto L4 en la misma larva muestra que las células marcadas forman un grupo compacto. (E) Inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-Sox2 en una larva 35 hpf muestra marca en el primordio migratorio y en el proneuromasto L2 depositado. (F) Hibridación *in-situ* en una larva 72 hpf, donde la línea lateral primaria ya se ha desarrollado. Hay fuerte expresión de *sox2* en los neuromastos de la línea lateral anterior y posterior. (G-I) Fotografías por microscopía confocal de neuromastos marcados con GFP (verde) y anti-Sox2 (rojo). (G) Cortes en Z y reconstrucción ortogonal de un neuromasto de la línea ET4. Las líneas coloreadas sirven como referencia para los planos en el lado derecho de la imagen. No hay colocalización de GFP de las células ciliadas con la inmunofluorescencia para Sox2. (H) Un corte en microscopía confocal a través de un neuromasto muestra la posición relativa de los marcadores GFP y Sox2. (I) Combinación de cortes en Z de un neuromasto de la línea ET20 marcado con anti-Sox2. Algunas células del manto colocalizan con Sox2 (amarillo), pero otras solo expresan GFP. Barras: (A) 35 μ m, (B) 200 μ m, (D) 70 μ m, (F) 35 μ m, (G) 3 μ m, (H,I) 3 μ m.

3.10 Proliferación celular y expresión de Sox2 durante la regeneración en neuromastos.

Dado el patrón de expresión de Sox2 en las células accesorias, se planteó la hipótesis de que estas células podrían estar dando origen a las células ciliadas regeneradas en neuromastos tratados con cobre. Las células que expresan Sox2 no desaparecen con los tratamientos con cobre que permiten regeneración, es decir 1 o 10 μM por 2 horas (Figura 12. A-C). Por otro lado, luego de tratar con 50 μM de cobre no se observa marca de Sox2 en los neuromastos de la PLL (resultado no mostrado), coincidente con la pérdida de capacidad regenerativa en estos neuromastos (Hernández *et al.*, 2006).

En el sistema nervioso central de mamíferos Sox2 se expresa en precursores neurales en proliferación (Pevny *et al.*, 2005). Se analizó entonces si esto ocurre en los neuromastos de pez cebra detectando simultáneamente Sox2 y BrdU incorporado durante la regeneración. Este experimento se realizó en larvas pertenecientes a una cruce entre las líneas ET4 y ET20, lo que permitió detectar simultáneamente GFP en células ciliadas y del manto junto con Sox2 y BrdU. La Figura 12.D-F muestra imágenes representativas de un corte central de neuromastos con triple marca en larvas tratadas y controles.

En las tres condiciones estudiadas la mayoría de células BrdU-positivas expresan Sox2, lo que se muestra gráficamente en la Figura 12.G. El porcentaje promedio de células con BrdU que expresan Sox2 es 74, 83 y 88% para el control, 1 o 10 μM respectivamente. Debe notarse que la incorporación de BrdU en los neuromastos tratados con 1 μM de cobre no es significativamente diferente de la vista en neuromastos control (Figura 12.G). Por el contrario, neuromastos de larvas tratadas con 10 μM de cobre muestran un

aumento significativo (ANOVA de una vía, $p < 0,006$) en estos valores en comparación con las otras condiciones.

Ocasionalmente fueron detectadas células que presentaban una débil expresión de GFP adyacente a la marca común de la línea ET4 (posiblemente de células ciliadas en el inicio de su diferenciación final), presentando también marca para Sox2 y que han incorporado BrdU (Figura 12.D, recuadros). Estas células producto de replicación del DNA reciente posiblemente están dejando la población que expresa Sox2 diferenciándose a células ciliadas.

Los resultados de este experimento indican entonces que la población de células que expresan Sox2 se mantiene viable luego de tratamientos con cobre que permiten regeneración. En el dominio de expresión de Sox2 ocurre la mayor parte de la proliferación celular en los neuromastos. Tratamientos suaves con cobre no producen cambios significativos en la proliferación celular, lo que sí ocurre con tratamientos más fuertes.

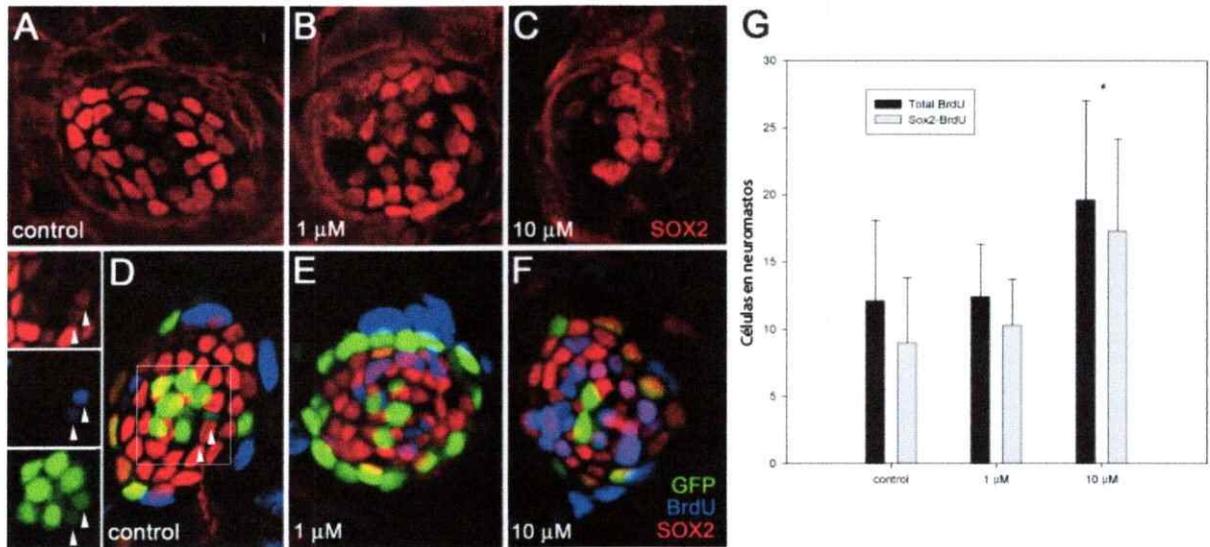


Figura 12. Expresión de Sox2 y proliferación en los neuromastos luego de tratamientos con cobre. (A-C) Larvas 76 hpf fueron tratadas con 0, 1 o 10 μ M de cobre por 2 horas e inmediatamente procesadas para la detección de Sox2. Para las tres condiciones se observan células que expresan Sox2. (D-G) Larvas de un cruce de las líneas ET4 y ET20 fueron tratadas con 0, 1 o 10 μ M de cobre por 2 horas y luego incubadas en BrdU por 12 horas. Luego se procesaron para observar expresión de GFP (verde), inmunofluorescencia para Sox2 (rojo) e incorporación de BrdU (azul). (D-F) Fotografías de cortes en microscopía confocal de las marcas mencionadas para las 3 condiciones. La base de las células del manto se ubica periféricamente en los neuromastos, mientras que las células ciliadas están al centro. Para cuantificar las células que expresan Sox2 y que incorporaron BrdU, consideramos las células dentro del límite dado por la base de las células del manto. Los recuadros en (D) muestran los tres canales de color por separado que componen la imagen encuadrada. Las flechas indican la expresión de los tres marcadores. (G) Cuantificación del número total de células que son BrdU-positivas (barras negras) y de las que tienen la marca para Sox2 y BrdU (barras grises) (n=15). El asterisco indica diferencias significativas ($p < 0,006$).

Discusión y conclusiones

4.1 Detección de la muerte de células ciliadas mediante el uso de sondas fluorescentes.

El uso de las sondas fluorescentes bodipy TR y sytogreen 24 permitió conseguir un método simple para evaluar vías de muerte que pueden ocurrir en las células ciliadas de la línea lateral. La observación del material nuclear teñido suele utilizarse para determinar posibles vías de muerte, asociándose la compactación a la apoptosis. El marcaje de la membrana plasmática permite observar el volumen y forma celular, reconociéndose células necróticas de aquellas que siguen otras vías de muerte a pesar de la compactación nuclear. Este resultado muestra que las células ciliadas mueren principalmente por necrosis al ser expuestas a cobre.

Concentraciones desde 10 μM de cobre producen necrosis en las células ciliadas de los neuromastos, las que aumentan su volumen volviéndose esféricas. La compactación y fragmentación del material nuclear puede deberse a la activación de vías de muerte programada (Majno *et al.*, 1995), liberación de nucleasas desde las mitocondrias (Han *et al.*, 2006) y también como consecuencia del efecto de especies reactivas del oxígeno producidas en presencia de cobre que pueden afectar el DNA (Brezova *et al.*, 2003).

Con 1 μM de CuSO_4 se observaron células necróticas con la misma morfología que al tratar con 10 μM , sin embargo algunas células ciliadas muestran reducción de su volumen y compactación nuclear, lo que sugiere la ocurrencia de otras vías de muerte. Las células ciliadas que mueren durante el recambio de los neuromastos también

muestran reducción de su volumen, compactación y fragmentación del material nuclear. Estas células se asocian a apoptosis pues inhibidores de caspasas atenúan su degeneración (Williams *et al.*, 2000).

4.2 Análisis de la ultraestructura de neuromastos tratados con cobre mediante microscopía electrónica de transmisión.

Se observaron detalles de la ultraestructura de neuromastos tratados por 2 horas con 1 μM de CuSO_4 . Las fotografías obtenidas muestran células muertas redondeadas, con volumen aumentado, llenas de vacuolas y con citoplasma pálido. Aparecen también frecuentemente acumulaciones membranosas o mielínicas evidenciando un fuerte daño sobre las membranas en presencia de cobre. Esto confirma que la necrosis es la vía de muerte predominante en este tipo de toxicidad.

Se aprecia un efecto sobre las mitocondrias, estas aparecen dañadas e hinchadas en los restos celulares. Esto se ha observado para la toxicidad con neomicina (Owens *et al.*, 2007), y puede tener relación con la formación de ROS y su efecto sobre las membranas mitocondriales, lo que puede activar también vías de muerte programada en las células ciliadas (Cunningham *et al.*, 2002).

4.3 Caracterización de líneas transgénicas de pez cebra.

En este trabajo se utilizaron líneas transgénicas de pez cebra generadas mediante la técnica de *enhancer trap* (Parinov *et al.*, 2004). El gen codificante para GFP se activa

bajo control de un promotor basal, siendo esta expresión sensible a la presencia de secuencias regulatorias (enhancers) que la restringen a distintos tipos celulares.

La expresión de GFP de la línea ET4 colocaliza completamente con Tubulina Acetilada en los neuromastos. GFP abarca células ciliadas activas y no activas pero ya destinadas a ciliadas, permitiendo seguirlas desde un momento previo al inicio de la mecanotransducción (Hernández *et al.*, 2007).

La línea ET20 expresa GFP en un subconjunto de células accesorias que presentan la morfología y posición de las células del manto. Al compararla con la expresión de la proteína ClaudinaB, marcador de células accesorias en los neuromastos (López-Schier *et al.*, 2004), hay colocalización con células que tienen igual morfología, pero se aprecia diferencia con la morfología del resto de las células accesorias (células de soporte), las que son redondeadas y más pequeñas, ubicándose en la zona basal del neuromasto. Aún no se ha identificado un marcador preciso de células del manto y este criterio permitió establecer que la expresión de GFP de la línea ET20 podría cumplir esta función.

4.4 Efecto del cobre sobre las células de soporte.

Observando la inmunofluorescencia para ClaudinaB, se identificó una capa de células que corresponde a las células de soporte de los neuromastos de la línea lateral posterior. Al eliminar todas las células ciliadas utilizando distintas concentraciones de cobre es posible obtener condiciones en que se daña parcialmente a las células de soporte (10 μM de Cu) o se mantienen intactas (1 μM de Cu). Esto resulta relevante en el estudio de la

regeneración de las células ciliadas ya que permite evaluar los sucesos que ocurren en las células de soporte y su rol durante este proceso.

Con 50 μM de Cu se eliminan por completo las células accesorias de los neuromastos línea lateral posterior. Dicho tratamiento no permite regeneración de las células ciliadas (Hernández *et al.*, 2006), lo que sugiere que en este proceso es fundamental la presencia de las células accesorias.

4.5 Fragmentación del DNA detectada por TUNEL fluorescente en la muerte celular inducida por cobre en neuromastos.

Se observó que existe fragmentación del DNA en algunas células ciliadas expuestas a 1 μM de cobre, sin verse afectadas las células del manto. El daño se extiende a las células del manto con 10 μM y se observan más células ciliadas marcadas por TUNEL.

La explicación más aceptada para la toxicidad por cobre es el daño oxidativo debido a la formación de ROS (Gaetke *et al.*, 2003). El daño sobre el material nuclear puede explicarse porque el cobre es capaz de producir quiebres en el DNA a través de la producción de radicales libres y que en cualquiera de sus estados de oxidación supera al hierro promoviendo daño en el DNA en presencia de otros agentes tóxicos (Brezova *et al.*, 2003). El cobre también produce cambios conformacionales en oligonucleótidos, los que pueden ser evitados en presencia de antioxidantes (Sorenson *et al.*, 2002).

El otro factor a tomar en cuenta es la activación de vías de muerte programada donde se fragmenta el DNA debido a la acción de enzimas específicas. El daño oxidativo generado por cobre sobre las mitocondrias puede activar cascadas apoptóticas mediadas

por caspasas (Strasser *et al.*, 2000) y vías donde son clave proteínas que tienen un efecto directo sobre el DNA, como por ejemplo las AIF (Apoptosis-inducing factor), que pueden participar también en la necrosis (Boujrad *et al.*, 2007). Las células apoptóticas que mueren por recambio en los neuromastos también experimentan fragmentación del DNA, la que fue detectada por este método.

4.6 Otoprotección con antioxidantes y producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en la toxicidad por cobre.

La otoprotección ante el cobre obtenida utilizando tres antioxidantes distintos muestra que la oxidación debido a radicales libres debe ser un factor clave en este tipo de toxicidad. Esto es coherente con la formación de ROS en las células ciliadas detectada con H₂DCFDA.

En este estudio se buscó mejorar los métodos comunes de aplicación de antioxidantes (Ton *et al.*, 2005) de evaluar la acción de los antioxidantes cargando las células de la línea lateral con éstos antes de la aplicación del agente tóxico. De esta forma se puede asegurar que el efecto evaluado es intracelular, descartando posibles interacciones entre los antioxidantes y el cobre en el exterior de las células.

Las propiedades antioxidantes del GSH han sido investigadas (Jiménez *et al.*, 2000), mostrándose la formación de complejos cobre-GSH, sin reactividad del grupo tiol del GSH, y con conservación la capacidad del compuesto de proteger ante los radicales libres. Estudios en hepatocitos expuestos a cobre muestran producción inmediata y rápida de ROS, pudiendo esta toxicidad ser reducida con varios agentes atenuantes del efecto de estas especies (Pourahmad *et al.*, 2000). Estos estudios sugieren que la

toxicidad por cobre puede deberse principalmente a la producción de ROS en las mitocondrias, independientemente de la producción de ROS citosólica. Las observaciones morfológicas por MET de neuromastos, para la toxicidad por neomicina (Owens *et al.*, 2007) y cobre en el presente estudio, muestran que existe un efecto sobre las mitocondrias.

El efecto intracelular de los antioxidantes sugiere una posible entrada del cobre a las células ciliadas. La sensibilidad de este tipo de células al cobre podría explicarse por la posible entrada del metal a través de canales de mecanotransducción. Este tipo de canales presenta una baja selectividad pues permite la entrada de cationes divalentes como Mg^{+2} y Ca^{+2} (Nishikawa *et al.*, 1996) y de la tinción vital FM1-43 (Nishikawa *et al.*, 1996; Meyers *et al.*, 2003; Corey *et al.*, 2004). Como ya se mencionó, otros estudios de nuestro laboratorio muestran otoprotección ante el cobre con el inhibidor de la mecanotransducción amilorida. Este inhibidor impide la entrada del FM1-43 a las células ciliadas de la línea lateral de xenopus (Nishikawa *et al.*, 1996).

4.7 Regeneración y recambio de células ciliadas en neuromastos.

En estudios previos de nuestro laboratorio se había caracterizado la temporalidad de la regeneración de células ciliadas en neuromastos usando la tinción vital Di-Asp (Hernández *et al.*, 2006), dando cuenta de la aparición de células ciliadas funcionales. En este estudio se utilizó la línea ET4 permitiendo observar las células ciliadas incluyendo estados de diferenciación previos a la mecanotransducción.

Se distinguió la aparición de células ciliadas regeneradas luego del daño por cobre de la adición normal de éstas durante el desarrollo de los neuromastos. El número de células

que mueren en condiciones normales es bajo en comparación al de células que se adicionan, indicando que la observación la línea ET4 es un método fidedigno para estimar la dinámica de regeneración y demuestra que existe una autentica regeneración de células ciliadas en los neuromastos.

Las concentraciones sobre 1 μM de cobre disminuyen la velocidad de regeneración, posiblemente debido a que afectan también a las células accesorias, mostrando su importancia para la regeneración pues podrían contener a los posibles progenitores de las nuevas células ciliadas.

4.8 Proliferación celular en neuromastos y regeneración de células ciliadas.

Al estudiar la proliferación celular se observó que existe una sostenida replicación del DNA en las células accesorias de lo neuromastos, sugiriendo que esta población celular podría ser una fuente de células para la regeneración. Con 1 μM de cobre las células ciliadas regeneradas no provienen de células que han replicado su DNA, sugiriendo que las nuevas células ciliadas serían producto de precursores que no provienen de una división celular (pre-mitóticos). Estos precursores podrían no ser dañados por esta concentración de cobre diferenciándose rápidamente a células ciliadas. Con 10 μM de cobre en cambio las nuevas células ciliadas resultan principalmente de precursores que han replicado el DNA y podrían provenir de un evento de división (post-mitóticos). Esta concentración al afectar las células accesorias podría destruir los precursores que eran producto de divisiones celulares anteriores y que permiten la regeneración rápida observada con 1 μM . Las células accesorias sobrevivientes podrían entrar en el ciclo

celular después del daño y regenerar las células ciliadas en un proceso más lento, lo que explicaría el retraso en la regeneración.

4.9 Expresión del marcador de células troncales neurales Sox2 en la línea lateral del pez cebra.

Se describió la expresión del marcador de células troncales neurales Sox2, detectada en por inmunofluorescencia. Sox2 es crucial en el desarrollo de los dominios sensoriales en el oído de mamíferos. Actúa río arriba de Math1, factor de transcripción crucial en la destinación a células ciliadas (Woods *et al.*, 2004). Sox2 se expresa en células precursoras y ciliadas durante la formación inicial del órgano de Corti (Kiernan *et al.*, 2005).

En los neuromastos Sox2 no se expresa en células ciliadas diferenciadas, pero si en numerosas células ubicadas en la base de este órgano coincidiendo con la ubicación de las células de soporte. Dado este patrón de expresión, Sox2 podría cumplir un rol en la mantención de células precursoras en los neuromastos.

En la medida que se generen nuevos marcadores para distinguir células con distintas propiedades en el dominio de las células accesorias, podría determinarse si Sox2 se expresa en todas las células de soporte y si todas estas células serían capaces de producir nuevas células ciliadas.

4.10 Proliferación celular y expresión de Sox2 durante la regeneración en neuromastos.

El experimento final de este trabajo busca integrar las observaciones realizadas en regeneración de células ciliadas, la proliferación celular en los neuromastos y las células accesorias que expresan Sox2. Se encontró que significativamente la mayoría las células que proliferan en los neuromastos expresan Sox2 tanto en condiciones normales como durante la regeneración, sugiriendo que las células ciliadas provenientes de esta proliferación probablemente son producto de precursores que expresaban Sox2. Las células accesorias de los neuromastos se presentan como fuertes candidatas a contener los progenitores de las nuevas células ciliadas.

Existe evidencia de que en la línea ET4 la expresión de GFP comienza durante la división final que da origen a un par de células ciliadas diferenciadas (López-Schier *et al.*, 2006). En el presente experimento posible detectar ocasionalmente células divididas recientemente que presentan una expresión disminuida de Sox2 y comenzando a diferenciarse a células ciliadas, indicado por la expresión de GFP de la línea ET4. Esto es una evidencia directa de la formación de células ciliadas a partir de las células accesorias que proliferan y expresan Sox2.

5. Bibliografia

Balak KJ, Corwin JT, Jones JE. Regenerated hair cells can originate from supporting cell progeny: Evidence from phototoxicity and laser ablation experiments in the lateral line system. *J Neurosci* 1990, 10:2502–2512.

Ben-Sasson, S.A., Sherman, Y., Gavrieli, Y. Identification of dying cells – *in situ* staining. *Cell Death*, 1995. Academic Press, London, pp. 29–39.

Bohne BA, Harding GW, Lee SC. Death pathways in noise-damaged outer hair cells. *Hear Res.* 2007, 223(1-2):61-70.

Boujrad H, Gubkina O, Robert N, Krantic S, Susin SA. AIF-Mediated Programmed Necrosis: A Highly Regulated Way to Die. *Cell Cycle.* 2007, 6(21):2612-9.

Brezova V, Valko M, Breza M, Morris H, Telser J, Dvoranova D, Kaiserova K, Varecka L, Mazur M, Leibfritz D. Role of Radicals and Singlet Oxygen in Photoactivated DNA Cleavage by the Anticancer Drug Camptothecin: An Electron Paramagnetic Resonance Study. *J. Phys. Chem. B* 2003, 107:2415-2425.

Cheng AG, Cunningham LL, Rubel EW. Mechanisms of hair cell death and protection. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005,13(6):343-8.

Corey DP, García-Añoveros J, Holt JR, Kwan KY, Lin SY, Vollrath MA, Amalfitano A, Cheung EL, Derfler BH, Duggan A, Géléoc GS, Gray PA, Hoffman MP, Rehm HL, Tamasauskas D, Zhang DS. TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature.* 2004, 432(7018):723-30.

Cummings, M.C., Winterford, C.M., Walker, N.I. Apoptosis. *J. Surg. Pathol.* 1997, 21: 88–101.

Cunningham LL, Cheng AG, Rubel EW. Caspase activation in hair cells of the mouse utricle exposed to neomycin. *J Neurosci.* 2002, 22(19):8532-40.

Dambly-Chaudiere C, Sapede D, Soubiran F, Decorde K, Gompel N, Ghysen A. The lateral line of zebrafish: a model system for the analysis of morphogenesis and neural development in vertebrates. *Biol Cell* 2003, 95(9):579-87.

Gaetke, L.M.; Chow, C.K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology* 2003, 189:147-163.

Ghysen A, Dambly-Chaudiere C. Development of the zebrafish lateral line. *Curr Opin Neurobiol.* 2004,14(1):67-73.

- Harris JA, Cheng AG, Cunningham LL, MacDonald G, Raible DW, Rubel EW. Neomycin-induced hair cell death and rapid regeneration in the lateral line of zebrafish (*Danio rerio*). *J Assoc Res Otolaryngol*. 2003, 4(2):219-34.
- Han W, Shi X, Nuttall AL. AIF and endoG translocation in noise exposure induced hair cell death. *Hear Res*. 2006, 211(1-2):85-95.
- Henderson D, Bielefeld EC, Harris KC, Hu BH. The role of oxidative stress in noise induced hearing loss. *Ear Hear*. 2006, 27(1):1-19.
- Hernández PP, Moreno V, Olivari FA, Allende ML. Sub-lethal concentrations of waterborne copper are toxic to lateral line neuromasts in zebrafish (*Danio rerio*). *Hear Res*. 2006, 213(1-2):1-10.
- Hernández PP, Olivari FA, Sarrazin AF, Sandoval PC, Allende ML. Regeneration in zebrafish lateral line neuromasts: expression of the neural progenitor cell marker Sox2 and proliferation-dependent and-independent mechanisms of hair cell renewal. *Dev Neurobiol*. 2007, 67(5):637-54.
- Itoh Y, Takaoka R, Ohira M, Abe T, Tanahashi N, Suzuki N. Reactive oxygen species generated by mitochondrial injury in human brain microvessel endothelial cells. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2006, 34(1-2):163-8.
- Jiménez, I.; Speisky, H. Effects of copper ions on the free radical-scavenging properties of reduced glutathione: implications of a complex formation. *J. Trace Elem. Med. Biol*. 2000, 14:161- 167.
- Jones JE, Corwin JT. Replacement of lateral line sensory organs during tail regeneration in axolotls: Identification of progenitor cells and analysis of leucocyte activity. *J Neurosci*. 1993, 13:1022–1034.
- Jones JE, Corwin JT. Regeneration of sensory hair cells after laser ablation in the lateral line system: Hair cell lineage and macrophage behavior revealed by timelapse video microscopy. *J Neurosci*. 1996, 16:649–662.
- Kawamoto K, Sha SH, Minoda R, et al. Antioxidant gene therapy can protect hearing and hair cells from ototoxicity. *Mol Ther*. 2004, 9:173-181.
- Kiernan AE, Pelling AL, Leung KK, Tang AS, Bell DM, Tease C, Lovell-Badge R. Sox2 is required for sensory organ development in the mammalian inner ear. *Nature* 2005, 434:1031–1035.

Kressel, M., Groscurth, P. Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labeling of fragmented DNA. *Cell Tissue Res.* 1994, 278:549–556.

Kuo, YM., Zhou, B.; Cosco, D.; Gitschier, The copper transporter CTR1 provides an essential function in mammalian embryonic development. *J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001, 98:6836-6541.

Levenson CW. Trace metal regulation of neuronal apoptosis: from genes to behavior. *Physiol Behav.* 2005, 86(3):399-406.

Linbo TL, Stehr CM, Incardona JP, Scholz NL. Dissolved copper triggers cell death in the peripheral mechanosensory system of larval fish. *Environ Toxicol Chem.* 2006, 25(2):597-603.

Lloyd, R.V.; Hanna, P.M.; Mason, R.P. The origin of the hydroxyl radical oxygen in the Fenton reaction. *Free Rad. Biol. Med.* 1997, 22:885-888.

López-Schier H, Starr CJ, Kappler JA, Kollmar R, HudspethAJ. Directional cell migration establishes the axes of planar polarity in the posterior lateral-line organ of the zebrafish. *Dev. Cell* 2004, 7:401–412.

López-Schier H, Hudspeth AJ. A two-step mechanism underlies the planar polarization of regenerating sensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006, 103(49):18615-20.

Lowenheim H, Kil J, Gultig K, Zenner HP. Determination of hair cell degeneration and hair cell death in neomycin treated cultures of the neonatal rat cochlea. *Hear Res.* 1999, 128(1-2):16-26.

Majno, G., Joris, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *J. Path.* 1995, 146, 3–15.

Matsui JI, Gale JE, Warchol ME. Critical signaling events during the aminoglycoside-induced death of sensory hair cells in vitro. *J Neurobiol.* 2004, 61(2):250-66.

Meyers JR, MacDonald RB, Duggan A, Lenzi D, Standaert DG, Corwin JT, Corey DP. Lighting up the senses: FM1-43 loading of sensory cells through nonselective ion channels. 2003 *J Neurosci.* 23:4054–4065.

Murakami SL, Cunningham LL, Werner LA, Bauer E, Pujol R, Raible DW, Rubel EW. Developmental differences in susceptibility to neomycin-induced hair cell death in the lateral line neuromasts of zebrafish (*Danio rerio*). *Hear Res.* 2003, 186(1-2):47-56.

Nishikawa S, Sasaki F. Internalization of styryl dye FM1-43 in the hair cells of lateral line organs in *Xenopus* larvae. *J Histochem Cytochem.* 1996, 44(7):733-41.

Nishizaki, K., Yoshino, T., Orita, Y., Nomiya, S., Masuda, Y. TUNEL staining of inner ear structures may reflect autolysis, not apoptosis. *Hear. Res.* 1999, 130:131–136.

Owens KN, Cunningham DE, MacDonald G, Rubel EW, Raible DW, Pujol R. Ultrastructural analysis of aminoglycoside-induced hair cell death in the zebrafish lateral line reveals an early mitochondrial response. *J Comp Neurol.* 2007, 502(4):522-43.

Parinov S, Kondrichin I, Korzh V, Emelyanov A. Tol2 transposon-mediated enhancer trap to identify developmentally regulated zebrafish genes in vivo. *Dev Dyn* 2004, 231:449–459.

Pevny L, Placzek M. SOX genes and neural progenitor identity. *Curr Opin Neurobiol.* 2005, 15:7–13.

Pourahmad, J.; O'Brien, P.J. A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for Cu²⁺ and Cd²⁺. *Toxicology* 2000, 143:263-273.

Rae, T.D.; Schmidt, P.J.; Pufahl, R.A.; Culotta, V.C.; O'Halloran, T.V. Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *J. Inorg. Biochem.* 1999, 74:271-271.

Rubelab (Edwin W. Rubel hearing research laboratory).
<http://depts.washington.edu/rubelab/>

Santos F, MacDonald G, Rubel EW, Raible DW. Lateral line hair cell maturation is a determinant of aminoglycoside susceptibility in zebrafish (*Danio rerio*). *Hear Res.* 2006, 213(1-2):25-33.

Schweichel, J.U., Merker, H.J. The morphology of various types of cell death in prenatal tissue. *Teratology* 1973, 7:253–266.

Seiler C, Nicolson T. Defective calmodulin-dependent rapid apical endocytosis in zebrafish sensory hair cell mutants. *J Neurobiol.* 1999, 41(3):424-34.

Sha SH, Schacht J. Stimulation of free radical formation by aminoglycoside antibiotics. *Hear Res.* 1999, 128:112-118.

Shimizu T, Yabe T, Muraoka O, Yonemura S, Aramaki S, Hatta K, Bae YK, Nojima H, Hibi M. E-cadherin is required for gastrulation cell movements in zebrafish. *Mech Dev.* 2005, 122(6):747-63.

Sorenson, J.R. Cu, Fe, Mn, and Zn chelates offer a medicinal chemistry approach to overcoming radiation injury. *J. Curr. Med. Chem.* 2002, 9:639-662.

Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 2000, 69:217-245.

Tabuchi K, Tsuji S, Fujihira K, Oikawa K, Hara A, Kusakari J. Outer hair cells functionally and structurally deteriorate during reperfusion. *Hear Res.* 2002, 173(1-2):153-63.

Ton C, Parng C. The use of of zebrafish for assesing ototoxic and otoprotective agents. *Hear. Res.* 2005, 208:79-88.

White PM, Doetzlhofer A, Lee YS, Groves AK, Segil N. Mammalian cochlear supporting cells can divide and trans-differentiate into hair cells. *Nature* 2006, 441:984-987.

Williams JA, Holder N. Cell turnover in neuromasts of zebrafish larvae. *Hear Res.* 2000, 143(1-2):171-81.

Woods C, Montcouquiol M, Kelley MW. *Math1* regulates development of the sensory epithelium in the mammalian cochlea. *Nat Neurosci.* 2004, 7(12):1310-8.