

UCH-FC  
MAB-B  
M938  
C.1



# **Rol del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en la regeneración del nervio de la línea lateral posterior en larvas de pez cebra.**

**Tesis**

**Entregada A La**

**Universidad De Chile**

**En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos**

**Para Optar Al Grado De Magíster En Ciencias Biológicas**

**Facultad de Ciencias**

por

**JOSÉ ABELINO MOYA DÍAZ**

Marzo de 2012



**Director de Tesis:** Dr. Miguel Allende Connelly  
**Co-Tutor:** Dr. Juan Fernández Hidalgo

# INFORME DE APROBACION

## TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato.

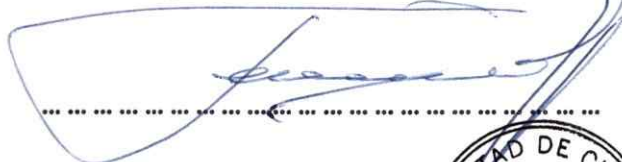
**José Moya Díaz**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 19 de marzo de 2012.

Director de Tesis:  
Dr. Miguel Allende C.



Co-Director de Tesis  
Dr. Juan Fernández H.

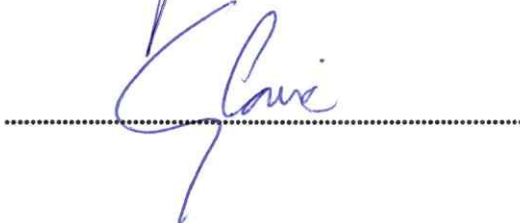


Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Verónica Palma A.



Dr. Álvaro Glavic M.





*A mi familia...*

## Autobiografía



Nací un 22 de diciembre de 1985 en San Antonio. Lo que más recuerdo de mi infancia es ese característico olor a mar, tierra y pino que únicamente lo he sentido en isla negra. Siempre fui muy apegado a mi familia, y disfruté por sobre todo esos almuerzos domingueros que hasta el día de hoy nos reúnen en el comedor principal.

El año 2010 llegué a Santiago con algo de incertidumbre... el transantiago, los tacos, una vida muy apresurada... tantas cosas se dicen y uno no sabe que pensar. Por suerte me terminé acostumbrando y aprendí a querer esta ciudad y a valorar a la gente que conocí durante este tiempo. Hoy me siento un capitalino más y puedo decir que Santiago me terminó gustando. Ayudó a ello la suerte de llegar a un muy buen laboratorio, bajo la tutela de un gran científico. En este lugar conocí gente increíble durante este tiempo, con quienes he vivido gratos momentos y he establecido lazos humanos que son muy importantes. Hoy siento que ha comenzado una etapa en mi vida que me permitirá desarrollarme aún más como persona y científico.

## Agradecimientos



A Dios, por ser el guía que ilumina mis pasos día a día.

A mi mamá, por su paciencia, amor y dedicación.

A mi papá, por sus consejos y los sólidos valores que me inculcó desde pequeño.

A mis hermanos por su apoyo y confianza en mis capacidades.

A mi Mamá Coba, por su incansable entrega y por darme lo mejor de ella.

A Cristóbal, por ser esa persona que me alegra la vida en los momentos de agobio.

A Micaela, por su cariño, apoyo e incondicionalidad.

A mi tío Pablo y tía Verónica, quienes me acogieron durante estos dos años en su casa.

Al Dr. Miguel Allende, por su calidad humana y por la confianza y disposición que tuvo conmigo para desarrollar este trabajo.

A los profesores del Instituto de Biología, en especial a los Dres. Verónica Palma, Álvaro Glavic y Juan Fernández, de quienes aprendí mucho.

A Catalina, Florencio y Juanito por su buena disposición en todo momento.

A mis compañeros de laboratorio por su ayuda en los momentos de aprendizaje y por los gratos momentos que compartimos, en especial a Cristian Undurraga, Oscar Peña y Mario Sánchez.

A las personas de los otros laboratorios, de quienes también aprendí mucho y me ofrecieron su ayuda y la posibilidad de compartir buenos momentos, en especial a Claudio Cortés, Diego Rojas, César Díaz, Ricardo Fuentes y Elvis Acevedo.

A mis amigos de infancia, con quienes comparto día a día mis sueños.

Y como olvidar a los que ya no están pero que son parte importante de este logro, en especial mi abuelito Ramón, mi Nina y mi amigo Mauro.

Al laboratorio "El rayo" por facilitarme los equipos instrumentales con los que desarrollé gran parte de esta tesis.

A Conicyt, por financiar mi magíster y mi estadía en Santiago durante estos dos años.

A todos ustedes... Muchas gracias!

## Índice de contenidos

### **1. Introducción: (págs. 1-25)**

1.1. Antecedentes y eventos característicos de la regeneración axonal en vertebrados: (1-7)

1.2. Neurotrofinas: Características generales y su rol en la regeneración axonal: (8-10)

*1.2.1. El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y su participación en la regeneración axonal: (10-13)*

1.3. Aplicación de métodos de daño que permiten estudiar los eventos asociados a la regeneración axonal: (14-16)

1.4. El pez cebra como modelo de estudio: (16-17)

*1.4.1. El sistema mecanosensorial (línea lateral) en el pez cebra: (18-22)*

*1.4.2. Regeneración axonal en el pez cebra: (22-24)*

*1.4.3. Rol de la neurotrofina BDNF en el pez cebra: (24-25)*

1.5. Hipótesis: (26)

1.6. Objetivo principal: (26)

1.7. Objetivos específicos: (26)

### **2. Materiales y Métodos: (págs. 27-37)**

2.1. Modelo biológico y mantención: (27)

2.2. Electroablación del nervio de la LLP con microelectrodos de tungsteno: (27-29)

2.3. Caracterización del daño celular post-electroablación del nervio de la LLP: (29)

2.4. Detección de la expresión de mRNA de BDNF por hibridación *in situ*:

*2.4.1. Construcción de sondas para la detección de la expresión de BDNF: (30-31)*

*2.4.2. Hibridación in situ contra BDNF: (31-32)*

2.5. Determinación de la expresión de BDNF por RT-PCR y PCR cuantitativo (qPCR):

*2.5.1. Extracción de RNA total: (33)*

*2.5.2. Obtención de cDNA y análisis de la expresión de la neurotrofina BDNF por RT-PCR: (33-34)*



2.5.3. Análisis de la expresión de la neurotrofina BDNF por qPCR: (35)

2.6. Ensayos de pérdida de función:

2.6.1. Microinyección del morfolino contra los mensajeros de BDNF: (35)

2.6.2. Análisis de la expresión de la proteína BDNF por "Western Blotting":

2.6.2.1. Extracción de vitelo: (36)

2.6.2.2. Extracción de proteínas totales: (36)

2.6.2.3. Inmunodetección de la proteína BDNF: (36-37)

### **3. Resultados: (págs. 38-56)**

3.1. Electroablación en larvas de pez cebra: (38-41)

3.2. Análisis de las velocidades de regeneración del nervio de la LLP en larvas de pez cebra post-electroablación: (42-46)

3.3. Detección de la expresión de *BDNF* por hibridación *in situ*: (47-48)

3.4. Cuantificación de la expresión de la neurotrofina *BDNF* por qPCR en tiempos posteriores a la electroablación del nervio de la LLP: (49-50)

3.5. Ensayos de pérdida de función:

3.5.1. Inmunodetección de la proteína BDNF: (51-52)

3.5.2. Análisis de las velocidades de regeneración del nervio de la LLP en larvas morfantes: (52-56)

### **4. Discusión: (págs. 57-71)**

4.1. Electroablación del nervio de la LLP en larvas de pez cebra: (57-58)

4.2. Regeneración del nervio de la LLP en larvas de pez cebra axotomizadas por electroablación: (58-61)

4.3. Expresión de mRNA de *BDNF* en el sistema de la LLP: (61-66)

4.4. Cuantificación de la expresión total de *BDNF* durante la regeneración del nervio de la LLP: (66-67)

4.5. Pérdida de función de la neurotrofina *BDNF*: (67-71)

### **5. Conclusiones: (pág. 72)**

**6. Proyecciones experimentales del sistema de electroablación en larvas de pez cebra:(73-81)**

**7. Anexos: (págs. 82-91)**

**8. Bibliografía: (págs. 92-100)**



## Índice de figuras

**Figura 1.** Activación de la capacidad de crecimiento intrínseca del SNP de vertebrados superiores por una lesión nerviosa periférica. (Pág. 7)

**Figura 2.** Activación por BDNF de vías de señalización intracelular. (Pág. 12.)

**Figura 3.** Sistema de la línea lateral posterior (LLP) del pez cebra a los 3 dpf. (Pág. 20)

**Figura 4.** Análisis estructural del nervio de la LLP en larvas de pez cebra. (Pág. 22)

**Figura 5.** Sistema de electroablación del nervio de la LLP de larvas de pez cebra. (Pág. 28)

**Figura 6.** Degeneración y regeneración del nervio de la LLP en larvas de pez cebra. (Pág. 40)

**Figura 7.** Caracterización de la regeneración del nervio de la LLP en larvas de pez cebra. (Pág. 44)

**Figura 8.** Distinción de las fases de regeneración del nervio de la LLP en larvas de pez cebra. (Pág. 45)

**Figura 9.** Caracterización del aumento exponencial de las velocidades de regeneración del nervio de la LLP en larvas de pez cebra. (Pág. 46)

**Figura 10.** Detección de la expresión del mRNA de la neurotrofina BDNF a distintas hpd. (Pág. 48)

**Figura 11.** Análisis de la expresión de *BDNF* mediante qPCR (método  $\Delta$ CT) a distintas hpd. (Pág. 50)

**Figura 12.** Análisis de la expresión de la proteína BDNF por Western Blotting. (Pág. 52)

**Figura 13.** Regeneración del nervio de la LLP en larvas de 72 hpf morfantes para BDNF. (Pág. 54)

**Figura 14.** Comparación de las velocidades de regeneración del nervio de la LLP en larvas control y morfantes para BDNF entre las 6 y 12 hpd. (Pág. 55.)

**Figura 15.** Análisis de las velocidades de regeneración del nervio de la LLP en condiciones control y morfante. (Pág. 56)

**Figura 16.** Infiltración leucocitaria posterior a la electroablación del nervio de la LLP. (Pág. 75)

**Figura 17.** Cuantificación de la infiltración leucocitaria a distintos tiempos post-electroablación. (Pág. 76)

**Figura 18.** Evaluación de la inflamación leucocitaria en larvas dañadas en el nervio de la LLP bajo distintas aplicaciones experimentales. (Pág. 78)

## Índice de figuras suplementarias

**Figura Suplementaria 1.** Caracterización del daño celular luego de la electroablación en el nervio de la LLP. (Pág. 82)

**Figura Suplementaria 2:** Análisis cuantitativo de los niveles de expresión de mRNA de BDNF en larvas de pez cebra. (Pág. 83)

**Figura Suplementaria 3:** Productos de amplificación por RT-PCR para *BDNF* y  $\beta$ -*actina*. (Pág. 84)

**Figura Suplementaria 4.** Comparación de las velocidades de regeneración del nervio de la LLP de larvas morfantes para BDNF con dos métodos distintos de axotomía: láser dos fotones y microelectrodos de tungsteno. (Pág. 85)

**Figura Suplementaria 5.** Inmunohistoquímica contra la detección de la proteína BDNF en peces de 10 dpf. (Pág. 86)

**Figura Suplementaria 6:** Sonda de RNA para la detección de BDNF en larvas de pez cebra. (Pág. 87)

**Figura Suplementaria 7:** Determinación de la concentración de proteínas de la fracción del sobrenadante del homogenizado de 200 larvas totales de pez cebra. (Pág. 88)

**Figura Suplementaria 8:** Curvas de amplificación y disociación para BDNF y  $\beta$ -*actina*. (Pág. 89)

**Figura Suplementaria 9:** Rectas para la determinación de la eficiencia de los partidores de BDNF y  $\beta$ -*actina*. (Pág. 90-91)

## Índice de tablas

**Tabla 1.** Caracterización de los efectos post-electroablación en larvas de pez cebra. (Pág.41)

## Lista de símbolos, abreviaturas o nomenclaturas

**ADF:** Factor despolimerizador de actina.

**AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico.

**BDNF:** Factor neurotrófico derivado del cerebro.

**CREB:** Elemento de respuesta a AMPc.

**GAP-43:** Proteína asociada al crecimiento.

**GFP:** Proteína fluorescente verde.

**hpd:** Horas post-daño.

**hpf:** Horas post-fertilización.

**LLP:** Línea lateral posterior.

***LysC::dsRed:*** Cepa transgénica que expresa la proteína fluorescente roja en macrófagos.

**MAG:** Glicoproteína asociada a la mielina.

**MAPK:** Proteína kinasa activada por mitógenos.

**MO:** Morfante.

***neuroD::GFP:*** Cepa transgénica que expresa la proteína fluorescente verde en el nervio de la LLP.

**NGF:** Factor de crecimiento nervioso.

**NT3:** Neurotrofina 3.

**NT-4/5:** Neurotrofina -4/5.

**Omgp:** Glicoproteína asociada a Oligodendrocitos.

**PI3K:** Fosfoinositol 3 kinasa.

**PKA:** Proteína kinasa A.

**PLC- $\gamma$ :** Fosfolipasa C-gamma.

**PrimI:** Primordio de la línea lateral posterior.

**PTB:** Proteína de unión a polipirimidina.

**RFP:** Proteína fluorescente roja.

**SNC:** Sistema Nervioso Central.

**SNP:** Sistema Nervioso Periférico.

**TrkB:** Receptor tirosina kinasa de tipo B.

## Material digital suplementario

Película A: Electroablación del nervio de la LLP de larvas Tg:(*neuroD::GFP*) con microelectrodos de Tungsteno. Se observa el periodo de regeneración comprendido entre las 6 y 12 hpd. En este tramo, se observa el término de la remoción de los fragmentos axonales degenerados distales y la proyección de los axones regenerando a lo largo del miosepto horizontal.

Película B: Axotomía del nervio de la LLP con pulsos laser dos fotones en larvas con la marca transgénica Tg:(*neuroD::GFP*) que expresan la proteína fluorescente verde en el nervio de la LLP. Se observan los eventos de degeneración Walleriana y regeneración del nervio de la LLP en larvas de 72 hpf. Tomado de tesis doctoral Rosario Villegas.

Película C: Los peces morfantes para la neurotrofina BDNF ven afectada la capacidad de regeneración del nervio de la LLP. La fase de degeneración Walleriana ocurre normalmente, mientras que las neuritas ven alterado su desplazamiento a lo largo del miosepto horizontal, proyectándose fuera del eje de la regeneración. Tomado de tesis doctoral Rosario Villegas.

Película D: El método de la electroablación permitió el estudio de la infiltración leucocitaria en neuromastos dañados con microelectrodos de Tungsteno. Tomado de resultados de Nicole Reynaert y Mario Sánchez.

## RESUMEN

Luego del daño axonal, las neuronas del sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP) de vertebrados superiores presentan una capacidad limitada de crecimiento y se enfrentan a un ambiente poco permisivo para su regeneración. Posteriormente se desencadenan eventos biológicos altamente conservados que incluyen la degeneración de fragmentos axonales distales, migración de células del sistema inmune al sitio de daño, remoción de los fragmentos axonales, recuperación de los cuerpos celulares dañados y, en algunos casos, regeneración axonal. Esta regeneración depende, entre otras cosas, de señales que promueven el crecimiento del cono axonal de las células en regeneración.

En esta tesis se diseñó un protocolo experimental que permitió el daño y posterior monitoreo *in vivo* de la regeneración del nervio de la línea lateral posterior (LLP) en larvas de pez cebra. Esta metodología, que consiste en la axotomía del nervio de la LLP mediante la aplicación de pulsos de corriente, se denominó "electroablación". Una vez realizada la electroablación, se detectó cualitativamente la expresión de la neurotrofina BDNF en las células que conforman el miosepto horizontal y se comprobó que la pérdida de función de esta molécula inhibe la regeneración del nervio de la LLP. Los resultados obtenidos permiten concluir que la expresión de la neurotrofina BDNF es necesaria para que ocurra la regeneración del nervio de la LLP en larvas del pez cebra.

## ABSTRACT

After axonal injury, neurons in the central nervous system (CNS) and peripheral nervous system (PNS) of higher vertebrates show a limited growth capacity and faces a non-permissive environment for regeneration. Later on, highly conserved biological events occurs that include axonal degeneration, site damaged immune cells migration, axonal fragments removal, damaged cell bodies recovery and, in some cases, axonal regeneration. This regeneration depends, among other features, of signals that promote axonal cone growth in regenerating cells.

In this work we designed an experimental protocol that allowed us to perform damage and subsequent *in vivo* monitoring of zebrafish larvae posterior lateral line (LLP) nerve regeneration. This method, involving the nerve axotomy of LLP by applying current pulses, is called "electroablation". After the electroablation, we detected the BDNF neurotrophin expression in cells that form the horizontal mioseptum and demonstrated that the BDNF loss-of-function inhibits LLP nerve regeneration. The results obtained indicate that the expression of BDNF neurotrophin is necessary for nerve regeneration in LLP from zebrafish larvae.



## INTRODUCCIÓN

### **1.1. Antecedentes y eventos característicos de la regeneración axonal en vertebrados.**

Históricamente, distintas indagaciones dieron indicios de lo que hoy en día se conoce sobre la regeneración nerviosa en animales, particularmente en vertebrados. Los experimentos realizados por el neuroanatomista español Santiago Ramón y Cajal mostraron que después de una lesión, las fibras dañadas en la médula espinal adulta de ratón empiezan a crecer y ramificarse por un cierto tiempo, pero luego estos brotes se paralizan por los obstáculos insuperables con los que se encuentran, hasta que se retraen y desaparecen. En 1911 se llevaron a cabo unos experimentos en el laboratorio de Ramón y Cajal que demostraron que cuando se cortaba profundamente la corteza cerebral de un ratón y se transplantaba el nervio ciático de otro ratón previamente dañado (entre 8 y 12 días antes) se observaba que varios puntos de la corteza convergían y penetraban en el trasplante a los 12 ó 14 días. Sin embargo, a los 40 días el trasplante disminuía de volumen, se encontraba penetrado por tejido conectivo y en proceso de atrofia y reabsorción. Tal evento se atribuyó al término de la secreción de “sustancias” que nutrían los tejidos nerviosos lesionados y que el crecimiento de los axones dependía de la presencia de esta sustancia especial, la cual era producida en proporciones efectivas únicamente por células que se encontraban en estrecha asociación con el tejido nervioso. (Ramón y Cajal, 1928).

Sin embargo, estos experimentos no fueron tomados en cuenta hasta la década del 80', cuando los trabajos reportados por Aguayo y sus colaboradores replicaron los estudios realizados por Cajal, pero con nuevos métodos, y transformaron la visión que se tenía sobre la regeneración (Aguayo *et al.*, 1983). De esta manera, comenzaron a surgir nuevos datos que reafirmaron la posibilidad de que los nervios podían regenerarse. Desde este momento, el área de la neurobiología de la regeneración ha sido objeto de estudio recurrente para comprender las bases celulares y moleculares que se relacionan con la regeneración nerviosa, tanto en el sistema nervioso central (SNC) como en el sistema nervioso periférico (SNP).

Hoy en día se sabe que las lesiones en el SNC y SNP de vertebrados generan una serie de eventos celulares y moleculares que inciden en la capacidad regenerativa de los axones. Uno de los primeros acontecimientos que ocurre luego del daño nervioso es la formación de cicatrices y la secreción de proteínas por células gliales que inhiben la regeneración axonal. La secreción de estas proteínas se ha demostrado en el SNC de murinos, particularmente la de la glicoproteína asociada a mielina (MAG) (McKerracher *et al.*, 1994), la glicoproteína asociada a oligodendrocitos (OMgp) (Kottis *et al.*, 2002), Nogo (Chen *et al.*, 2000), moléculas quimiorrepelentes de la regeneración axonal secretadas por la microglía (entre ellas la molécula repelente de la guía axonal (RGMa), netrina y Slit 1) (Kilayama *et al.*, 2011) y proteínas de matriz extracelular liberadas por astrocitos (Dezawa *et al.*, 2000). En otro modelo vertebrado, el pez cebra, se ha caracterizado la expresión del complejo molecular NOGO/R66 y la expresión de condroitin sulfatos, restringiendo el crecimiento de los axones por repulsión. (Klinger *et al.*, 2004; Becker y Becker, 2002).

En el SNP, en tanto, se ha caracterizado el comportamiento de las células de Schwann luego del daño axonal. El primer evento que ocurre en este tipo celular es su diferenciación y disminución de la expresión de moléculas inhibitoras de la regeneración. Posteriormente estas células desintegran la mielina que les rodea y expresan quimioquinas que promueven la supervivencia de las neuronas dañadas y el reclutamiento de macrófagos en el sitio lesionado, quienes remueven los restos mielínicos (Yang *et al.*, 2008). Inmediatamente después las células de Schwann forman una estructura mecánica por donde los axones regeneran. Este último evento depende de la activación de factores de transcripción. Por ejemplo, estudios de regeneración en nervios faciales de murinos han comprobado la participación del factor NF- $\kappa$ B en este proceso (Morton *et al.*, 2012). Esta estructura conformada por las células de Schwann se conoce como “Banda de Büngner” y secreta activamente sustratos que estimulan la regeneración axonal, entre las que se encuentran moléculas de adhesión celular, elementos de matriz extracelular y factores tróficos difusibles (Dezawa *et al.*, 2000).

La diferencia del potencial regenerativo entre el SNC y el SNP se explica en buena parte por el comportamiento de las células gliales luego del daño axonal.

Las neuronas, en tanto, responden al daño mediante la activación de vías de señalización intracelular y factores de transcripción. Estas respuestas, por lo general, favorecen el restablecimiento de la capacidad regenerativa de los nervios que han sido lesionados. Las investigaciones que han caracterizado el rol de estas vías de señalización han demostrado la participación de más de una de ellas durante la regeneración axonal. Entre estas se

encuentran la vía fosfoinositol 3 kinasa (PI3K), la vía de las proteínas kinasas activadas por mitógeno (MAPK), la vía JAK/STAT y la vía que activa a la proteína kinasa A (PKA). La activación de esta última es fundamental para superar los efectos inhibitorios de la mielina, ya que promueve la elevación de los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), molécula que desencadena la sobreexpresión de la enzima Arginasa I. Esta enzima participa bloqueando la inhibición de la regeneración axonal. Por otro lado, la síntesis de AMPc conlleva a la activación del elemento de respuesta a AMPc (CREB), un factor de transcripción que cuando es activo promueve la superación de los efectos inhibitorios de la mielina (Lonze y Ginty, 2002; Kandel y Squire, 2000) y estimula la sobreexpresión de genes implicados en funciones de supervivencia y regeneración neuronal, plasticidad sináptica y memoria en vertebrados (Gao *et al.*, 2004; Nestler *et al.*, 2001).

Por otra parte, estudios en donde se inhibió la vía de señalización mediada por citosinas, JAK 2, provocó el retardo de la extensión axonal en neuronas sensoriales de ratón axotomizadas. Este efecto demostró, en parte, que la señalización mediada por la vía JAK/STAT promueve la extensión de las neuritas que se encuentran regenerando mediante la sobreexpresión de elementos asociados al citoesqueleto (Liu y Snider, 2001).

Otra de las vías asociada a regeneración axonal es PI3K-AKT. Estudios han reportado que la supresión de la vía PI3K retarda la regeneración axonal (Liu *et al.*, 2010) y que en situaciones de daño axonal el factor AKT se coactiva con sustratos que promueven el ensamblaje de proteínas del citoesqueleto (Zhao *et al.*, 2011).

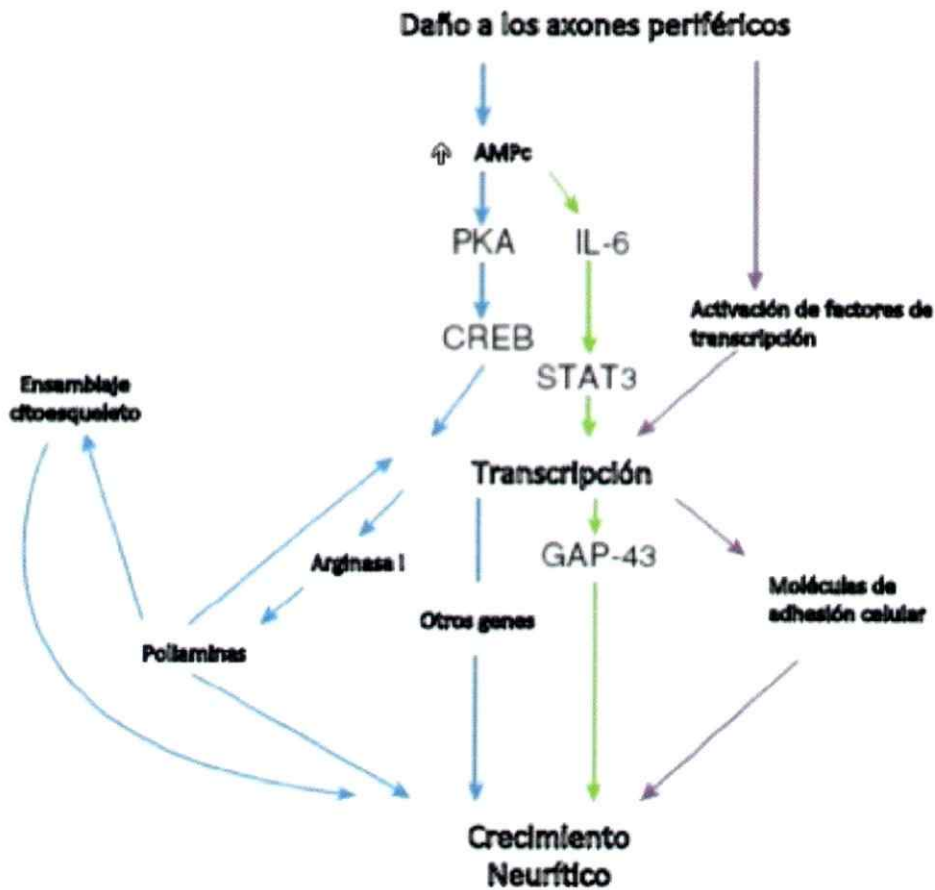
Luego de superar las etapas descritas anteriormente, las neuronas se encuentran en condiciones de responder satisfactoriamente a la secreción de factores que estimulan la regeneración axonal. Entre estas moléculas se encuentran las neurotrofinas (Sato *et al.*, 2008; Rolls *et al.*, 2008). En la siguiente sección se profundizará sobre el rol de estas moléculas en la regeneración axonal.

Finalmente las neuronas ejecutan las respuestas efectoras de los procesos regenerativos, que fundamentalmente consisten en la síntesis de proteínas que conformarán el nuevo citoesqueleto y la secreción de proteínas que promoverán la elongación axonal. En murinos se ha descrito la expresión de tubulina y  $\beta$ -actina (Bradke *et al.*, 2012; Liu y Snider, 2001) y de la proteína asociada al crecimiento (GAP-43) (Kobayashi *et al.*, 1997) en los axones y conos axonales de neuronas que están regenerando. En el pez cebra, en tanto, se ha descrito la expresión de proteínas citoesqueléticas que comparten un alto grado de homología con las de vertebrados superiores. Entre ellas se encuentran Reggie 1 y Reggie 2, que estimulan el reordenamiento dinámico del citoesqueleto luego del daño axonal (Stuermer, 2011). Este reordenamiento es necesario para que ocurra la interacción entre proteínas motoras u otras proteínas, y se ejecuten los procesos de elongación y retracción axonal durante la etapa de regeneración (Spencer *et al.*, 2008).

Los antecedentes expuestos indican que cuando existe daño axonal las células que forman parte del microambiente del sistema nervioso, incluyendo neuronas y glía, desencadenan una serie de eventos celulares y moleculares que determinan la capacidad regenerativa de los axones (Figura 1).

En esta tesis nos centramos en la participación del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) durante la regeneración axonal en nervios periféricos. La importancia del estudio de esta molécula se fundamenta en las potenciales aplicaciones biomédicas sobre la regeneración de nervios periféricos en humanos. Esta proyección surge a partir de las investigaciones que han demostrado la regeneración axonal satisfactoria de vertebrados superiores cuando se administró esta neurotrofina (Liu *et al.*, 2012; Deng *et al.*, 2011; Sahenk *et al.*, 2008).

En la siguiente sección se expondrán las principales características de los factores neurotróficos, para posteriormente describir la participación de BDNF durante la regeneración axonal.



**Figura 1. Activación de la capacidad de crecimiento intrínseca del SNP de vertebrados superiores por una lesión nerviosa periférica.** La axotomía eleva los niveles intracelulares de AMPc, que activa a la PKA. PKA activa la expresión de genes a través de CREB, que resulta en la regulación positiva de la transcripción de genes relacionados con la regeneración, como la Arginasa I. Arginasa I promueve la síntesis de poliaminas, que pueden regular directamente el ensamblaje del citoesqueleto e inducir la expresión de genes necesarios para la regeneración. Los niveles elevados de AMPc, induce genes relacionados con la regeneración, como GAP-43. Lesiones periféricas, además, inducen la transcripción de factores que promueven la expresión de moléculas de adhesión celular que son importantes para la regeneración axonal. Tomado y modificado de Chen *et al.*, (2007).

## 1.2. Neurotrofinas: Características generales y su rol en la regeneración axonal.

En las secciones anteriores se presentaron antecedentes que identificaron a los factores neurotróficos como moléculas que promueven eventos de regeneración axonal. Tales factores se han agrupado en familias de acuerdo a sus características bioquímicas, funcionales y de peso molecular. Esta clasificación incluye a las neurotrofinas (el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), el factor de crecimiento nervioso (NGF), la neurotrofina 3 (NT-3) y la neurotrofina -4/5 (NT-4/5)); las citoquinas neuropoiéticas, (el factor neurotrófico ciliar (CNTF), la interleuquina 6 (IL-6), y el factor inhibitorio de leucemia (LIF)); la familia de los factores de crecimiento fibroblástico, (factor básico de crecimiento fibroblástico (FGF-2), el factor ácido de crecimiento fibroblástico (FGF-1) y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF-5)); los factores de crecimiento transformantes (TGF), (el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), la neurturina (NTN) y la persefina (PSP)). Finalmente, y respecto a los factores de crecimiento derivados de la insulina 1-2 (IGF 1, IGF 2), se han catalogado como una familia especial de factores neurotróficos (Smith *et al.*, 2011; Lykkisas *et al.*, 2007).

Las neurotrofinas son moléculas que promueven la regeneración nerviosa y se liberan en respuesta al daño axonal en el SNC y SNP. En cuanto a su composición química, las neurotrofinas comparten una característica particular: la presencia de un patrón común de 6 cisteínas de ubicación conservada en su conformación estructural. La presencia de estos residuos permite la conformación de puentes disulfuro que les otorga su estructura terciaria característica (Lykkisas *et al.*, 2007).



Las neurotrofinas se unen específicamente con receptores de transmembrana del tipo tirosina quinasa (Trk) que activan vías de señalización intracelular que regulan la regeneración axonal. Entre estas se encuentran la vía PKA, PI3K y fosfolipasa C- gamma (PLC- $\gamma$ ) (Lykkisas *et al.*, 2007). En cuanto a la regulación del crecimiento y regeneración axonal, esta se encuentra sujeta a la interacción del receptor pan-neurotrófico p75 con otras moléculas como el receptor NOGO66. La alta afinidad de NOGO por las MAG explica la inhibición del crecimiento neurítico y la demora en los eventos de regeneración del sistema nervioso durante las primeras horas después del daño (Wang *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2002).

Cuando existe daño axonal los constituyentes del citoesqueleto alteran su dinámica de polimerización, promoviendo los eventos regenerativos. La alteración de esta dinámica de ensamblaje ocurre en el cono axonal; una estructura especializada que se ubica en el frente migratorio de las proyecciones neuríticas. Esta estructura es rica en filamentos de actina (F-actina) y durante la fase de extensión axonal induce la formación de protrusiones celulares, lamelipodios y filopodios (Gaillard *et al.*, 2005). Este cono actúa como una “antena” capaz de detectar señales neurotróficas que estimulan o inhiben la elongación axonal (Marsick y Leutorneau, 2011). La recepción de neurotrofinas por los receptores ubicados en el cono axonal desencadenan la regeneración axonal mediante la estimulación del ensamblaje de proteínas que forman parte del citoesqueleto. Por ejemplo, las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) participan en el crecimiento temprano de axones y dendritas (San José *et al.*, 1997a) y se ha demostrado que la reorganización de los microtúbulos mediada

por MAP-5 durante el crecimiento dendrítico es dependiente de la expresión de NT-3 (San José *et al.*, 1997b). Por otra parte, la elongación axonal es dependiente de los ciclos de polimerización y despolimerización de actina. Estos ciclos están definidos por la interacción con moléculas reguladoras del alargamiento o acortamiento axonal, tales como el factor despolimerizador de actina (ADF) o Cofilina (Meberg *et al.*, 1998). Otros estudios han demostrado que ciertas neurotrofinas, como NGF, BDNF y NT3, incrementan los niveles de F-actina en los conos de crecimiento axonal en neuronas sensoriales, favoreciendo la extensión y regeneración axonal (Lykissas *et al.*, 2007).

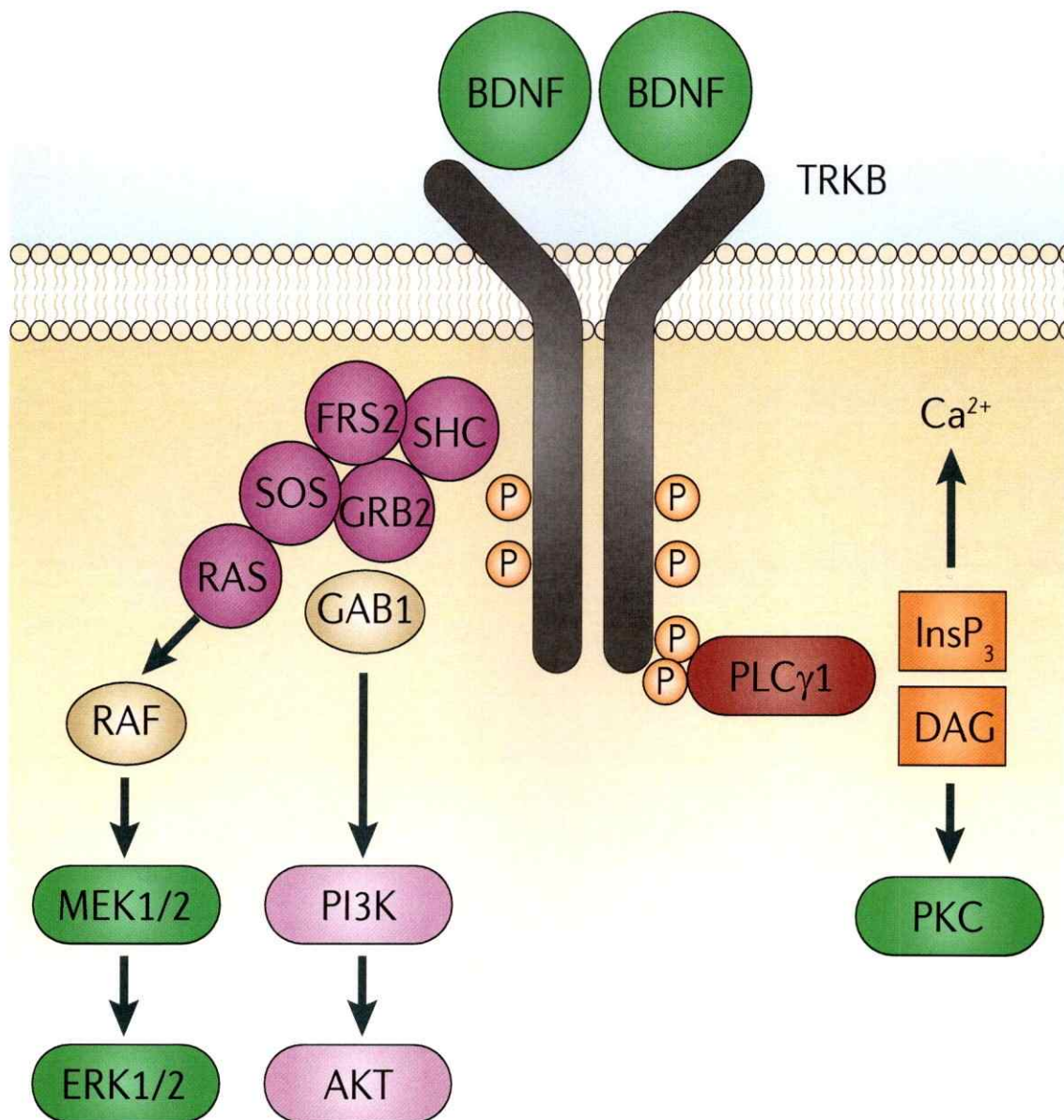
Estos antecedentes demuestran que los factores neurotróficos se relacionan directamente con el citoesqueleto y, de esta manera, con la regeneración axonal. Sin embargo, existe uno que ha sido estudiado vigorosamente por su amplia gama de funciones en sobrevivencia, morfología y desarrollo neuronal, participación en la modulación de la eficiencia sináptica del sistema nervioso central y periférico y su efecto sobre la regeneración nerviosa en vertebrados. (Nagahara y Tuszinski, 2011). Esta neurotrofina es el factor nervioso derivado del cerebro, clásicamente conocido como BDNF, y en la siguiente sección se describen sus características generales y de qué manera participa durante la regeneración axonal.

### 1.2.1. BDNF y su participación en la regeneración axonal.

La neurotrofina BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) fue identificada por primera vez en 1982 por Yves Barde y Hans Thoenen (Barde *et al.*, 1982). Esta molécula, así como otros miembros de las familias de las neurotrofinas, es sintetizada como un pro-péptido de 247 aminoácidos, es almacenado en vesículas, secretado constitutivamente o como resultado

de su activación. La obtención de la isoforma madura ocurre por el clivaje proteolítico de la molécula inducido por plasminas o metaloproteinasas (Mowla *et al.*, 1999). En vertebrados superiores, la proteína BDNF se encuentra ampliamente distribuida en el área cortical del cerebro adulto, en algunas áreas subcortiales y en regiones de la médula espinal. Cuando esta neurotrofina es madura y funcional se une a dos receptores de distinta clase: receptores tirosina kinasas de tipo B (TrkB), que es un subtipo de los receptores que conforman la familia de los Trk (Soppet *et al.*, 1991), y al receptor p75, que es miembro de la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral (Carter *et al.*, 1996). Molecularmente, la unión de BDNF a TrkB conduce a la dimerización y autofosforilación de los sitios de tirosina, contiguo al dominio citoplasmático carboxi-terminal, y a la activación de proteínas adaptadoras que incluyen a las proteínas de unión a polipirimidina (PTB) y a los dominios de homología Src (SH2) (Kaplan y Miller, 2000). La interacción con dominios PTB y SH2 conduce a la fosforilación de una variedad de sustratos que determinan la activación las vías de señalización PI3K, MAPK, PLC $\delta$ 1 y del factor de transcripción CREB. La activación de estos mecanismos celulares inducen el crecimiento dendrítico, plasticidad sináptica y supervivencia neuronal (Figura 2) (Nagahara y Tuszinski, 2011; Huang y Reichardt, 2003).

En cuanto a los tipos celulares que expresan BDNF, se ha comprobado que las células de Schwann poseen la capacidad de expresar y secretar esta neurotrofina a la matriz extracelular en respuesta al daño axonal (Frostick *et al.*, 1998, Funakoshi, 1993).



**Figura 2. Activación por BDNF de vías de señalización intracelular.** La unión de la neurotrofina BDNF al receptor TrkB gatilla la fosforilación de los residuos de tirosina en la porción intracelular del receptor. Esta unión desencadena la activación de proteínas adaptadoras, entre las que se encuentran proteínas de unión a polipirimidinas (PTB) y dominios de homología SRC (SH<sub>2</sub>). Estas proteínas en su forma activa fosforilan sustratos que conducen a la activación de las vías de señalización PI3-K, MAPK y PLC $\gamma$ 1, que están asociadas a los eventos de supervivencia, diferenciación y regeneración celular (Tomado de Nagahara y Tuszinski, 2011).

En cuanto a los tipos celulares que expresan BDNF, se ha comprobado que las células de Schwann poseen la capacidad de expresar y secretar esta neurotrofina a la matriz extracelular en respuesta al daño axonal (Frostick *et al.*, 1998, Funakoshi, 1993). Incluso, estudios han demostrado que en situaciones de daño los macrófagos que acuden al sitio lesionado aumentan la tasa de secreción de BDNF, favoreciendo la regeneración axonal (Bouhy *et al.*, 2006). Para comprobar los efectos de la neurotrofina durante la regeneración axonal, se han realizado ensayos de administración exógena de moléculas que silencian la expresión de la neurotrofina o simulan el aumento de expresión. Por ejemplo, ensayos en donde se han administrado anticuerpos específicos contra BDNF han bloqueado el efecto de la neurotrofina, obteniendo como resultado el retardo de la regeneración de nervios periféricos de ratas (Zhang *et al.*, 2000). Por otra parte, el implante de minibombas osmóticas han demostrado que BDNF promueve el crecimiento dirigido de los axones que están regenerando hacia las fuentes que expresan la neurotrofina (Shibata *et al.*, 2010), así como la supervivencia celular, crecimiento axonal y sobreexpresión de marcadores celulares asociados a regeneración, como GAP-43 y el factor de transcripción c-JUN (Chaisuksunt *et al.*, 2003; Boyd y Gordon, 2002; Cumans, 2001). Estos estudios demuestran que la neurotrofina BDNF es una de las moléculas que se expresa y promueve la regeneración axonal del SNC y SNP de vertebrados (Gordon *et al.*, 2010; Simon *et al.*, 2003; Boyd y Gordon, 2002) y la clasifican como una molécula indispensable para que ocurran los eventos regenerativos. En secciones posteriores se retomará la participación de esta neurotrofina durante la regeneración axonal.



### **1.3. Aplicación de métodos de daño que permiten estudiar los eventos asociados a la regeneración axonal.**

Para lograr la caracterización de la regeneración axonal en los modelos biológicos vertebrados, ha sido necesaria la intervención experimental de estos animales para ocasionar daños nerviosos específicos o generales. La generación de estas lesiones ha permitido caracterizar los eventos de degeneración axonal, expresión de moléculas inhibitoras, migración de células inmunes y en la mayoría de los casos, regeneración de los axones dañados. El objetivo de las estrategias de daño utilizadas es simular las lesiones nerviosas a las que el ser humano está expuesto. Por ejemplo, la técnica de aplastamiento o “crush” de los nervios ciáticos de murinos simula el traumatismo severo de la médula espinal. Por otra parte, axotomías con láser de dos fotones emulan accidentes vasculares.

Una de las principales estrategias utilizadas para estudiar la regeneración axonal es el aplastamiento de nervios periféricos en murinos. El daño axonal con micropinzas en el nervio ciático y retina de ratas ha llevado a identificar la expresión de aquellos genes que promueven la regeneración axonal (Sánchez-Migallón *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2010; Ishikawa *et al.*, 2005; Bregman *et al.*, 2002). Otra de las estrategias utilizadas en este modelo es la transección del nervio ciático. La aplicación de este método ha permitido monitorear el curso de la regeneración axonal a través de análisis de expresión de marcadores moleculares y test asociados a regeneración, como el índice de función ciática y la velocidad de conductancia de canales iónicos. (Alrashdan *et al.*, 2010).

Estrategias más recientes apuntan a lesiones celulares más acotadas, que se han logrado mediante la aplicación de herramientas nanotecnológicas. Por ejemplo, en murinos se han ocasionado daños que oscilan entre los 300 y 500 nm. de diámetro mediante la aplicación de pulsos de láser cuya duración se restringe al orden de los femtosegundos (Kunik *et al.*, 2011). Otro de los métodos aplicados para la obtención de daños sitio-específicos es la lesión con nanocuchillos, que provocan lesiones del orden de los 20 nanómetros de diámetro. (Chang *et al.*, 2010).

La generación de organismos mutantes en murinos también ha sido útil para el estudio de la degeneración y regeneración axonal. Por ejemplo, en ratas se ha demostrado que la molécula de adhesión celular 1 (ICAM-1) es esencial para la elongación axonal durante el proceso de regeneración (Kirsh *et al.*, 2009) y que la secreción de proteínas de matriz extracelular por las células de Schwann promueven la elongación axonal (Lorenzetto *et al.*, 2008).

Sin embargo, la aplicación de estas estrategias de daño en murinos presentan algunas desventajas. Entre estas se encuentra al largo tiempo que se demora la regeneración de los nervios periféricos. Por otra parte esta la imposibilidad de monitorear la regeneración axonal *in vivo*, debiendo aplicar técnicas de histología clásica para lograr las caracterizaciones correspondientes. Esto se suma a que para lograr el daño en el tejido deseado se deben realizar complejas cirugías en los animales.

El pez cebra *Danio rerio* es otro de los modelos vertebrados en donde se han implementado estrategias de daño axonal. Entre las técnicas comúnmente utilizadas se encuentra la aplicación de pulsos láser de dos fotones que generan daños localizados y su aplicación ha

contribuido a la descripción de los procesos de guía y regeneración axonal en la retina (Pardo- Martín, 2007) y en el nervio de la línea lateral posterior (LLP) (O'Brien *et al.*, 2009; Villegas *et al.*, datos no publicados).

En el estudio de la regeneración axonal este organismo otorga ventajas importantes respecto a la utilización de otros modelos biológicos. Una de las principales ventajas es que en este organismo los eventos regenerativos se pueden monitorear *in vivo*, los que ocurren en un periodo reducido de tiempo. Por otra parte, esta la condición propia de un animal vertebrado. Ambas características lo posicionan como un modelo interesante para el estudio de la regeneración axonal, cuyos resultados serán biológicamente relevantes para complementar los mecanismos reportados en vertebrados superiores. En la siguiente sección se describirán en mayor detalle estas ventajas.

#### **1.4. El pez cebra como modelo de estudio.**

El pez cebra presenta importantes ventajas que lo hacen un interesante modelo para el estudio de diversos mecanismos biológicos. Entre estas ventajas se encuentran:

- La fecundación externa de sus huevos, lo que posibilita el estudio de todas las etapas del desarrollo.
- La transparencia de las células en el estado embrionario y larvario, que permite la visualización de estructuras internas durante las primeras etapas del crecimiento.
- La gran cantidad de huevos depositados, llegando a tener más de 100 por pareja.
- Un tiempo de organogénesis corto (48 a 72 horas).



- Facilidad de manipulación genética y procedimientos moleculares bien establecidos que posibilitan, por ejemplo, la inhibición específica de la actividad génica mediante el uso de oligonucleótidos antisentido denominados morfolidos.
- Un tiempo de generación relativamente corto (3 a 6 meses).
- La disponibilidad de líneas transgénicas y mutantes gen-específicos.
- La destacable velocidad de regeneración de algunos tejidos durante los estadios larvales y adultos.

Las ventajas que presenta el pez cebra otorgan fundamentos consistentes para elegirlo como modelo de estudio de la regeneración axonal y los eventos moleculares que la definen. Para ello, y en base a los antecedentes bibliográficos y los trabajos previos del laboratorio, el nervio que se encuentra alojado en el sistema de la línea lateral posterior (LLP) emerge como el tejido apropiado para monitorear los eventos celulares y moleculares que ocurren durante la regeneración axonal en el SNP. En la siguiente sección se expondrán los aspectos funcionales y de desarrollo de este sistema mecanosensorial, para posteriormente describir la conformación estructural del nervio que forma parte de la LLP.

#### 1.4.1. El sistema mecanosensorial (línea lateral) en el pez cebra.

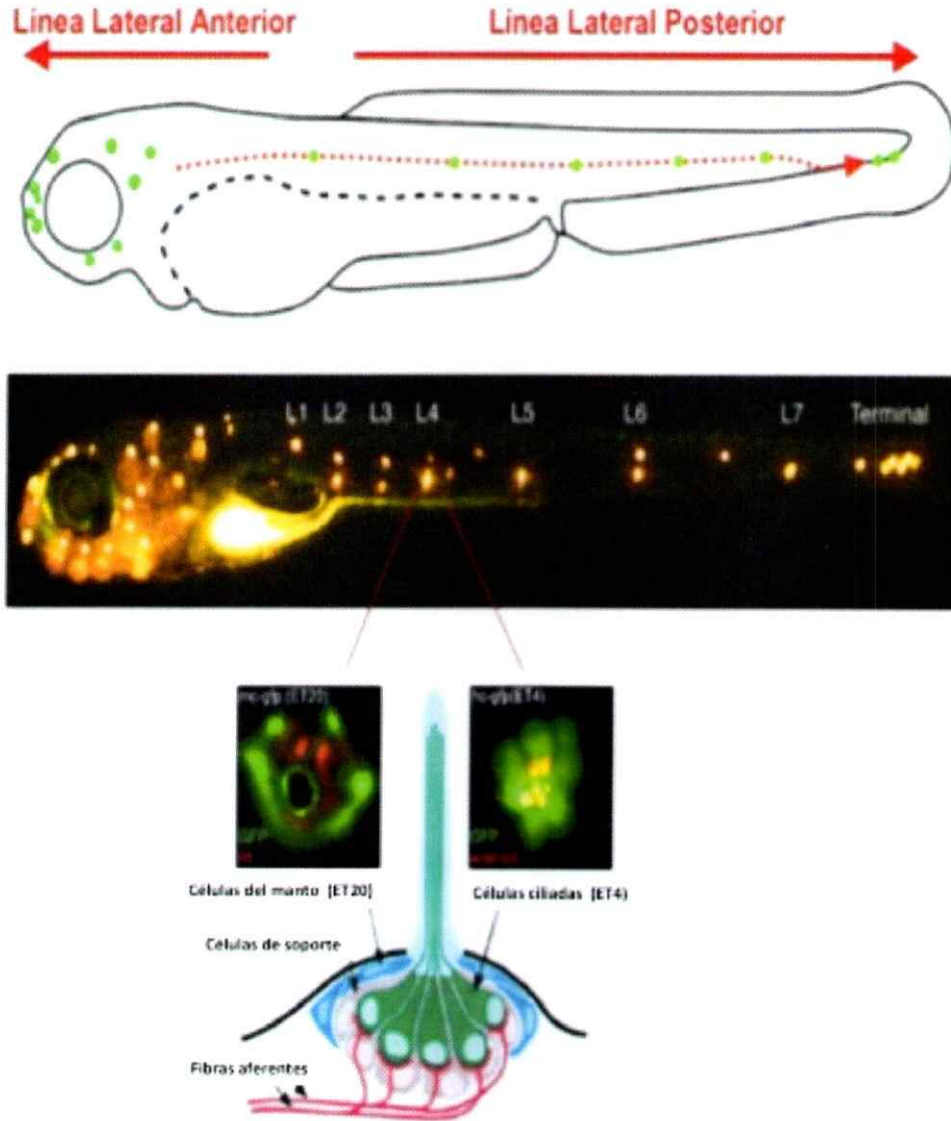
La línea lateral es un sistema mecanosensor especializado que está distribuido a lo largo de la superficie corporal de peces y anfibios. Su función se relaciona con la detección de presas, evasión de depredadores, nado sincronizado y aprendizaje de algunas conductas sociales (Stewart y Mc Henry, 2010). Está formado por una serie de órganos mecanosensoriales, los neuromastos, que se posicionan siguiendo un patrón especie-específico (Gompel *et al.*, 2001).

En el pez cebra, el sistema de la LLP se desarrolla a partir de la placoda ótica desde las 18 horas post fecundación (hpf). Esta placoda se divide en un grupo anterior, cercano a las 20 células que se convierten en el ganglio LLP, y un grupo posterior de aproximadamente 80 células, que constituye el primordio de la LLP (priml). La migración de este primordio a lo largo del miosepto horizontal, es acompañada por los axones que se extienden desde las neuronas ubicadas en el ganglio de la LLP (Gilmour *et al.*, 2004; Metcalfe 1985). Las células precursoras gliales a su vez, migran a lo largo de los axones (Gilmour *et al.* 2002) del nervio de la LLP mielinizándolos (Brösamle y Halpern, 2002).

La migración del primordio comienza a las 20 hpf y culmina a las 48 hpf, cuando ya ha depositado conjuntos de aproximadamente 20 células regularmente espaciados, los proneuromastos. Estos maduran y se denominan neuromastos a las 72 hpf, cuando ya son funcionalmente activos y en ellos se distinguen cuatro tipos celulares: células de sostén, células del manto, células progenitoras y las células ciliadas. Estas últimas se encuentran en contacto directo con el medio acuático gracias a la prolongación del cilio central. Tienen una

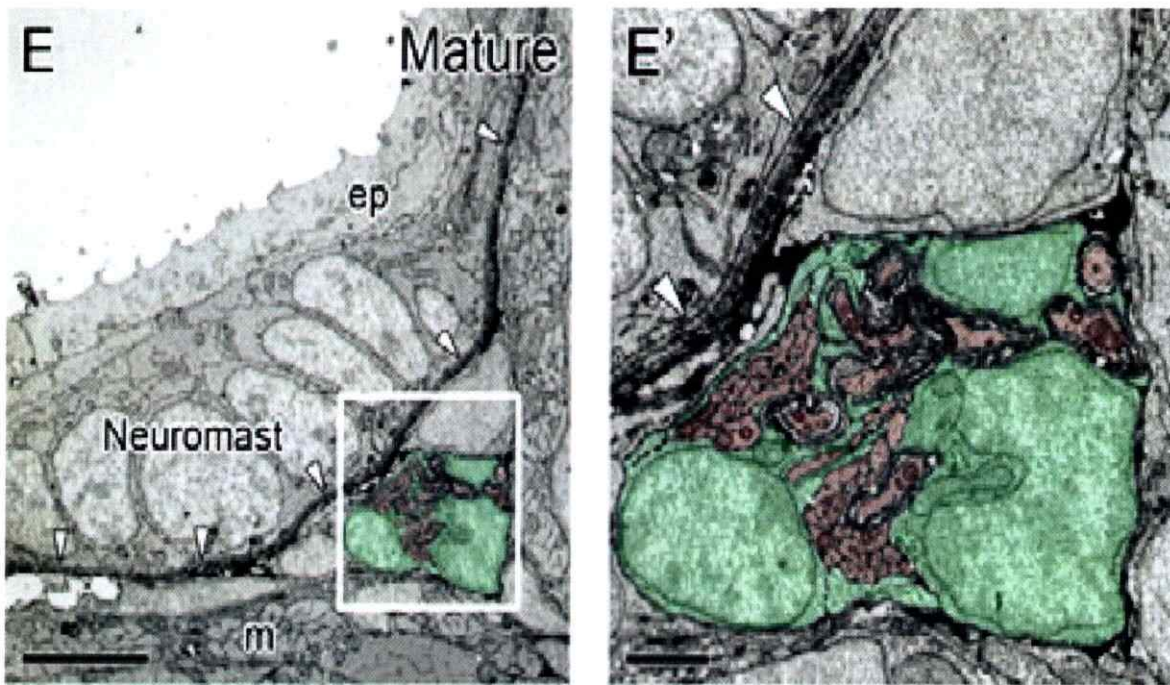
capacidad mecanotransductora altamente especializada y un programa genético de diferenciación similar al de las células del oído interno de mamíferos (Ghysen y Dambly-Chaudière, 2007) (Figura 3).

Entre los neuromastos, el primI deposita células interneuromásticas que en etapas más tardías del desarrollo larval pueden proliferar, dando origen a los neuromastos intercalares (Sarrazin *et al.*, 2010, Grant *et al.*, 2005; Lopez-Schier y Hudspeth, 2005).



**Figura 3. Sistema de la línea lateral posterior (LLP) del pez cebra a los 3 dpf.** a) Diagrama de la línea lateral del pez cebra. b) Visualización *in vivo*, de los neuromastos de la LLP del pez cebra mediante tinción Daspei. c) Esquema de un neuromasto maduro. Se observan las células ciliadas mecanosensoriales (color verde), células de soporte (color gris) y las células del manto (color azul). Además, se muestra la expresión de GFP en las células del manto de la línea transgénica sqET20 y la expresión de GFP en las células ciliadas de la línea transgénica sqET4. Tomado de tesis doctoral de Rosario Villegas .

En estadios larvales (72 hpf) el sistema de la LLP está ubicado en la superficie corporal de las larvas. En esta etapa del desarrollo, el tegumento del pez está formado por dos capas epiteliales: la capa externa peridérmica y, subyacente a ella, la capa interna basal. Ambas capas se encuentran separadas por una membrana basal rica en laminina (Le Guellec *et al.*, 2004). Estudios ultraestructurales demuestran que el nervio de la LLP, incluyendo axones y células de Schwann, inicialmente se localiza subyacente a la epidermis superficial (Figura 4) (Raphael *et al.*, 2010). Otros análisis por microscopía electrónica en peces de 78 hpf revelan una variedad de células especializadas dentro de la epidermis, algunas de las cuales aparecen asociadas al nervio de la LLP (O'Brien *et al.*, 2011). Allí se encuentran células peridérmicas, endoteliales, fibroblastos, células del sistema inmune y células de Schwann (o también denominadas basales). Los axones que conforman el nervio de la LLP se encuentran en la capa de células basales y representan las primeras terminaciones nerviosas especializadas que inervan la piel (O'Brien *et al.*, 2011).



**Figura 4. Análisis estructural del nervio de la LLP en larvas de pez cebra.** A los 3 dpf, el nervio de la LLP se encuentra subyacente al neuromasto, por debajo de la membrana basal (Indicado por cabezas de flecha). El neuromasto es localizado dentro de la epidermis. Las imágenes pseudocoloreadas representan las células de Schwann (en verde) y axones (en rojo). Barra: 2 $\mu$ m. (Abreviaciones. dpf: días post-fertilización; LLP: línea lateral posterior). Tomado de Raphael *et al.*, (2010).

#### 1.4.2. Regeneración axonal en el pez cebra.

El pez cebra tiene la capacidad de regenerar tejidos de manera rápida, efectiva, y por mecanismos moleculares similares a la de algunos vertebrados superiores. Esta ventaja ha motivado el estudio de la regeneración axonal en este organismo, particularmente en la retina y el nervio de la LLP.

En la retina se han estudiado los eventos que ocurren posterior a la axotomía de las neuronas que inervan a las células ganglionares retinales. Estas descripciones han permitido establecer un esquema temporal de los eventos regenerativos que ocurren en este tejido. Uno de los primeros sucesos es la liberación de moléculas que

conforman una barrera biológica impermeable en los axones que están en vías de regenerar (Becker y Becker, 2002). Luego de superar esta fase, se desencadenan una gama de mecanismos moleculares que incluyen la respuesta proliferativa de las células ganglionares retinales, la expresión diferencial de grupos de genes asociados a la remoción de restos celulares, (Cameron *et al.*, 2005; Bernhardt *et al.*, 1996) y la sobreexpresión de proteínas de matriz, crecimiento y reconocimiento celular (Yu *et al.*, 2011; Valdem, 2007; Becker, 1998).

En cuanto al sistema de la LLP, recientemente se han estudiado eventos relacionados con la degeneración de axones y dendritas sensoriales que inervan la superficie corporal de larvas de 78 hpf, cuyo suceso característico es la proyección de protrusiones celulares peridérmicas hacia el axón que está degenerando (O'Brien *et al.*, 2011). Por otra parte, la aplicación de pulsos láser 2 fotones en el nervio de la LLP ha posibilitado la caracterización *in vivo* de la regeneración del nervio y ha permitido establecer que las células de Schwann participan activamente de la guía axonal del nervio de la LLP a lo largo del miosepto horizontal (Villegas *et al.*, datos no publicados). Bajo estas mismas condiciones experimentales se caracterizó el rol de neurotrofinas en la regeneración del nervio de la LLP, demostrando que la expresión de GDNF por las células interneuromásticas promueve este proceso (Schuster *et al.*, 2010).

Estos estudios ilustran un esquema general de los eventos que ocurren durante la regeneración axonal en el pez cebra, con aquellas fases que inhiben y promueven los eventos regenerativos. Tal como se expuso en la sección 1.2.1, BDNF es una molécula que participa

activamente de la regeneración axonal y otros procesos biológicos. A continuación se presentará el rol que se ha descrito de esta neurotrofina en el pez cebra.

#### 1.4.3. Rol de la neurotrofina BDNF en el pez cebra.

Durante estadios embrionarios y adultos del pez cebra, el sistema BDNF/TrkB promueve el desarrollo, mantención y la plasticidad de diferentes subpoblaciones neuronales del SNC y SNP.

En cuanto a su expresión, esta neurotrofina se ha detectado desde las 24 hpf en la notocorda, miótomos, y en células epiteliales y endoteliales (Huynh y Henrich, 2001) y en estadios mas avanzados de desarrollo (4 dpf) en el cerebro, vesícula ótica, aleta pectoral y en el ojo. En esta última estructura se ha detectado la expresión de BDNF y su receptor TrkB en aquellas capas retinales que concentran los fotorreceptores (Germaná *et al.*, 2010a). Estos sitios de expresión sugieren que BDNF promueve el desarrollo del sistema nervioso en estadios larvales (Hashimoto y Henrich, 1997). Por otra parte, y en esta misma etapa del desarrollo, se ha detectado su expresión en el revestimiento celular, arcos branquiales y cartílagos mandibulares, indicando que esta neurotrofina también participa de la estructuración del sistema cráneo-facial. (Diekmann *et al.*, 2009).

En el sistema de la LLP la expresión de BDNF y TrkB se ha detectado en las células ciliadas de los neuromastos (Germaná *et al.*, 2010b). Por otra parte, estudios en larvas de 3dpf han demostrado que BDNF es capaz de ser liberado por neuronas pre y post-sinápticas que conforman el nervio de la LLP (Mo y Nicolson, 2011).



En resumen, el pez cebra presenta múltiples ventajas para la visualización de sus tejidos debido a su transparencia en los primeros estadios de desarrollo. Por otro lado, la aplicación de herramientas moleculares han logrado generar una gama de líneas transgénicas que expresan proteínas fluorescentes en tejidos específicos y otras que permiten silenciar genes en distintos estadios de desarrollo.

Estas ventajas permiten monitorear en larvas de pez cebra la regeneración axonal *in vivo* en un tiempo reducido, así como la expresión génica de las moléculas que benefician o retardan este proceso. Por otra parte, dada la convergencia funcional con los vertebrados superiores, estos análisis otorgan datos biológicamente relevantes para la caracterización de los fenómenos asociados a la regeneración.

Por lo tanto, y de acuerdo a los antecedentes y las herramientas experimentales disponibles en nuestro laboratorio, surge la iniciativa de caracterizar el rol de la neurotrofina BDNF durante la regeneración del nervio de la LLP en larvas de pez cebra, monitoreando el proceso *in vivo*, de manera poco invasiva e indagando sobre el rol de esta neurotrofina durante la regeneración del SNP.

### **1.5. Hipótesis:**

La regeneración del nervio de la LLP en larvas de pez cebra depende de la neurotrofina BDNF.

### **1.6. Objetivo Principal:**

Evaluar la participación de la neurotrofina BDNF durante el proceso de regeneración del nervio de la LLP en larvas del pez cebra.

### **1.7. Objetivos específicos:**

1. Establecer un protocolo de axotomía reproducible en el nervio de la LLP.
2. Caracterizar el proceso de regeneración del nervio de la LLP luego de la electroablación.
3. Identificar la expresión de la neurotrofina *BDNF* en el miosepto horizontal durante la regeneración del nervio de la LLP.
4. Cuantificar en larvas totales de pez cebra los niveles de transcritos de *BDNF* durante la regeneración del nervio de la LLP.
5. Determinar si la pérdida de función de la neurotrofina BDNF afecta la regeneración del nervio de la LLP.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Modelo biológico y mantención.

Como modelo biológico se utilizaron larvas del pez cebra (*Danio rerio*) de 72 hpf, etapa en que presentan un completo desarrollo estructural y funcional de la LLP (Ghysen y Dambly-Chaudière, 2007). En esta tesis, los estudios se realizaron con dos cepas transgénicas: Tg:(*neuroD::GFP*), que expresa la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el control de la región regulatoria del gen *neuroD* en los axones de la LLP (Obholzer *et al.*, 2008), y Tg:(*LysC::dsRed*) que dirige la expresión de la proteína fluorescente roja (RFP) mieloide-específica de los leucocitos bajo la región regulatoria del gen *lysC* que dirige la expresión de RFP (Hall *et al.*, 2007).

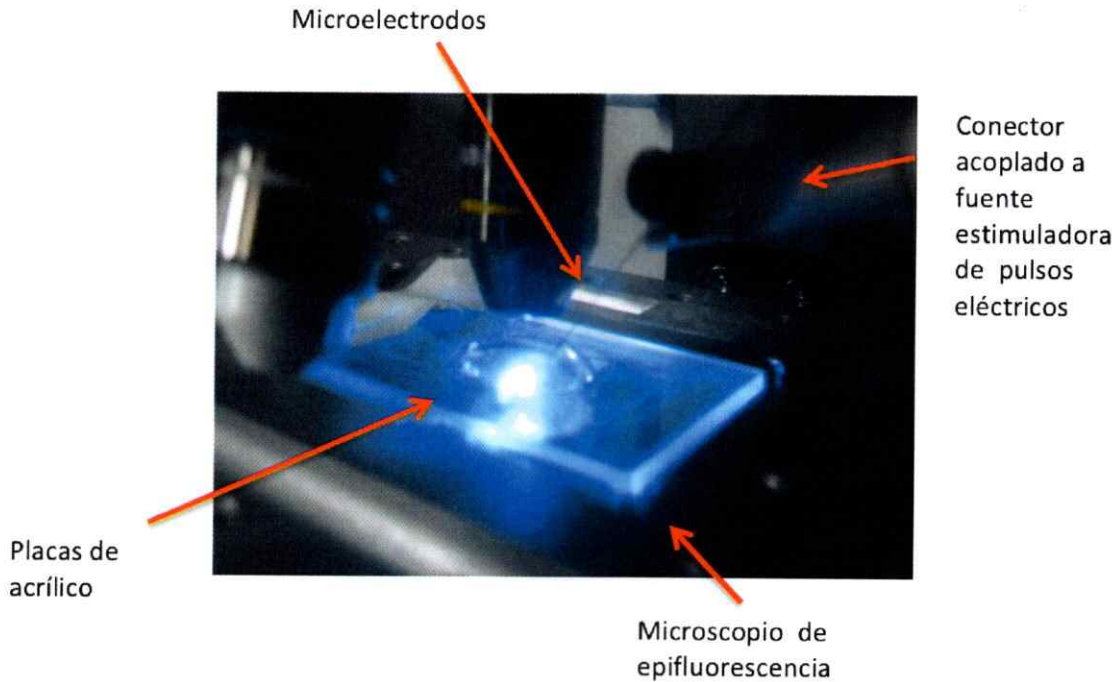
Las larvas se incubaron en medio E3 con PTU al 3% desde las 24 hpf para inhibir la formación de pigmentos en la superficie corporal.

Los peces adultos fueron mantenidos a 28,5°C, bajo un ciclo circadiano de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad en agua de sistema (60 mg Instant Ocean/L, pH 7.0) y las larvas fueron mantenidas en medio E3 (5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,3 mM MgSO<sub>4</sub>, y azul de metileno 0,1%). Las condiciones de mantención, cuidado y reproducción se realizaron de acuerdo a lo descrito por Rheinard (1994).

### 2.2. Electroablación del nervio de la LLP con microelectrodos de tungsteno.

Las larvas transgénicas que expresaban GFP en el nervio de la LLP fueron anestesiadas y montadas en placas de acrílico rectangulares (10.7 cm de largo x 7 cm

de ancho) con agarosa de bajo punto de fusión al 1% (Winkler) con un orificio central que fue cubierto por un cubreobjeto largo ( Figura 5).



**Figura 5. Sistema de electroablación del nervio de la LLP de larvas de pez cebra.** El sistema permite la electroablación del nervio de la LLP. Los principales constituyentes del sistema son la fuente estimuladora de pulsos eléctricos, microelectrodos de tungsteno, microscopio de epifluorescencia y placas de acrílico en donde se posicionaban las larvas de pez cebra para su posterior electroablación.

El sistema ideado para la electroablación del nervio de la LLP estaba conformado por un microscopio de epifluorescencia de platina invertida (Olympus, BX51W1) acoplado a una fuente estimuladora de pulsos de corriente (A-M system, Modelo 2100) y un micromanipulador de 3 ejes acoplado a un conector que sostenía los microelectrodos de tungsteno utilizados.

En la porción comprendida entre el ganglio y el primer neuromasto de la LLP (Ghysen y Damby-Chaudière, 2007) se realizó la electroablación del nervio por la aplicación de un pulso de corriente de 70 microamperes ( $\mu\text{Amp}$ ) de intensidad por 1 segundo con

microelectrodos de tungsteno (#Catálogo:UEWMGGSEBN1M, FHC). Aquellos peces que se flectaron abruptamente producto del daño fueron descartados de los análisis.

Posterior al daño, y hasta el día 10 post fertilización, se midió la viabilidad de los peces y su comportamiento natatorio. En este último punto, se estimuló con flujo de agua continuo 3 veces por 5-10 segundos por el lado dañado y se observó si existió alguna anomalía en el desplazamiento natatorio de los peces. Estos parámetros fueron evaluados en base a la sospecha de que la electroablación podría afectar funciones básicas de los peces, como la natación y sobrevivencia.

Para descartar la incidencia de los pulsos de corriente sobre la expresión de la neurotrofina en los análisis de hibridación *in situ* y PCR cuantitativo (q PCR), las larvas fueron dañadas por electroablación en la porción media del cuerpo, a la altura del ano y por sobre el nervio de la LLP.

### **2.3. Caracterización del daño celular post-electroablación del nervio de la LLP.**

Para evaluar el daño celular, las larvas lesionadas de la línea Tg: (*neuroD::GFP*) fueron teñidas con el colorante vital anaranjado de acridina (Sigma) a concentración final 5 µg/ml por 7 minutos a 28°C; se realizaron 3 lavados por 10 minutos en solución E3 y se fotografió el área dañada por microscopía confocal (Zeiss, Axiovert 200M) con objetivo 20x, para posteriormente medir el diámetro del espacio entre ambos extremos del nervio cauterizado.

## 2.4. Detección de la expresión de mRNA de *BDNF* por hibridación *in situ*.

### 2.4.1. Construcción de sondas para la detección de la expresión de *BDNF*.

Para la síntesis de la sonda antisentido se digirió el clon que contiene el cDNA completo de *BDNF* (Clone id: 6797983, Open Biosystems) con la enzima *SacI* (Fermentas) bajo condiciones sugeridas por el fabricante.

La síntesis de la sonda se desarrolló usando la siguiente mezcla: 1 µg de clon *BDNF* linearizado, 4 µl de buffer de transcripción 5X (Fermentas), 1µl de RNAsin (Promega), 2 µl de DTT 0.1M (Biocompare), 1.2 µl de ATP 10 mM, 1.2 µl de GTP 10 mM, 1.2 µl de CTP 10 mM, 0.8 µl de UTP 10 mM, 0.5 µl de Digo-U (Roche), 1.5 µl de T7 Polimerasa (Fermentas) y llevar a volumen final de 20 µl de reacción con agua nanopura. Para la síntesis de la sonda sentido, se utilizó la polimerasa SP6 (Fermentas).

La mezcla se llevó a 37 °C durante 4 horas. Posteriormente se agregó 1 µl de DNAsa durante 30 minutos a 37°C. La precipitación de la sonda se obtuvo agregando 60 µl de agua nanopura, 10 µl de Cloruro de Litio 4M, y 250 µl de etanol absoluto. Finalmente la sonda se precipitó a -80°C toda la noche.

El precipitado se centrifugó a 14000 rpm a 4°C durante 20 minutos para la obtención del precipitado de RNA. El precipitado se lavó con 500 µl de etanol al 70% y se centrifugó a 14000 rpm a 4°C durante 20 minutos. El precipitado obtenido fue disuelto en agua nanopura y se adicionaron 0.5 µl de RNAsin. Adicionalmente, y para descartar

completamente la presencia de nucleótidos y sales inespecíficas, la sonda fue pasada por columnas de purificación de RNA (OMEGA).

Para visualizar la sonda y determinar la calidad de la misma, se corrió un gel de agarosa al 1% a 80 V durante 30 minutos. Las muestras fueron calentadas por 15 minutos a 70°C antes de correr el gel. La intensidad de la banda de la sonda determinó el volumen de resuspensión en el buffer de hibridación (HB). (Stock: 25 ml formaldehído 50%, 12.5 ml buffer SSC 20X (Winkler), 50 µl heparina 50mg/ml, 25 mg de tRNA, 50 µl de Tween 0.1% (Winkler), 460 µl de ácido cítrico 10 M y 12 ml de agua libre de nucleasas).

#### 2.4.2. Hibridación in situ contra BDNF.

Para determinar los lugares específicos de la expresión del mRNA de la neurotrofina, larvas Tg:(*neuroD::GFP*) de 72 hpf fueron fijadas luego de 3, 6, 9 y 12 hpd en paraformaldehído (PFA) al 4% por toda la noche a 4°C. Luego de la fijación, se hicieron dos lavados en PBST (Stock: 50 ml de PBS 1X, 500 µl de Tween 10X) por 5 minutos y las muestras se mantuvieron en metanol al 100% por 30 minutos. Para la rehidratación de las muestras se realizaron lavados a concentraciones decrecientes de metanol al 75%, 50% y 25% en PBST, cada uno de ellos por 5 minutos. Luego se realizaron cuatro lavados con PBST por 5 minutos. Las muestras fueron permeabilizadas por la incubación en Proteinasa K (10 µg/ml) en PBST por 25 minutos y se fijaron nuevamente en PFA por 20 minutos. Se realizaron 4 lavados con PBST por 5 minutos. Todas las condiciones antes descritas se desarrollaron a temperatura ambiente. Luego se agregó a cada muestra 700 µl de buffer HB y se incubaron por 5 horas a 70° C. Se descartó el HB y se reemplazó por 200 µl de sonda (30-50 ng de RNA) y se incubó

toda la noche a 70°C. Al día siguiente, se reemplazó la sonda por concentraciones crecientes de buffer SSC 2X al 25%, 50% , 75% y 100 % en HB por 10 minutos, siguiendo con el lavado de las muestras 2 veces por 30 minutos en buffer SSC 0.2X. La temperatura para las condiciones descritas fue de 70°C. Posteriormente, las muestras fueron incubadas en concentraciones crecientes de PBST al 25%, 50%, 75% y 100 % en buffer SSC 0.2X por 10 minutos, siguiendo con la incubación por 4 horas en buffer de bloqueo (BH) (Stock: 500 µl BSA, 50µl DMSO, 5 ml PBST) a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se incubaron con el anticuerpo Anti Digoxigenin-AP Fab fragments (1:10000) (Roche) en BH a 4°C por toda la noche en agitación orbital a 40 rpm. Al día siguiente, se descartó el anticuerpo de las distintas muestras y los embriones se lavaron 6 veces en PBST por 15 minutos. Se realizó un lavado breve con buffer fosfatasa alcalina (AP) (Stock: 500 µl de Tris 1 M pH 9.5, 250 µl NaCl 1M, 10µl Tween 20 (Winkler), 3.75 ml agua nanopura ) y posteriormente se realizaron 3 lavados con el mismo buffer en agitación orbital suave a 40 rpm por 15 minutos. Se descartó el buffer y se reemplazó con solución de tinción NBT/BCIP Stock solution (Roche). Se mantuvo en oscuridad y se observó periódicamente hasta obtener la tinción deseada. Se descartó la solución de tinción y se lavó con solución de detención de la reacción (50 ml Tris-HCl (pH 7.5 ), 0.75 g KCl, 10 ml Tween 20 al 100% , 8.8 g NaCl y ajustar a 1000 ml con agua MiliQ) 3 veces por 15 minutos en agitación suave. Todas las condiciones descritas se realizaron a temperatura ambiente.

Las fotografías se tomaron en fase campo claro en lupa (Olympus, modelo MVX10; Aumento 2.5X ).



## 2.5. Determinación de la expresión de *BDNF* por RT-PCR y PCR cuantitativo (qPCR).

### 2.5.1. Extracción de RNA total.

Se extrajo el RNA total de 25 larvas Tg:(*neuroD::GFP*) de 72 hpf a las 3, 6, 9 y 12 hpd utilizando el reactivo comercial Trizol ( Trizol Reagent, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para la homogenización de las muestras se agregaron 100 µl de Trizol a las larvas y se maceraron en tubos eppendorf con una paleta plástica por 5 minutos a 4°C. Las muestras se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó a cada muestra 20 µl de cloroformo y se agitó e incubó por 3 minutos a temperatura ambiente. Los distintos tratamientos fueron centrifugados a 12000g por 15 minutos a 4° C. De cada muestra se recuperó la fase acuosa que contenía el RNA y se adicionaron 50 µl de isopropanol, se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g por 10 minutos a 4°C. Se descartaron los sobrenadantes y los precipitados se lavaron con 500 µl de etanol al 75%, se agitaron y centrifugaron a 7500 g por 5 minutos a 4°C. Los precipitados se secaron y resuspendieron en 20 µl de agua libre de RNAsas y se incubaron por 10 minutos a 55° C. Las muestras obtenidas fueron almacenadas a -20°C.

### 2.5.2. Obtención de cDNA y análisis de la expresión de la neurotrofina *BDNF* por RT-PCR.

Se cuantificó la cantidad total del RNA de las distintas muestras a 260 nm (Nanophotometer IMPLLEN) utilizando FD 50. Los análisis de las bandas de RNA ribosomal comprobaron la integridad del contenido total de RNA. Para la obtención de los

cDNAs y posterior RT-PCR se utilizó el kit comercial ImProm-II Reverse Transcription System (Promega) de acuerdo a instrucciones del fabricante en un termociclador (Thermocycler 2720, Applied Biosystems).

Para la retrotranscripción de las distintas muestras de RNA se utilizaron 2.5 µg de la muestra total de RNA y para el RT PCR se cargó 1 µl de la muestra templado.

Las incubaciones para la obtención de los distintos cDNAs fueron correlativamente de 25°C por 5 minutos, 42°C por 60 min. y 72 °C por 15 min.

Se evaluaron los niveles de β-actina en los distintos tratamientos para comprobar la expresión específica de BDNF luego de la axotomía en el nervio de la línea lateral.

La secuencia de los partidores utilizados contra BDNF y β-actina fueron:

BDNF: F5' AACCATGCAATTTCCACCAT 3' ; R 5' GGCATACAGGTCAACGTCCT 3'

β-actina: F5' CCCAGACATCAGGGAGTGAT3'; R 5' TCTCTGTTGGCTTTGGGATT 3'

Las condiciones para el RT-PCR de las distintas muestras siguieron la siguiente secuencia: 95°C por 5 minutos, para luego desarrollar los 25 ciclos de amplificación a 94 °C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos y 72 °C por 2 minutos; 72° C por 7 minutos y llevando el término de la reacción a 4° C. Se utilizó el mismo número de ciclos para evaluar la expresión de la neurotrofina y β-actina. Las muestras fueron analizadas en geles de agarosa de alto punto de fusión al 1% y el gel fue corrido a 100 mV por 45 minutos. El patrón de peso molecular utilizado fue de 1 kB (Winkler).

### 2.5.3. Análisis de la expresión de la neurotrofina BDNF por qPCR.

Se midió la expresión de BDNF y  $\beta$ -actina de las muestras a las mismas hpd que el RT-PCR utilizando el kit SYBR green (BIOLINE) bajo instrucciones del fabricante. Se realizaron 30 ciclos de amplificación con las mismas temperaturas para *annealing* y extensión que el RT-PCR. Las condiciones para establecer las curvas de disociación del fluoróforo con los productos amplificados fueron de 10'' por 95°C, 5'' por 25 °C, 1'' por 70 °C y 1'' por 95°C (Stratagene, MX 3000P). Para el procesamiento de los datos se utilizó el software Maxi. Para la cuantificación de la expresión relativa de BDNF en relación a los tratamientos control se utilizó el método  $\Delta$ CT (Schmittgen y Livak, 2008).

## 2.6. Ensayos de pérdida de función.

### 2.6.1. Microinyección del morfolino contra los mensajeros de BDNF.

Para la microinyección de embriones se usó una placa de Petri con medio E3 para posicionarlos. Los embriones en estadio de una célula fueron ordenados en 3 filas paralelas en el borde de un portaobjeto.

Para inhibir la expresión de la neurotrofina, se inyectaron 10 nl del morfolino antisentido contra la región 5' que incluye el ATG de BDNF (5'-TGTTGGAAGTGGAGACAGCAAAGG-3', Gene Tools) a (15 $\mu$ M). El morfolino control *mismatch* (5'TGATCGAAGTGGACAACCAAAGG 3', Gene Tools) se inyectó bajo las mismas condiciones de volumen y concentración anteriores.

## 2.6.2. Análisis de la expresión de la proteína BDNF por "Western Blotting".

### 2.6.2.1. Extracción de vitelo.

200 larvas Tg:(*neuroD::GFP*) de 72 hpf de condición control, control *mismatch* y morfantes para BDNF fueron transferidas a la solución Ringer libre de calcio (116 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 5 mM HEPES, pH7.2) suplementadas con EDTA 0.3 mM y PMSF 1mM. En este paso, se removió el vitelo mediante la punción de la porción ventral de las larvas con pinzas. Con el objetivo de eliminar los restos de la sustancia lipídica, las larvas fueron traspasadas a un tubo eppendorf con solución Ringer fría y fueron lavadas 3 veces por 5 minutos. Luego, las larvas fueron traspasadas a un tubo estéril y congeladas en nitrógeno líquido. Las muestras fueron guardadas a -80°C.

### 2.6.2.2. Extracción de proteínas totales.

Las 200 larvas fueron resuspendidas en buffer de extracción de proteínas (1 ml de Tris 0.1M , 1 µl de leupeptina 10 µM, 1 µl de pepstatina 10 µM y 10 µl de PMSF 1mM.) La muestra fue homogenizada en buffer de extracción y se centrifugó a 14.000 rpm por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y las muestras se guardaron a -20°C.

### 2.6.2.3. Inmunodetección de la proteína BDNF.

La cuantificación total de proteínas se desarrolló por el método de Bradford. Luego, se cargaron 30 µg de cada muestra en un gel de acrilamida al 15% (Gel separador: 1.1 ml de Agua destilada, 2.5 ml de Mix Acrilamida 30%, 1.3 ml de Tris 1.5 M (pH: 8.8), 50 µl de SDS 10%, 50 µl de Persulfato de Amonio al 10% y 2 µl de TEMED; Gel Concentrador:

680  $\mu$ l de agua destilada, 170 $\mu$ l de Mix Acrilamida 30%, 130  $\mu$ l de Tris 1.5 M (pH: 6.8), 10  $\mu$ l de SDS 10%, 10  $\mu$ l de Persulfato de Amonio al 10% y 1  $\mu$ l de TEMED ) y el gel fue corrido para la migración de las proteínas por 15 minutos a 80 mV y posteriormente por 2 horas a 120 mV. El primer bolsillo fue cargado con 2  $\mu$ l del patrón de peso molecular (Page Ruler Plus Prestained, Fermentas).

La transferencia de las proteínas se efectuó en membranas de nitrocelulosa (Protran) en cámaras de transferencia húmeda (Biorad) por 45 minutos a 130 mV. Para corroborar la correcta transferencia de las proteínas, las membranas fueron incubadas por 10 minutos en solución rojo Ponceau y lavadas 3 veces por 10 minutos con solución Tris Buffer Salino Tween (TTBS) al 0.1% (0.05M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, Tween al 1%). Las membranas fueron bloqueadas por 2 horas en suero bovin albumina (BSA) (Winkler) al 5% e incubadas con el anticuerpo policlonal de conejo contra la secuencia amino-terminal de BDNF de ratón (Secuencia H<sub>2</sub>N-HSDPARRGELCOOH, Chemicon) a dilución 1:500 a 4° C. Al día siguiente se lavó con solución TTBS 4 veces por 10 minutos e incubó con anticuerpo secundario (Goat-AntiMouse IgG Peroxidase conjugate, Calbiochem) (1:1000) por dos horas a temperatura ambiente. Posterior a la incubación se realizaron tres lavados con TTBS por 10 minutos a temperatura ambiente. Todos los lavados fueron con agitación orbital. Como control de carga se evaluaron los niveles de  $\beta$ -actina en cada uno de los tratamientos evaluados (C4, Santa Cruz).

El revelado se desarrolló incubando la membrana por 1 minuto con el Kit Pierce Western Blotting Substrate bajo condiciones indicadas por el fabricante.

## RESULTADOS

**Objetivo 1:** *Establecer un protocolo de axotomía reproducible en el nervio de la LLP.*

### 3.1. Electroablación en larvas de pez cebra.

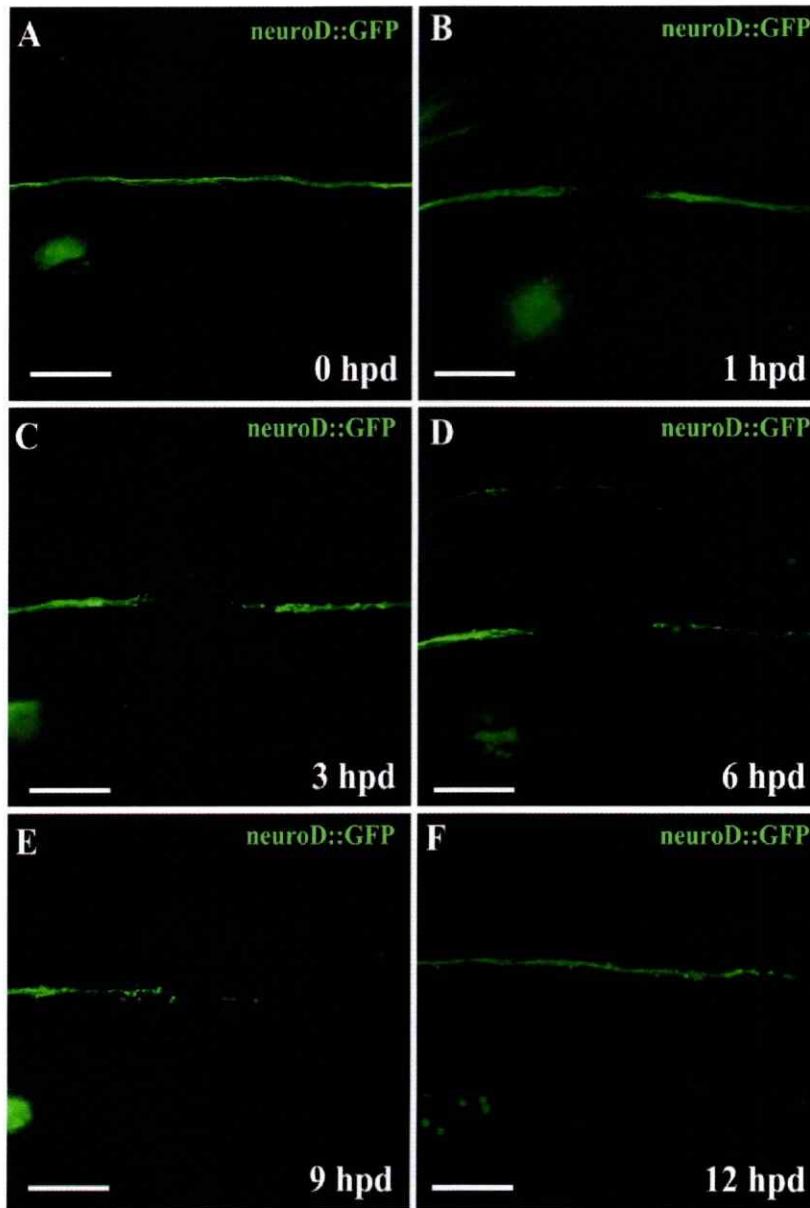
Para caracterizar los procesos de regeneración post lesión de axones sensoriales fue necesario estandarizar un protocolo reproducible de axotomía en los axones de la LLP. Esta reproducibilidad se logró mediante la aplicación de pulsos de corriente con microelectrodos de tungsteno en la porción comprendida entre el ganglio y el primer neuromasto de la LLP, denominando a esta novedosa técnica “electroablación”. Esta metodología experimental transmitió correctamente los pulsos de corriente hacia el nervio de la LLP, no perturbó la integridad corporal de las larvas y permitió lesionar una gran cantidad de individuos en un periodo reducido de tiempo. Referencialmente, en una hora se alcanzó a dañar 45 larvas. Las condiciones de daño para la electroablación del nervio de la LLP se fijaron en la aplicación de un pulso de corriente de 70  $\mu$ Amp/s. Amperajes menores no lograron la completa disrupción del nervio de la LLP y aquellos que sobrepasaron la frecuencia establecida ocasionaron un daño mayor.

El daño ocasionado en las capas celulares se estudió mediante la tinción de las larvas con anaranjado de acridina inmediatamente posterior a la electroablación. Esta técnica demostró que el daño celular se localizó específicamente en el sitio lesionado. Al mismo tiempo se

observó la perturbación de la morfología de las zonas afectadas por el pulso eléctrico (Figura Suplementaria 1).

Por otra parte, el espacio que resultó luego de la electroablación del nervio de la LLP se cuantificó en la porción cauterizada, alcanzando un diámetro de 85  $\mu\text{m}$ . Para comprobar si la electroablación generó efectos perjudiciales en el desarrollo posterior de las larvas se efectuaron dos análisis. Estos consistieron en la medición de la viabilidad y evaluación del comportamiento natatorio hasta los 10 días post-fertilización (dpf). La viabilidad de los peces hasta este día no varió en relación a la condición control, alcanzando el 90% (n=30). Para evaluar el comportamiento natatorio, se estimuló el costado dañado con flujo de agua constante y se monitoreó si las larvas presentaban desplazamientos anormales (ej: natación de costado, retardo para responder a la estimulación, ausencia de natación), situación no apreciada en ninguna de las larvas (Tabla 1).

La aplicación de la electroablación en el nervio de la LLP de larvas de pez cebra permitió monitorear *in vivo* las fases de degeneración y regeneración de este tejido. Posterior a la aplicación de los pulsos eléctricos se observaron los eventos de fragmentación del nervio de la LLP y la remoción de los restos celulares, que son eventos correspondientes a la fase de la degeneración Walleriana (Gaudet *et al.*, 2011). La observación de estos eventos culminó entre las 7 y las 8 hpd. Posterior a esta etapa, se visualizó el crecimiento de las neuritas a lo largo del miosepto horizontal, completándose la regeneración del nervio entre las 21 y 22 hpd (Figura 6).



**Figura 6. Degeneración y regeneración del nervio de la LLP en larvas de pez cebra.** La electroablación del nervio de la LLP permitió monitorear los procesos de degeneración y regeneración. (A) Las larvas con la marca transgénica *neuroD::GFP* expresan la proteína fluorescente verde (GFP) en el nervio de la LLP. (B) La aplicación de los pulsos de corriente permitió la electroablación de una parte del nervio de la LLP. (C) Las proyecciones neuríticas que regeneran se detectan desde las 3 hpd. También en este periodo comienza la fragmentación de los nervios distales. (D) A las 6 hpd las neuritas que están regenerando presentan mayor definición y los fragmentos degenerados son menos evidentes en relación al periodo anterior (E) A las 9 hpd el nervio que esta regenerando comienza a desplazarse a lo largo del miosepto horizontal (F) A las 12 hpd el nervio regenerado de la LLP alcanza aproximadamente el tercer neuromasto de la LLP. (Aumento: 20X; Barra de Tamaño: 100  $\mu\text{m}$ ; Abreviaciones: hpd: horas post-daño).



**Tabla 1. Efectos del daño por electroablación en larvas de pez cebra.**

|  | 3 dpf      | 4 dpf | 5 dpf | 6 dpf | 7 dpf | 8 dpf | 9 dpf | 10 dpf |
|--|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| Viabilidad post-axotomía (%) (n=30)        | 100        | 100   | 100   | 100   | 93.3  | 93.3  | 90    | 90     |
| Comportamiento natatorio normal (%) (n=30) | 100        | 100   | 100   | 100   | 100   | 100   | 100   | 100    |
| Diámetro de la región cauterizada (n=16)   | 85 $\mu$ m | sda   | sda   | sda   | sda   | sda   | sda   | sda    |
| Tejidos dañados (n=16)                     | P y B      | sda   | sda   | sda   | sda   | sda   | sda   | sda    |

**Tabla 1. Caracterización de los efectos post-electroablación en larvas de pez cebra.** Las electroablaciones no afectaron la viabilidad, ni comportamiento natatorio de los peces. La porción cauterizada del nervio de la LLP alcanzó los 85  $\mu$ m de diámetro. Las capas celulares que probablemente se perturbaron por el daño fueron la capa peridérmica y la capa basal. Aquellos peces que se flectaron abruptamente luego del daño fueron descartados, pues fue indicador de que las capas celulares mas profundas, que alojaban a los miotomos, estaban siendo afectadas. (Abreviaciones: P: capa peridérmica; B: capa basal; sda: sin daño aparente).

**Objetivo 2: Caracterizar el proceso de regeneración del nervio de la LLP luego de la electroablación.**

### **3.2. Análisis de las velocidades de regeneración del nervio de la LLP en larvas de pez cebra post-electroablación.**

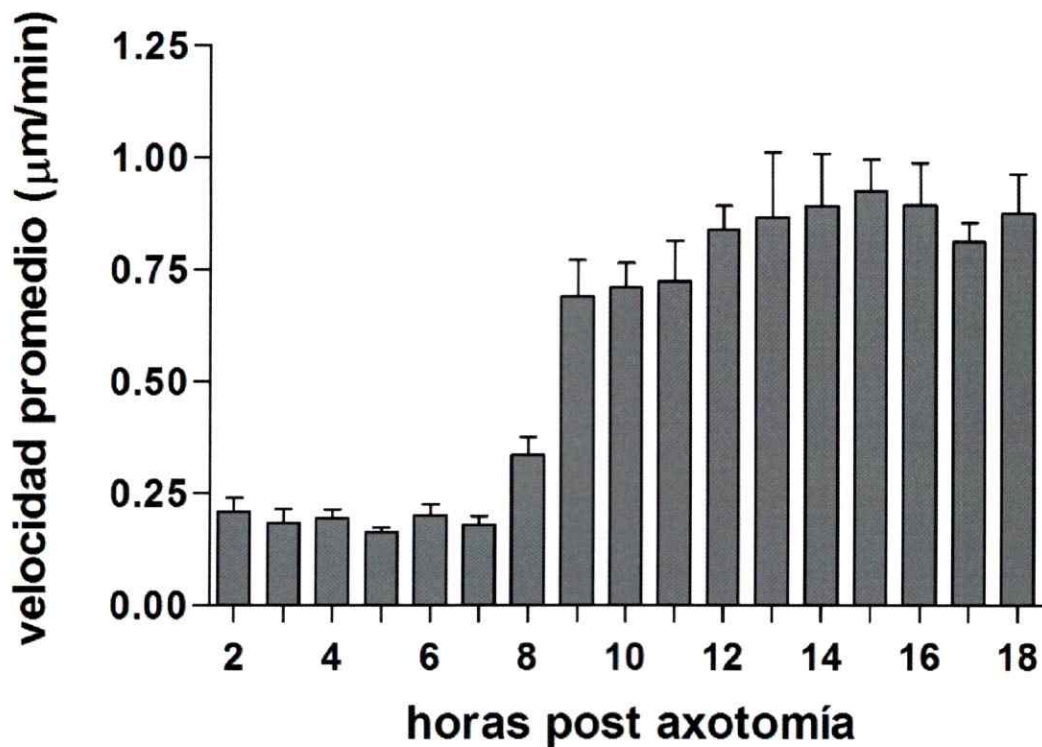
Posterior a la electroablación del nervio de la LLP, se caracterizó la regeneración *in vivo* de este tejido. Para ello se utilizó la técnica de microscopía de epifluorescencia “*time-lapse*”, tomando fotografías de las larvas desde el sitio lesionado hacia la porción caudal de la larva.

Para determinar las velocidades de regeneración, se tomaron fotografías cada una hora hasta las 18 hpd. Posteriormente, las fotografías fueron analizadas y procesadas en el programa *ImageJ (Plug In: Manual Tracking)*. La medición de la velocidad de cada tramo se analizó marcando la proyección más distal de las neuritas que estaban regenerando. Cuando existió más de una proyección, se consideró el valor promedio de las proyecciones totales.

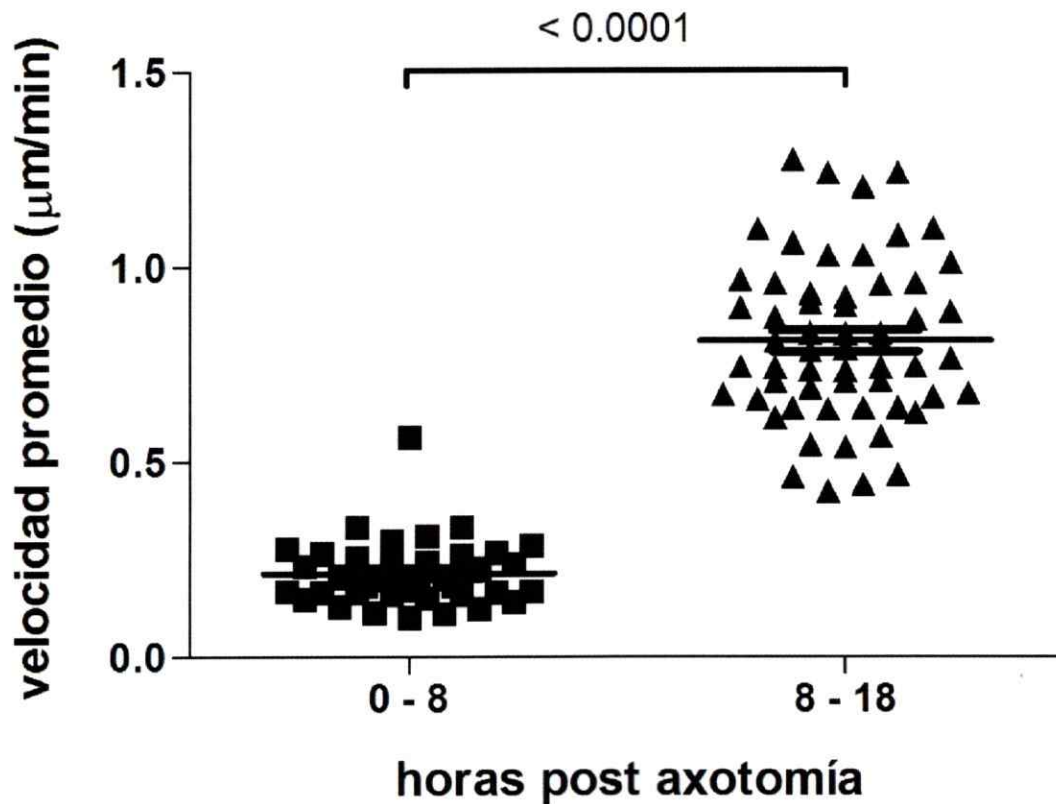
El análisis estadístico por la prueba *t de Student* distinguió dos fases de velocidades de regeneración del nervio de la LLP. Una ubicada entre las 1 y las 8 hpd, que se denominó fase lenta de regeneración y otra comprendida entre las 9 y 18 hpd, que se designó fase rápida de regeneración (Figura 8).

Debido a la apariencia sigmoidea de la curva cuando se graficaron todas las mediciones (Figura 7), se efectuó el análisis estadístico de correlación no lineal para comprobar si la curva describía este comportamiento. El valor de este índice ( $R^2=0.9744$ ) sugiere el comportamiento sigmoideo y detecta la existencia de una tercera fase de regeneración que se

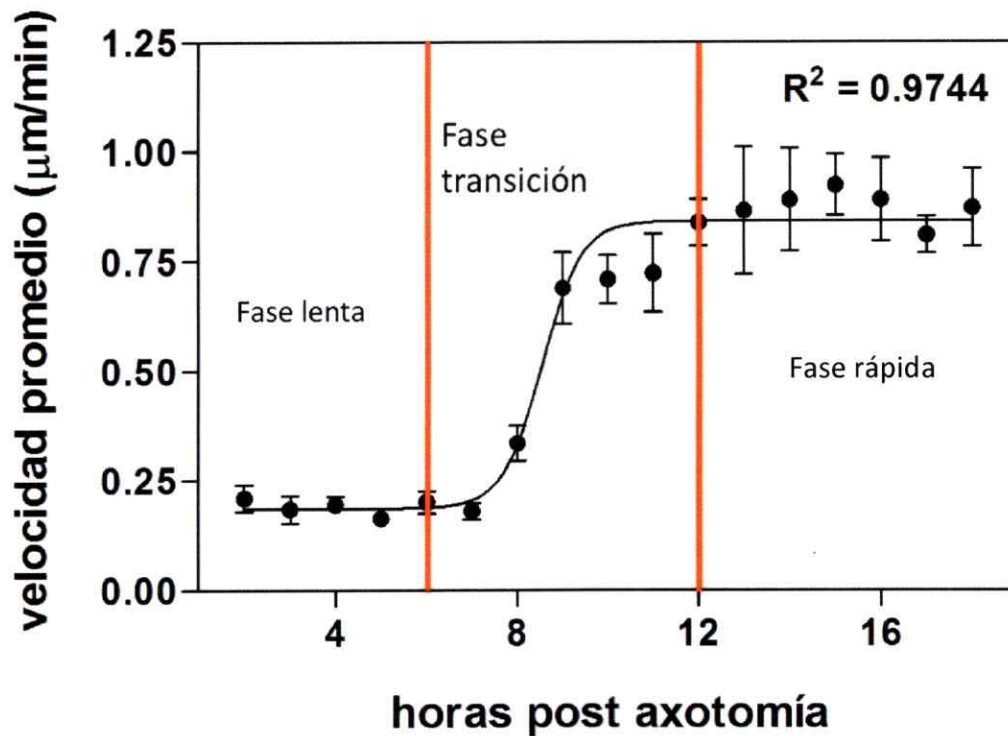
denominó fase de transición. Esta fase se ubicó entre las 6 y las 12 hpd. En base a esta descripción, la primera fase de regeneración ocurre entre las 0 y 6 hpd, donde las velocidades de regeneración fueron lentas y constantes. La segunda fase se comporta como una fase de transición (zona de inflexión de la curva sigmoidea), manteniéndose el aumento gradual de las velocidades de regeneración desde las 6 hasta las 12 hpd, e incluyendo velocidades correspondientes a la fase lenta y fase rápida de regeneración para distintas larvas. Entre los tramos de 7-8 y 8-9 hpd se obtuvo la mayor diferencia de las velocidades de regeneración entre los distintos tramos ( $\sim 0.350 \mu\text{m}/\text{min}$ ). Finalmente, entre las 12 y 18 hpd las velocidades corresponden a la fase rápida de regeneración y superan en promedio los  $0.7 \mu\text{m}/\text{minuto}$  (Figura 9).



**Figura 7. Caracterización de la regeneración del nervio de la LLP en larvas de pez cebra.** Velocidades de regeneración del nervio de la LLP durante las primeras 18 hpd. El eje “x” muestra las horas post-axotomía y el eje “y” las velocidades promedio de regeneración por cada tramo expresados en micrómetros por minuto regenerado ( $\mu\text{m}/\text{min}$ ). Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  error estándar ( $n= 7-9$  por tramo analizado).



**Figura 8. Distinción de las fases de regeneración del nervio de la LLP en larvas de pez cebra.** La totalidad de las mediciones realizadas se analizaron estadísticamente (*Test t de Student*) y se logró establecer la existencia de dos fases de regeneración. La fase de regeneración lenta, comprendida entre las 0 hpd y 8 hpd, y la fase rápida que abarca desde las 8 hpd hasta las 18 hpd. Los resultados se expresan como puntos de mediciones independientes y como promedio  $\pm$  error estándar.



**Figura 9. Caracterización del aumento exponencial de las velocidades de regeneración del nervio de la LLP en larvas de pez cebra.** Los análisis estadísticos de correlación no lineal ( $R^2=0.9744$ ) sugieren el comportamiento sigmoideo de la curva durante la regeneración del nervio de la LLP, en donde se distinguen 3 fases. La primera, ubicada entre las 0 y 6 hpd, presentó velocidades de regeneración lentas y constantes, y se denominó "fase lenta de regeneración". La fase de transición de la curva se asignó al período comprendido desde las 6 a las 12 hpd. Finalmente, la fase de crecimiento rápido del nervio se estableció desde las 12 hasta las 18 hpd. Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  error estándar. ( $n = 7$  a  $9$  individuos por cada tramo).

**Objetivo 3: Identificar la expresión de la neurotrofina BDNF en el miosepto horizontal durante la regeneración del nervio de la LLP.**

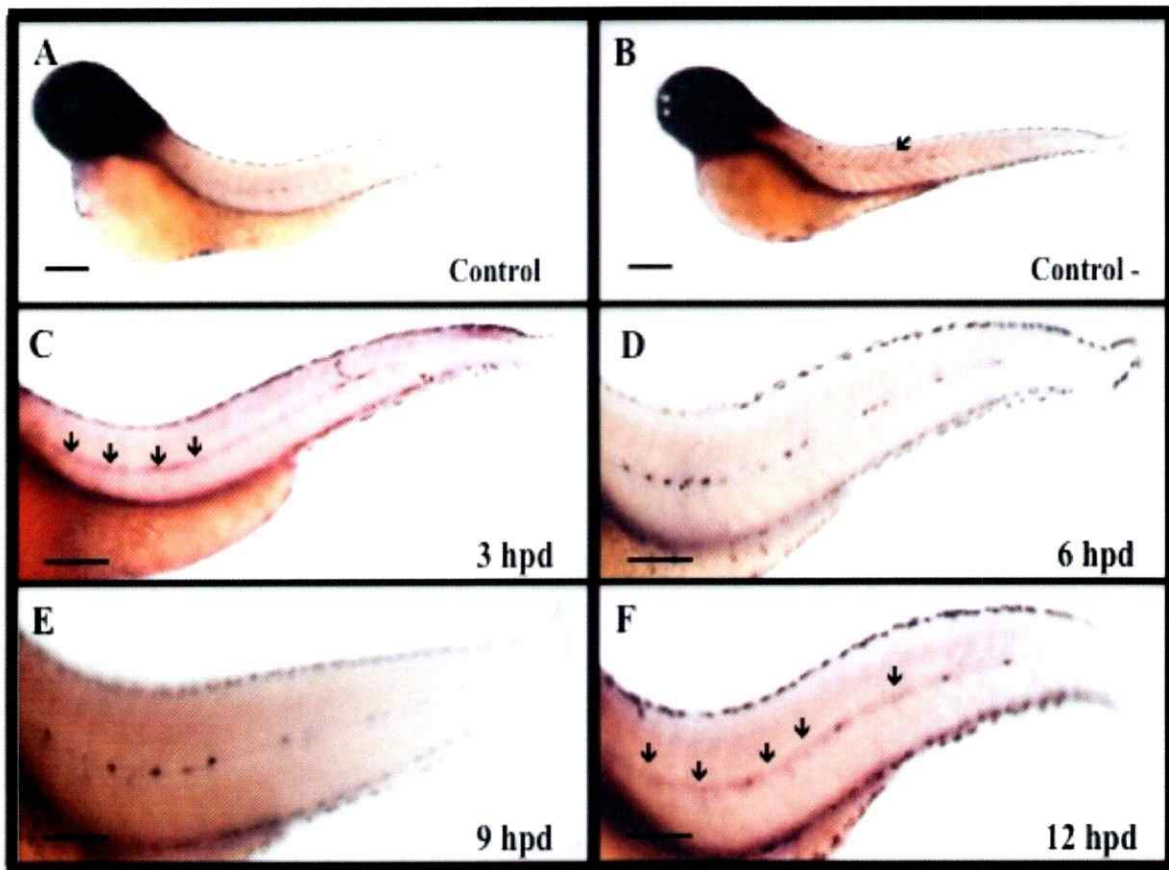
### **3.3. Detección de la expresión de BDNF por ensayos de hibridación *in situ*.**

Mediante hibridación *in situ* se detectó la expresión de mRNA de la neurotrofina BDNF en larvas de pez cebra a distintas hpd. En la condición control, la neurotrofina se expresó fuertemente en la porción cefálica de las larvas, principalmente en los ojos, cerebro y arcos faríngeos. (Figura 10A). El control desarrollado para descartar la incidencia del pulso eléctrico en la expresión de la neurotrofina se realizó efectuando el daño por sobre el nervio de la LLP, a la altura corporal del ano (ver flecha en figura 13B). En este tratamiento se mantuvo la marca detectada en la condición control.

En las larvas tratadas se detectó expresión de mRNA de BDNF en la porción cefálica, al igual que en animales control. Sin embargo, a las 3 hpd existió una débil expresión en el miosepto horizontal, en una zona cercana a la del daño (Figura 10C), mientras que a las 6 y 9 hpd la expresión de la neurotrofina se detectó únicamente en la porción cefálica (Figuras 10D y 10E). A las 12 hpd se detectó nuevamente la débil expresión de la neurotrofina en el miosepto horizontal, desde el sitio lesionado hasta aquel que alojaba el tercer o cuarto neuromasto de la LLP (Figura 10F).

Para establecer la expresión específica de la neurotrofina se realizaron 3 experimentos independientes y se analizaron mas de 15 peces por condición experimental (Figura Suplementaria 2).





**Figura 10. Detección de la expresión del mRNA de la neurotrofina BDNF a distintas hpd.** (A) Las larvas control muestran expresión de *BDNF* en la porción cefálica, destacándose en el cerebro, ojos y arcos faríngeos. (B) Peces lesionados en la porción superior al miosepto, a la altura del ano, no mostraron expresión diferencial en relación a la condición control (sitio indicado con la flecha) (C) A las 3 hpd, y adicionalmente a la marca presente en la porción cefálica, existió señal específica contra *BDNF* en el miosepto horizontal. (D y E) A las 6 y 9 hpd no existió diferencia de expresión en relación a la condición control. (F) A las 12 hpd se detectó expresión de la marca contra *BDNF* en el miosepto horizontal, desde el sitio dañado hasta la ubicación que aloja al tercer o cuarto neuromasto (Barra de tamaño: 100  $\mu\text{m}$ ).



**Objetivo 4: Cuantificar en larvas totales de pez cebra los niveles de transcritos de BDNF durante la regeneración del nervio de la LLP.**

### **3.4. Cuantificación de la expresión de la neurotrofina BDNF por qPCR en tiempos posteriores a la electroablación del nervio de la LLP.**

Una inquietud planteada posterior a la electroablación del nervio de la LLP, era si las moléculas que estaban asociadas a regeneración elevan su expresión luego del daño. En nuestra situación particular, nos centramos en la caracterización de la expresión de los niveles de mRNA de *BDNF* luego de la electroablación del nervio de la LLP durante las primeras 12 hpd a intervalos de tiempo de 3 horas.

Si bien es cierto, los análisis por RT-PCR (Figura suplementaria 3) demuestran diferencias de expresión en los peces dañados en relación a los controles, la cuantificación fue necesaria para desarrollar pruebas estadísticas que permitieran establecer algún grado de diferencia entre los distintos tiempos de tratamiento. Para obtener los valores de expresión, se realizaron análisis de expresión relativa de la neurotrofina por qPCR en larvas totales de acuerdo al método  $\Delta$  CT (Schmittgen y Livak, 2008).

La prueba estadística *t de Student* validó la utilización del gen control interno  *$\beta$ -actina* para cálculos y análisis propios de este método.

Los resultados obtenidos por el método utilizado no demostraron diferencias significativas en los niveles de expresión entre los tramos temporales, que iban desde las 0 hasta las 12 hpd a intervalos de 3 horas (Figura 11). Por lo tanto, no fue posible

establecer diferencias de los niveles de expresión de la neurotrofina en larvas totales de pez cebra a distintas hpd.

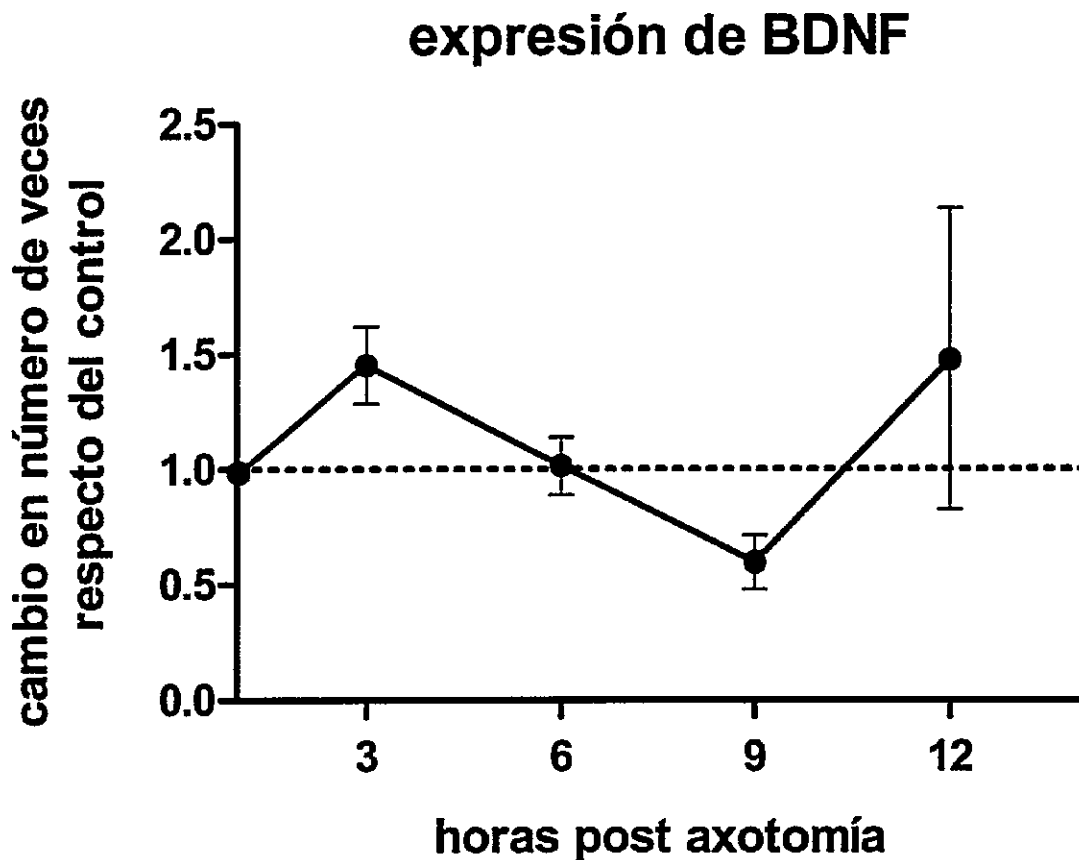


Figura 11. Análisis de la expresión de *BDNF* mediante qPCR (método  $\Delta$ CT) a distintas hpd. Posterior a la electroablación del nervio de la LLP, se evaluaron los niveles de expresión de BDNF por al método  $\Delta$ CT (Schmittgen y Livak, 2008). La ausencia de diferencias estadísticamente significativas impiden postular conclusiones biológicamente relevantes en cuanto a la expresión total de BDNF a distintas hpd. Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  error estándar.

**Objetivo 5: *Determinar si la pérdida de función de la neurotrofina BDNF afecta la regeneración del nervio de la LLP.***

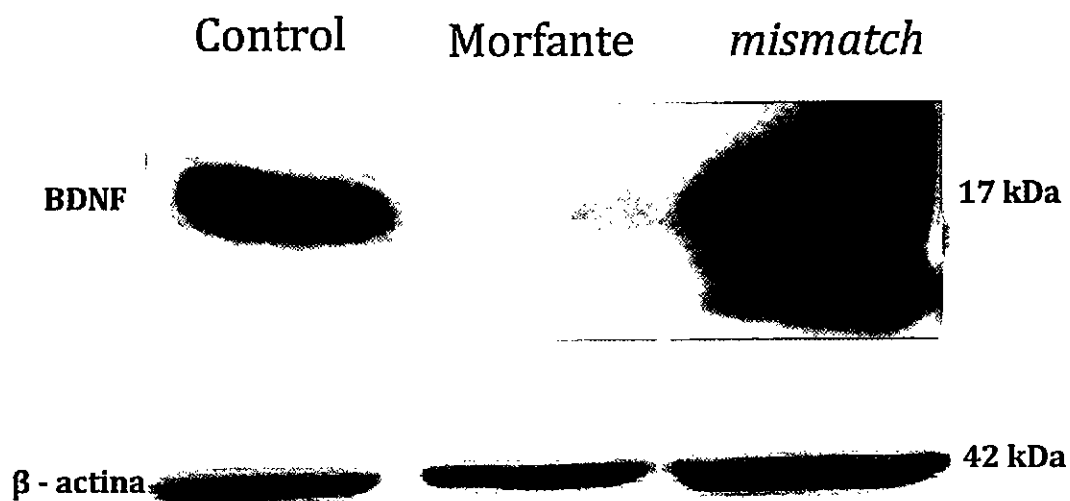
### **3.5. Ensayos de pérdida de función de la neurotrofina BDNF.**

#### ***3.5.1. Inmunodetección de la proteína BDNF.***

Con el propósito de establecer el análisis cualitativo de la presencia de la proteína BDNF en los peces de 3 dpf, se efectuó la inmunodetección de la neurotrofina mediante "Western Blotting".

La neurotrofina fue detectada en la banda de los 17 kilo Daltons (kDa). La expresión del péptido se detectó en los peces controles y en los tratamientos en donde se inyectó el morfolino control con la secuencia *mismatch*, encontrándose en ambas condiciones intensidades de banda similares. En la condición morfante no se detectó expresión de la proteína. (Figura 12).

La expresión de  $\beta$ -actina, la proteína utilizada como control de carga, fue constante para todos los tratamientos evaluados.



**Figura 12. Análisis de la expresión de la proteína BDNF por Western Blotting.** A larvas bajo tratamientos control, control *mismatch* y morfantes se les extrajo la fracción acuosa del homogenado total de larvas. La proteína fue detectada en el orden de los 17 kDa y en la condición morfante no se detectó expresión. La expresión de la proteína  $\beta$  - actina (42 kDa) fue constante en todos los tratamientos evaluados.

3.5.2. Análisis de las velocidades de regeneración del nervio de la LLP en larvas morfantes para BDNF.

Los antecedentes reportados sobre la participación de BDNF durante la regeneración axonal han demostrado que esta neurotrofina promueve los eventos regenerativos. En nuestro afán de caracterizar la participación de BDNF en la regeneración del nervio de la LLP, se evaluaron las características del nervio LLP de los peces morfantes posterior a la electroablación, destacando como principal diferencia las velocidades de regeneración alcanzadas por los distintos tratamientos.

Las condiciones de inyección permitieron la alta viabilidad de los peces (sobre el 75% de sobrevivencia) y la obtención del fenotipo morfante, que fue identificado por el

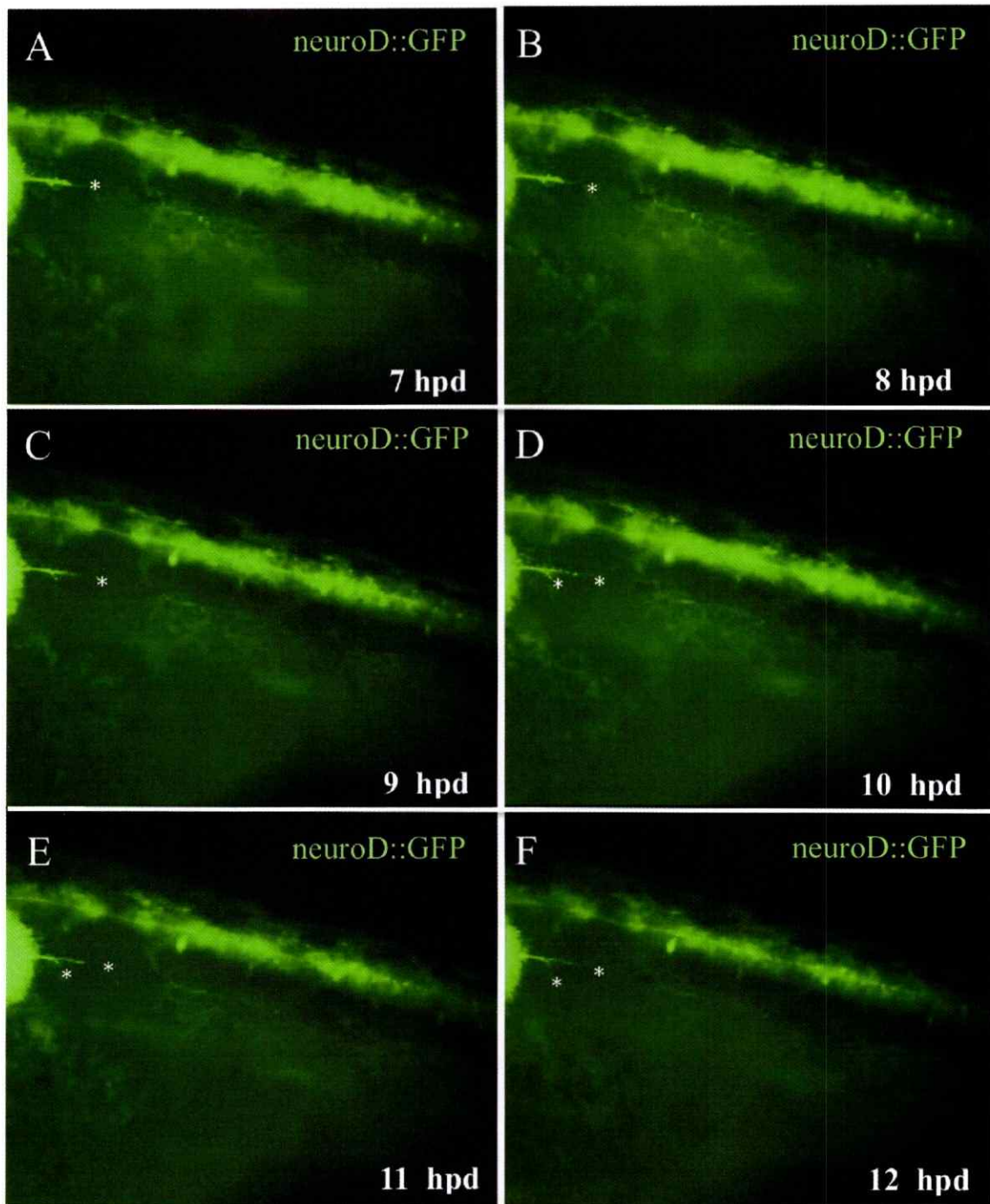
tamaño reducido de los ojos y el número menor de axones que conformaban el nervio óptico o la ausencia de este a los 2 dpf (Diekmann *et al.*, 2009).

Las larvas morfantes fueron lesionadas en el nervio de la LLP y se monitoreó su regeneración por registros en tiempo extendido ("*time-lapse*"), en el tramo temporal desde las 6 hasta las 12 hpd (Figura 13), ventana de tiempo en donde ocurrió la fase de transición de la regeneración del nervio de la LLP (Figura 9). Este periodo se escogió debido a que durante las primeras 6 hpd no existieron diferencias entre los tratamientos en cuanto a la fase de degeneración Walleriana y velocidades de regeneración (datos no mostrados).

Las larvas morfantes presentaron velocidades de regeneración estadísticamente menores en relación a la condición control y los tratamientos con el morfolino *mismatch*. Tales diferencias se establecieron desde las 8 a las 12 hpd. (Figura 14).

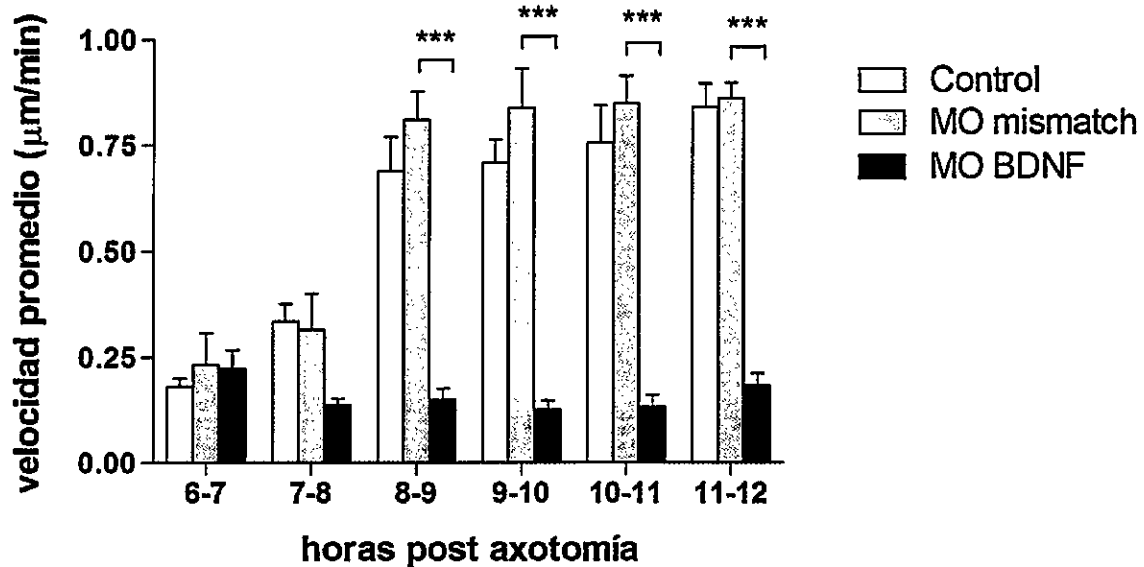
Al analizar el destino de los nervios regenerados a las 22 hpd en larvas morfantes (tiempo en el cuál regenera totalmente el nervio en peces axotomizados silvestres), se observó la regeneración incompleta del nervio. Por otra parte, aquellas proyecciones que regeneraron lo hicieron de manera aberrante, posicionándose en la porción ventral o dorsal de las larvas (n=12).

Las velocidades obtenidas en los peces morfantes fueron comparadas con la de los peces controles (Test *t de Student*), estableciéndose diferencias significativas desde las 8 hpd, periodo en donde comienza la fase rápida de regeneración del nervio de la LLP (Figura 15).



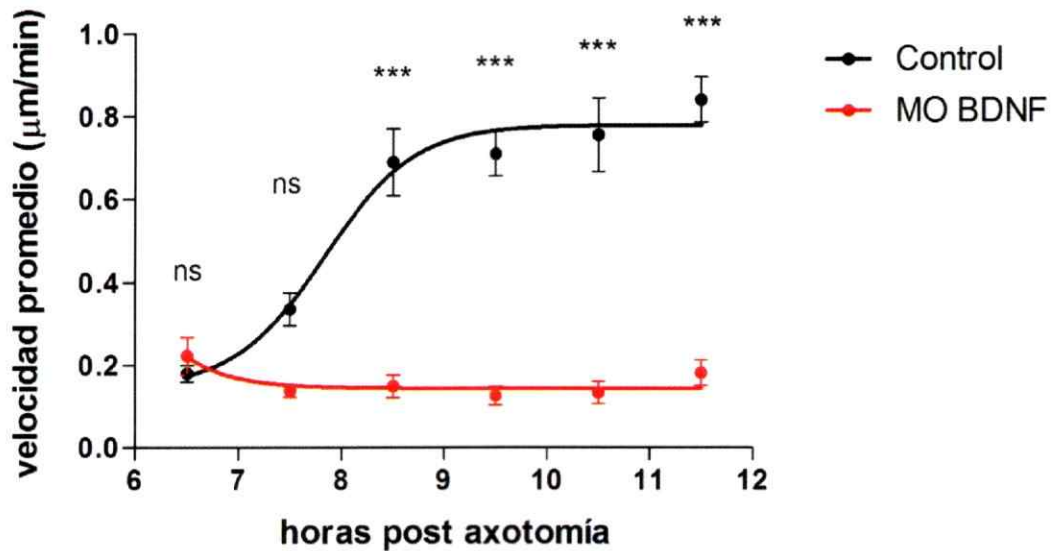
**Figura 13. Regeneración del nervio de la LLP en larvas de 72 hpf morfantes para BDNF.** Las larvas morfantes presentaron problemas en la regeneración del nervio de la LLP en el tramo evaluado (6 a 12 hpd). Los asteriscos indican el lugar hasta donde se proyectaron las neuritas que regeneraron. En las figuras D, E y F se observa la bifurcación de algunas proyecciones nerviosas que alcanzaron a regenerar (Barra de tamaño: 100  $\mu\text{m}$ ).

## Regeneración del nervio de la LLP



**Figura 14. Comparación de las velocidades de regeneración del nervio de la LLP en larvas control y morfantes para BDNF entre las 6 y 12 hpd.** La comparación de las velocidades de regeneración para los distintos tratamientos se desarrolló desde las 6 hasta las 12 hpd, período que describe la fase de transición de la regeneración del nervio de la LLP. Los análisis estadísticos (Test ANOVA 2 Vías) establecieron que las velocidades de regeneración de las larvas morfantes son significativamente inferiores a los tratamientos control y aquellas tratadas con el morfolino *mismatch* entre las 8 y las 12 hpd. Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  error estándar. (n = 7 a 9 individuos para cada condición experimental y tramo evaluado).

## Regeneración del nervio de la LLP



**Figura 15. Análisis de las velocidades de regeneración del nervio de la LLP en condiciones control y morfante.** Los datos del gráfico anterior fueron analizados en cada tramo y se estableció mediante el test *t de Student* que las velocidades de regeneración son significativamente distintas desde las 8 hpd entre los peces silvestres y morfantes. Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  error estándar. (n = 7 a 9 individuos para cada condición experimental y tramo evaluado).



## DISCUSIÓN

Una de las grandes interrogantes no resueltas de la neurobiología consiste en entender cómo, en algunas especies, los axones y nervios son capaces de regenerar mientras que, en otras como los mamíferos, existe un ambiente poco permisivo para que ocurra este proceso. En esta tesis, aprovechamos un modelo animal donde hay una robusta regeneración axonal periférica, el pez cebra, para dilucidar algunos de los mecanismos que contribuyen a este proceso. Entre los resultados obtenidos en este trabajo destacan la estandarización de un método que logró la axotomía del nervio de la LLP en larvas de pez cebra, y la caracterización del rol de la neurotrofina BDNF durante la regeneración del SNP.

### **4.1. Electroablación del nervio de la LLP en larvas de pez cebra.**

El estudio de la regeneración nerviosa depende, en la mayoría de los casos, de la aplicación de técnicas experimentales que dañen los axones que forman el SNC y el SNP. En base a esta idea, y a los objetivos de trabajo propuestos, en esta tesis se estandarizó una técnica que logró axotomizar el nervio de la LLP de larvas de pez cebra. Este método, denominado “electroablación”, consiguió el daño específico del tejido y permitió el posterior estudio *in vivo* de las fases de degeneración Walleriana y regeneración del nervio de la LLP, obteniendo caracterizaciones similares a axotomías realizadas con un láser dos fotones (O'Brien *et al.*, 2009; Villegas *et al.*, datos no publicados).

En base a estos resultados proponemos a la “electroablación” como una atractiva técnica de daño que permite el estudio *in vivo* de la degeneración y regeneración del nervio de la LLP, y de aquellos mecanismos biológicos que se relacionan con estos eventos, y de paso, se suma a las estrategias implementadas para dañar nervios del pez cebra, como son el aplastamiento de axones que forman parte de las proyecciones de células ganglionares retinales (Schnalb *et al.*, 1995) y la aplicación de pulsos con un láser dos fotones en el nervio que conforma el sistema de la LLP (O’Brien *et al.*, 2009).

#### **4.2. Regeneración del nervio de la LLP en larvas de pez cebra axotomizadas por electroablación.**

Uno de los análisis desarrollados durante la regeneración del nervio de la LLP fue establecer si existían diferencias significativas entre las velocidades de regeneración de los tramos monitoreados. Mediante el análisis estadístico (*Test t de Student*) se distinguieron dos fases de velocidades de regeneración, las que se denominaron fase lenta y fase rápida. La primera de ellas comprendió los tramos que abarcaba desde las 0 hasta las 8 hpd y la segunda desde las 9 hasta las 18 hpd.

Los análisis estadísticos de correlación no lineal ( $R^2=0.9744$ ) surgieron debido a la apariencia sigmoidea de la curva cuando se graficó la totalidad de los puntos de velocidades de regeneración (Figura 7). Este análisis comprobó el comportamiento sigmoideo de la curva y reveló la existencia de una tercera fase de velocidades de regeneración, que se denominó fase de transición.

Las velocidades obtenidas durante la fase lenta de regeneración del nervio de la LLP (0 a 6

hpd) se explican por los antecedentes descritos en distintos modelos vertebrados, en donde se ha reportado la liberación de moléculas que inhiben el crecimiento y regeneración de los nervios periféricos en horas posteriores al daño axonal. En el caso del pez cebra se ha demostrado la expresión del complejo NOGO/NOGO66 (Brömsale y Halpern, 2009) en el nervio de la LLP y de condroitin sulfatos en nervios retinales (Becker y Becker, 2002); moléculas que inhiben el crecimiento axonal por repulsión. Por otra parte, se ha descrito que los fragmentos axonales distales que resultan de la degeneración Walleriana expresan proteínas asociadas a la mielina que retardan la regeneración de los nervios periféricos (Fenrich y Gordon, 2004). La expresión de otras moléculas, como netrinas y semaforinas, también inhibirían el crecimiento del nervio de la LLP de este vertebrado (Koeberla y Bähr, 2003). Además de los antecedentes descritos, existen otros eventos que determinarían el retardo de la regeneración del nervio de la LLP, como la formación de cicatrices gliales y la remoción de tejidos dañados por tipos celulares específicos para “despejar” la vía por donde regeneran los axones.

También, durante la fase lenta de regeneración, se observó la fragmentación del nervio de la LLP y la desaparición de la marca fluorescente que expresaba este tejido en horas posteriores a la electroablación. Estos resultados y observaciones se asemejan a los obtenidos por Villegas *et al.*, (datos no publicados) cuando generó la axotomía del nervio de la LLP con pulsos de láser dos fotones.

La segunda fase de regeneración del nervio de la LLP se presentó entre las 6 y las 12 hpd. Este periodo comprende la fase de transición de crecimiento, donde se observa el punto de inflexión respecto a las diferencias en las velocidades de regeneración desde el tramo 7-8

hasta el 8-9 (0.350  $\mu\text{m}/\text{min}$ ). El aumento gradual de las velocidades de regeneración en esta fase se atribuiría a múltiples factores. Uno de ellos, es que entre las 7 y 8 hpd se alcanza la remoción de la mayoría de los fragmentos celulares degenerados que se encuentran distal al sitio de la axotomía. Tal evento otorgaría la condición propicia para que el nervio pueda regenerar y, consecuentemente, adquiera mayores velocidades de regeneración. Otro de los factores sería la disminución de los niveles de secreción de moléculas inhibitoras de la regeneración axonal y el aumento de aquellas que favorecen tal proceso. Esta última propuesta se sustenta en estudios desarrollados en murinos que demuestran la secreción de neurotrofinas que promueven la guía y crecimiento axonal luego de la degeneración Walleriana (NT3, NT-4/5 y BDNF) (Lykissas *et al.*, 2007; Canossa *et al.*, 1997). En el caso del pez cebra se ha demostrado que la secreción de la neurotrofina GDNF por las células interneuromásticas conduce a la regeneración del nervio de la LLP en etapas larvales (Schuster *et al.*, 2010).

La última fase descrita, donde se obtuvieron las mayores velocidades de regeneración, ocurre desde las 12 hasta las 18 hpd. En esta ventana de tiempo las neuritas que están regenerando manifiestan desplazamientos a lo largo del miosepto horizontal más visibles en relación a las fases descritas anteriormente. Las velocidades alcanzadas en este tramo se explicarían por varias razones. Una de las principales es que en esta fase ya no se observa la presencia de fragmentos celulares degenerados a lo largo del miosepto horizontal. Por otra parte, se ha descrito en nervios periféricos de murinos que luego de la degeneración Walleriana las células que conforman la ruta por donde se desplazan los axones sintetizan moléculas de matriz extracelular que promueven la regeneración nerviosa (Vargas y Barres,

2007). Finalmente, se ha reportado la capacidad endógena de algunos tipos celulares de expresar moléculas que promueven la regeneración del SNC y SNP (Smith *et al.*, 2011).

El desarrollo de estos eventos, entre otros, determinarían el aumento de las velocidades de regeneración del nervio de la LLP en el tramo comprendido entre las 12 y 18 hpd, alcanzando velocidades superiores a las 0.7  $\mu\text{m}/\text{min}$ .

#### **4.3. Expresión de mRNA de *BDNF* en el sistema de la LLP.**

Uno de los objetivos centrales de esta tesis fue evaluar si se generaban cambios en la expresión de la neurotrofina BDNF en el miosepto horizontal durante las fases de degeneración y regeneración del nervio de la LLP. Esta iniciativa surgió debido a que antecedentes demostraron que las células interneuromásticas que conformaban el miosepto horizontal secretaban neurotrofinas, en particular GDNF, durante la regeneración del nervio de la LLP y que su liberación era necesaria para la correcta regeneración de los axones que conformaban el nervio de la LLP (Schuster *et al.*, 2010). Por otra parte, experimentos preliminares de pérdida de función de BDNF realizados en nuestro laboratorio (Villegas *et al.*, datos no publicados) demostraron la perturbación de la regeneración del nervio de la LLP. Estos antecedentes motivaron la extensión del estudio del rol de esta neurotrofina en la regeneración del nervio de la LLP mediante distintos análisis, entre ellos, la expresión de BDNF en el miosepto horizontal durante la regeneración del nervio de la LLP.

Inesperadamente, la expresión de la proteína no se detectó en la LLP a los 3 dpf, sugiriendo que los niveles de expresión son muy bajos en esta etapa del desarrollo. Es más, la detección de la neurotrofina por inmunohistoquímica ocurrió desde el día 10 post-fertilización en la

porción cefálica y en los neuromastos (Figura Suplementaria 5), mismo resultado obtenido por Germaná *et al.*, (2010b) cuando caracterizó la distribución del sistema BDNF/TrkB en la LLP del pez cebra.

Por estas razones se decidió realizar hibridación *in situ* para detectar la expresión de mRNA de la neurotrofina en el sistema de la LLP, cuya detección sería una medida indirecta de la expresión de la proteína.

En los peces no tratados, la expresión observada en el cerebro, ojos, cartílagos mandibulares y arcos branquiales coincide con los antecedentes reportados por otros autores (Djekmann *et al.*, 2009; Thiesse *et al.*, 2004), y de paso, apoya los postulados que indican que BDNF interviene en el desarrollo del sistema cráneo-facial del pez cebra.

En los tratamientos experimentales se detectó la expresión del mRNA de *BDNF* en el miosepto horizontal. Las células que expresarían la neurotrofina en respuesta a la electroablación del nervio de la LLP serían las células de Schwann. Esta idea se apoya en los análisis histológicos y de microscopía electrónica que han identificado los tipos celulares que conforman el miosepto horizontal desde las 78 hpf (O'Brien *et al.*, 2011; Raphael *et al.*, 2010). Tales descripciones indican que este tejido se encuentra conformado por varios tipos celulares y que los axones que forman parte del nervio de la LLP se encuentran en estrecha asociación con células de Schwann. Por otra parte, los estudios realizados por Schnalb *et al.*, (1995) demostraron la secreción de factores solubles de bajo peso molecular por estas células gliales posterior a la axotomía del nervio óptico del pez cebra, promoviendo la regeneración axonal de las CGRs. Estos antecedentes, se suman a la descripción

desarrollada por Frostick (1998) sobre la capacidad de las células de Schwann de secretar BDNF luego del daño de nervios periféricos. Otro de los tipos celulares que expresaría la neurotrofina BDNF en respuesta al daño axonal son las neuronas que conforman el nervio de la LLP (Mo y Nicolson, 2011).

Otra de las interrogantes que surgió fue explicar la expresión diferencial de la neurotrofina en el miosepto horizontal a distintas horas posteriores al daño. En cuanto a ello, pensamos que la marca detectada a las 3 hpd corresponde a una respuesta asociada a muerte celular probablemente ejecutada por las células de Schwann y las neuronas que conforman el nervio de la LLP. Esta respuesta al daño celular se reportó en axotomías del nervio óptico de pez cebra, en donde se demostró la capacidad de la glía de liberar proteínas de bajo peso molecular que promueven la supervivencia de las CGRs inmediatamente después del daño axonal (Schnalb *et al.*, 1995; 1996). También se comprobó que la migración de los macrófagos al sitio inflamado estimula la secreción de neurotrofinas por las células de Schwann. Por ejemplo, se sabe que durante la inflamación de nervios axotomizados los macrófagos secretan la citoquina interleuquina 1 (IL-1), una molécula que estimula la liberación de la neurotrofina NGF por parte de las células de Schwann, promoviendo supervivencia y regeneración axonal (Cámara-Lemarroy *et al.*, 2010). De acuerdo a este último antecedente, la liberación de citoquinas u otras moléculas por leucocitos a las 3hpd, fase que representó el mayor nivel de inflamación luego de la electroablación (Figura 16), estimularía la secreción de BDNF por parte de las células de Schwann y promovería la supervivencia de los axones lesionados posterior a la electroablación del nervio de la LLP.

Quizás el resultado más controversial de esta tesis fue la ausencia de expresión de la neurotrofina BDNF en el miosepto horizontal a las 6 y 9 hpd, tramo que describe el aumento de las velocidades de regeneración del nervio de la LLP.

Una de las probables explicaciones es que exista una baja expresión de la neurotrofina en el tramo de las 6 y 9 hpd en el miosepto horizontal, esencialmente indetectable, y que este nivel sea capaz de promover la expresión de otras moléculas que participarían activamente de la regeneración del nervio de la LLP. Esta hipótesis se apoya en trabajos que han demostrado que las neurotrofinas son capaces de estimular su propia secreción. Por ejemplo, se comprobó que NT-3 y NT-4/5 inducen la secreción de BDNF (Canossa *et al.*, 1996). De la misma manera, estudios *in vitro* demostraron que NGF induce la liberación de BDNF, NT-3 y NT-4/5 y que BDNF induce la secreción de NT-3. Por otra parte, la expresión de neurotrofinas que promueven la regeneración axonal en el pez cebra desde las 72 hpf (GDNF (Sheperd *et al.*, 2004), CNTF (Thiesse *et al.*, 2001), NT-3, NT-4/5, NGF (Thiesse *et al.*, 2004) y BDNF) nos conduce a plantear este tipo de secreción de las neurotrofinas durante la regeneración del nervio de la LLP. Sin embargo, para corroborar esta hipótesis, sería necesaria la evaluación de la expresión de las neurotrofinas que favorecen la regeneración en condiciones de daño axonal. Estos análisis permitirían establecer si existen otras neurotrofinas que participan durante el direccionamiento y la regeneración del nervio de la LLP.



El otro tramo en donde se evaluó la expresión de la neurotrofina fue a las 12 hpd, en donde también existió una débil marca en el miosepto horizontal. Creemos que el aumento de la expresión de BDNF en esta zona contribuye a la regeneración del nervio de la LLP, mediante la recepción de la neurotrofina por el cono axonal y posterior desplazamiento del nervio que esta regenerando a lo largo del miosepto horizontal. Esta idea fue comprobada por May *et al.*, (2005), quienes estudiaron el rol de las células de Schwann durante la regeneración axonal. Ellos demostraron que en condiciones de daño estas células expresan factores neurotróficos en la superficie celular, las que son captadas por el cono en crecimiento, incorporadas al axón y transportadas retrógradamente al soma celular, apoyando la sobrevivencia neuronal y mejorando la regeneración axonal.

Los resultados obtenidos demuestran la débil marca de la neurotrofina a distintos tiempos post-daño. Sin embargo, hacen falta otros análisis para comprobar la expresión específica de la neurotrofina *BDNF* en respuesta al daño axonal. Un experimento necesario sería la evaluación de la expresión de los receptores que se unen específicamente a la neurotrofina, ya sea TrkB o p75. Esta propuesta se apoya en estudios que han demostrado la sobreexpresión de estos receptores durante la regeneración de neuronas motoras axotomizadas (Boyd y Gordon, 2001).

Por otra parte, y para identificar qué tipos celulares específicos expresan la neurotrofina en respuesta al daño axonal, serían necesarios análisis histológicos detallados en secciones de miosepto horizontal previamente procesadas por la técnica de hibridación *in situ* luego de la electroablación del nervio de la LLP.

Finalmente, la expresión similar de la neurotrofina en larvas control y aquellas que se dañaron inespecíficamente (Figura 10B), confirman que la detección de BDNF en el miosepto horizontal a las 3 y 12 hpd es motivo de la electroablación del nervio de la LLP.

#### **4.4. Cuantificación de la expresión total de *BDNF* durante la regeneración del nervio de la LLP.**

Una de las interrogantes que surgió posterior al daño de la electroablación fue evaluar si los transcritos de neurotrofina *BDNF* variaban sus niveles de expresión luego de la electroablación del nervio de la LLP. Para determinar ese efecto se cuantificó la expresión total de BDNF en larvas totales de pez cebra.

En estadios embrionarios del pez cebra la expresión de neurotrofinas se ha cuantificado en el SNC y SNP (Cui *et al.*, 2003; Cohen, 1994). En nuestro caso particular, los análisis de los niveles de expresión de BDNF por qPCR se evaluaron desde las 3 hasta las 12 hpd, periodos que comprenden las fases de degeneración Walleriana e inicio de la regeneración del nervio de la LLP de acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis y a lo descrito en estudios desarrollados mediante axotomía laser dos fotones (Villegas *et al.*, datos no publicados).

Los análisis de los niveles de expresión totales de BDNF fueron desarrollados en larvas totales de pez cebra, debido a que resultados preliminares por RT-PCR (Figura Suplementaria 3) demostraron mayor expresión de la neurotrofina en la mayoría de los tratamientos que sufrieron electroablación en relación a los que no.

Inesperadamente, los resultados obtenidos por el método  $\Delta$  CT (Schmittgen y Livak, 2008)

no demuestran cambios de expresión de la neurotrofina a los distintos tiempos evaluados. Estos resultados impiden postular conclusiones biológicamente relevantes respecto al aumento de expresión de la neurotrofina en condiciones de electroablación del nervio de la LLP.

Una de las razones para explicar la ausencia de diferencias significativas fue la observación de que la expresión de mRNA de BDNF se concentró en la porción cefálica de las larvas. Por otra parte, cuando se dañó el nervio de la LLP, solo existió una débil expresión de la neurotrofina en el miosepto horizontal de algunos tratamientos. Estas observaciones sugieren que la electroablación del nervio de la LLP no genera cambios perceptibles de expresión de la neurotrofina en larvas totales de pez cebra.

Creemos que para lograr la correcta determinación de los cambios de expresión génica de la neurotrofina, se deben aplicar metodologías que permitan el aislamiento de tipos celulares específicos luego de la electroablación del nervio de la LLP. Una de estas estrategias sería la separación de células que conforman parte del sistema de la LLP por *cell sorting* o el aislamiento de la porción anatómica que aloja al nervio de la LLP en las larvas. De esta manera se descartará la porción anatómica que concentra la mayoría de la expresión de la neurotrofina y que aparentemente es la principal razón para no obtener resultados certeros sobre la expresión de BDNF en respuesta a la electroablación del nervio de la LLP.

#### **4.5. Pérdida de función de la neurotrofina BDNF.**

Los ensayos que simulan la ganancia o pérdida de función local de neurotrofinas son estrategias moleculares que han sido recurrentemente utilizadas para la determinación de su efecto sobre la regeneración axonal (Shibata *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2000) En el caso de la

pérdida de función, la inyección de oligonucleótidos antisentido modificados, morfolidos, que hibridan y bloquean transientemente la expresión de genes específicos se ha utilizado en larvas de pez cebra (Rosen *et al.*, 2009) y en esta tesis se aplicó para determinar el efecto de la neurotrofina BDNF durante la regeneración del nervio de la LLP.

Los análisis por “Western Blotting” demostraron la inmunodetección de la neurotrofina en los peces normales y en los controles *mismatch*, a diferencia de lo que ocurrió en los peces morfantes de BDNF.

Cuando se evaluaron las características morfológicas y funcionales de los peces morfantes que se dañaron, la principal función que se perturbó fue la regeneración del nervio de la LLP y, consecuentemente, las velocidades de regeneración. En este sentido, la inyección del morfolino contra BDNF provocó el direccionamiento aberrante de las neuritas que regeneraron incompletamente y la obtención de bajas velocidades de regeneración durante el periodo de tiempo analizado, resultado que se explica por el silenciamiento de la expresión de la proteína. Este efecto perturbaría la liberación de la neurotrofina en el miosepto horizontal (probablemente, por las células de Schwann o por las neuronas axotomizadas del nervio de la LLP), y consigo, el correcto direccionamiento de las neuritas que conforman el nervio de la LLP. Esta propuesta se apoya en las observaciones realizadas por May *et al.*, (2005), quienes postularon que para que ocurra la correcta regeneración de los nervios periféricos es necesaria la recepción por el cono axonal de aquellas moléculas que promueven la regeneración axonal.

En la sección 1.2 se expusieron antecedentes que demostraron que para que ocurra la regeneración axonal es necesaria la expresión de factores neurotróficos (Maberg *et al.*, 1998;

San José *et al.*, 1997a; Paves y Scarman, 1997). De acuerdo a estos reportes, pensamos que los peces morfantes ven afectados mecanismos biológicos que se relacionan con la activación de vías de señalización intracelular, mediadas por BDNF, que promueven la polimerización y despolimerización de los elementos del citoesqueleto durante la regeneración del nervio de la LLP, inhibiendo la regeneración de este tejido.

Otro de los motivos que sería la causa de la obtención de las bajas velocidades de regeneración en peces morfantes serían los problemas en el desarrollo del pez que son consecuencia indirecta de la inyección del morfolino. En este sentido, se la ha demostrado que la inyección del morfolino contra la expresión de BDNF perturba el desarrollo de las estructuras cráneo faciales en larvas de pez cebra (Diekmann *et al.*, 2009). Sin embargo, la fase de degeneración Walleriana en los peces morfantes transcurre de manera similar a los peces controles, lo que daría indicios de que los mecanismos celulares relacionados con degeneración y ,supuestamente, regeneración del nervio de la LLP no se perturbarían por la pérdida de función.

En cuanto a la evaluación de las velocidades de regeneración en el periodo que comprende las 6 y 12 hpd, se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos control y morfantes desde las 8 hpd. La ausencia de diferencias significativas de velocidades de regeneración entre los tramos de 6 a 7 y 7 a 8 hpd se explicarían por la permanencia de una gran cantidad de leucocitos en el sitio que sufrió la electroablación, situación que retardaría la remoción de fragmentos axonales degenerados que se encuentran en el miosepto horizontal y, consecuentemente, la regeneración del nervio de la LLP.

En esta tesis la fase de la degeneración Walleriana se prolongó hasta las 7 hpd. Por otra parte, los antecedentes descritos por Villegas *et al.*, (datos no publicados) indican que esta fase culmina a las 6 hpd, cuando se axotomizó el nervio de la LLP con un láser de dos fotones. La diferencia de los tiempos obtenidos en los distintos métodos de daño se explicarían por la emisión diferencial de señales moleculares pro-inflamatorias desde el sitio lesionado. Respecto a esta última idea, se sabe que luego del daño de un tejido se secretan moléculas que promueven el reclutamiento de macrófagos. En larvas de pez cebra, una de estas moléculas es peróxido de hidrógeno, cuyos niveles de liberación son directamente proporcional a la magnitud del daño ocasionado (Rieger y Sagasti, 2011). Probablemente el gradiente de emisión de peróxido de hidrógeno, y otras moléculas pro inflamatorias desde el sitio que sufrió la electroablación es mayor en relación a los peces axotomizados con un láser dos fotones, y por ende, mantiene a los leucocitos por mayor tiempo en el tejido lesionado, retardando la remoción de los axones distales fragmentados. Por otra parte, la cantidad de tejido dañado que se debe remover es mayor cuando se aplica la electroablación del nervio de la LLP. Estos eventos serían la causa de las diferencias de los tiempos de la fase de degeneración Walleriana entre ambos métodos y la explicación para encontrar velocidades de regeneración estadísticamente diferentes desde las 8 hpd en los tratamientos silvestres en relación a los peces morfantes.

Como se expuso en la sección anterior, existen otras neurotrofinas que promueven la regeneración axonal en larvas de pez cebra. El papel regulador de BDNF propuesto durante las 6 y 9 hpd (presentado en la sección 4.3) explicaría la ausencia de crecimiento en condiciones morfantes, mediante la perturbación de las interacciones moleculares que

promueven la regeneración axonal.

Finalmente, y para comprobar la participación de esta neurotrofina durante la regeneración del nervio de la LLP, son necesarios experimentos complementarios. Uno de estos sería la inhibición de la función de los receptores que se unen a BDNF, como TrkB o el receptor neurotrófico p75, durante la regeneración del nervio de la LLP. Por otra parte, ensayos de ganancia de función de BDNF mediante el trasplante de proteínas recombinantes en sitios ectópicos demostrarán si los axones son capaces de responder a la emisión de la neurotrofina durante la regeneración del nervio de la LLP.

## CONCLUSIONES

En larvas de pez cebra:

- ✓ El sistema de electroablación permite el daño específico del nervio de la LLP y es una técnica alternativa a la axotomía por pulsos laser dos fotones.
- ✓ La regeneración en el tiempo del nervio de la LLP manifiesta un comportamiento sigmoideo, con tres fases distinguibles: fase lenta, fase de transición y fase rápida de regeneración.
- ✓ Existe expresión de la neurotrofina *BDNF* en el miosepto horizontal en respuesta a la electroablación del nervio de la LLP.
- ✓ La cuantificación de los transcritos de *BDNF* en larvas totales no permiten establecer el aumento o disminución de la expresión de la neurotrofina durante la regeneración del nervio de la LLP.
- ✓ La pérdida de función de *BDNF* afecta la regeneración del nervio de la LLP durante la fase de transición.



## PROYECCIONES EXPERIMENTALES DEL SISTEMA DE ELECTROABLACIÓN

### 6.1. Evaluación de la infiltración leucocitaria en larvas lesionadas por la electroablación del nervio de la LLP.

#### Materiales y Métodos:

Con el fin de caracterizar otras consecuencias del proceso de electroablación (en particular, la respuesta inmune asociada al daño generado), larvas con la doble marca transgénica Tg:(*neuroD::GFP* x *LysC::dsRed*) fueron lesionadas de acuerdo a las condiciones presentadas en la sección anterior. La evaluación de la infiltración leucocitaria se efectuó desde el momento del daño cada 3 horas hasta las 12 horas post-daño (hpd). Las larvas que sufrieron la electroablación fueron fotografiadas en el sitio de daño con una lupa de epifluorescencia (Olympus, modelo MVX10; Aumento 2.5X). Se cuantificó la fluorescencia del área dañada mediante el programa *ImageJ* (*Plug-in: analyze*) para posteriormente expresar los resultados en unidades de fluorescencia/área. La toma de imágenes se realizó por microscopía confocal (Zeiss, Axiovert 200).

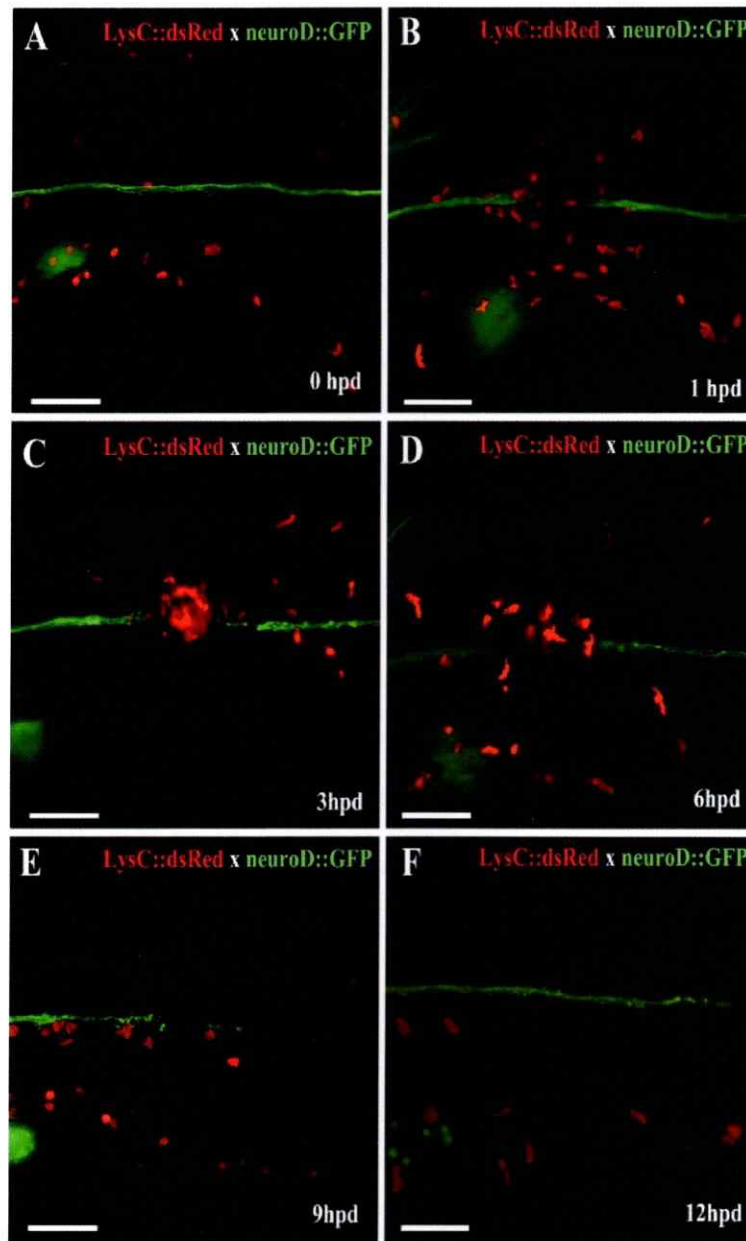
Para corroborar la utilización del sistema de electroablación como una alternativa válida para estudiar el proceso inflamatorio, las larvas dañadas fueron monitoreadas durante las tres primeras hpd bajo los mismos parámetros de cuantificación descritos anteriormente, con la diferencia que se efectuaron dos tratamientos experimentales.

El primero de ellos constó de la pre incubación de las larvas en la droga diclofenaco, un fármaco que inhibe la activación de vías de señalización que promueven la respuesta inflamatoria (d'Alençon *et al.*, 2010) a concentración 3  $\mu$ M, (3  $\mu$ M), para posteriormente dañar y mantener la incubación durante las horas de cuantificación de la fluorescencia.

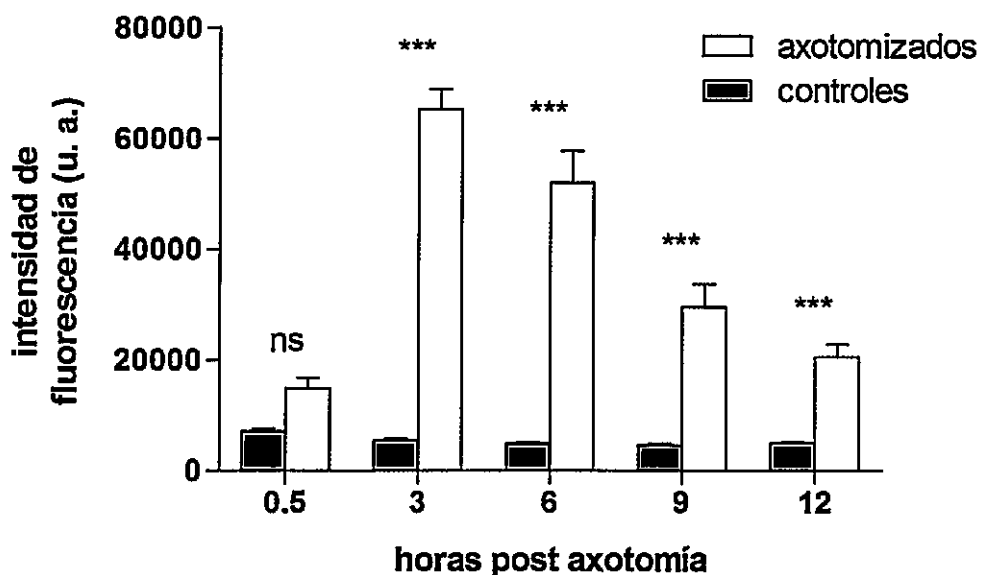
Las cuantificaciones fueron expresadas en unidades de fluorescencia por área.

### Resultados:

La Figura 16 muestra la infiltración leucocitaria en el nervio de la LLP en tiempos posteriores a la electroablación y, simultáneamente, se observa la degeneración y regeneración del nervio de la LLP. Durante las primeras horas de daño se evidenció la mayor concurrencia de las células inmunes al sitio lesionado, particularmente a las 3 hpd. Las mediciones de la infiltración leucocitaria se efectuaron desde los 30 minutos hasta las 12 hpd y los resultados fueron expresados en unidades de fluorescencia por área por el programa *ImageJ (Plug In: analyze)* debido a la imposibilidad de distinguir el número total de células presentes en el sitio dañado (Figura 16C). Los resultados demostraron la pronunciada disminución de las unidades de fluorescencia desde las 3 hasta las 12 hpd. Sin embargo, y a pesar de la disminución de la fluorescencia en los distintos tiempos, en todos los tramos evaluados existió el mismo grado de significancia estadística en las diferencias establecidas con la situación previa a la axotomía (Test ANOVA 1 Vía) (Figura 17).



**Figura 16. Infiltración leucocitaria posterior a la electroablación del nervio de la LLP.** (a). *Control*. Se observa la distribución característica de los leucocitos en larvas de pez cebra. (b) *1 hpd*. Inmediatamente posterior a la electroablación, los leucocitos migran al sitio dañado. (c) *3 hpd*. Los leucocitos se concentran en el sitio lesionado y se detecta una alta intensidad de fluorescencia, debido al alto número de células presentes en el sitio electroablacionado. (d) *6 hpd*. El número de leucocitos disminuye en relación al periodo anterior, pero aún existe presencia de ellos en el tejido dañado. (e) *9 hpd*. En este tramo la mayoría de los leucocitos ha abandonado el sitio lesionado, disminuyendo su número en relación al periodo evaluado anteriormente. (f) *12 hpd*. Las larvas manifiestan nuevamente la distribución característica de los leucocitos en sector analizado de la larva. (Aumento 20X; Barra de tamaño: 100  $\mu\text{m}$ ).



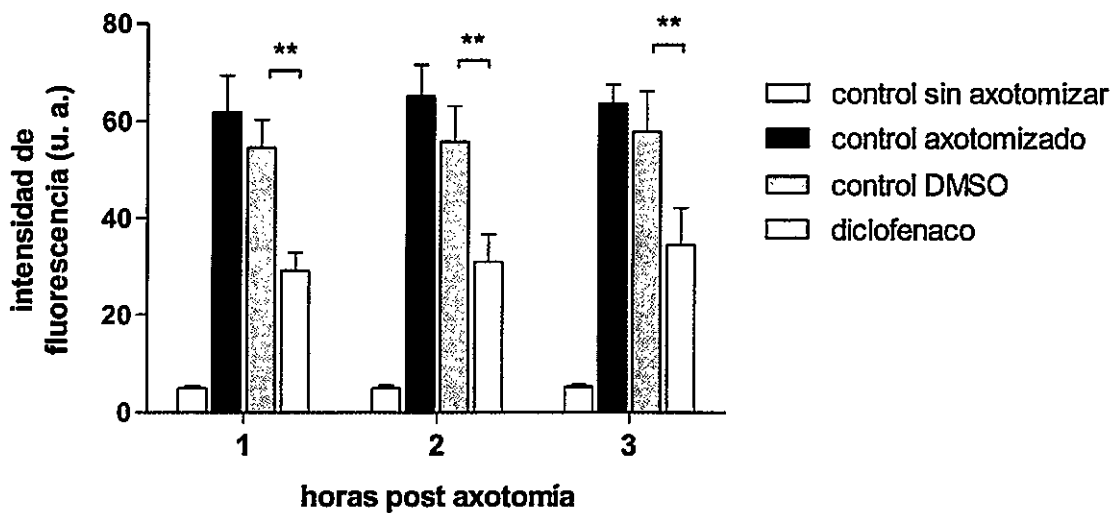
**Figura 17. Cuantificación de la infiltración leucocitaria a distintos tiempos post-electroablación.** Mediante la utilización de larvas doble transgénica Tg:(*neuroD::GFP* × *LysC::dsRed*) fue posible cuantificar el grado de infiltración leucocitaria en la zona donde se aplicó la electroablación. A los 30 minutos posteriores al daño existe aumento en el número de leucocitos reclutados en el tejido dañado. Sin embargo, a este tiempo no existen diferencias significativas en relación al tratamiento control. El proceso de la resolución leucocitaria explica el decremento gradual del número de leucocitos en la zona dañada entre las 3 y las 12 hpd. Aún así, persiste el mismo grado de las diferencias significativas entre las distintas horas de medición en relación a los peces no axotomizados. Los valores se encuentran expresados en intensidad de fluorescencia/unidad de área.

Una de las principales interrogantes que surgió al analizar los resultados de infiltración leucocitaria, fue evidenciar el efecto de drogas antiinflamatorias sobre este evento, y si la manipulación génica del pez cebra se podría combinar con los procesos inflamatorios inducidos en estadios larvales. Para ello, larvas Tg:(*neuroD::GFP* x *LysC::dsRed*) fueron dañadas de acuerdo a las descripción presentada en la sección materiales y métodos (ítem 2.2). La infiltración leucocitaria bajo estas condiciones experimentales se evaluó durante las tres primeras horas posteriores al daño, periodo que representó la fase aguda de la inflamación (Figura 11).

En la condición control no tratado los leucocitos que expresaron la proteína fluorescente roja se distribuyeron en todo el cuerpo de la larva, con mayor localización en la porción cefálica, en el tronco ventral y en la cola. En cuanto a los tratamientos experimentales, uno de ellos consistió en la pre-incubación por 1 hora de las larvas en diclofenaco. Posterior a la electroablación, los peces siguieron expuestos a la droga hasta las 3 hpd, tiempo en que culminaron las cuantificaciones. La concentración utilizada fue 3  $\mu$ M, condición que en trabajos previos del laboratorio mostraron inhibición de la migración de leucocitos hacia neuromastos dañados de larvas de 3 dpf (d'Alençon *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos demuestran mayor emisión de fluorescencia en los tratamientos lesionados en relación a peces incubados en la droga antiinflamatoria.

Las significancias de las diferencias estadísticas fueron similares en ambos tratamientos experimentales en relación a los controles utilizados. (Figura 18).



**Figura 18. Evaluación de la inflamación leucocitaria en larvas dañadas en el nervio de la LLP bajo distintas aplicaciones experimentales.** Larvas transgénicas dañadas en el nervio de la LLP fueron incubadas en la droga diclofenaco (3  $\mu$ M) de acuerdo a lo propuesto por d' Alençon *et al.*, (2010). La aplicación de la droga inhibió la migración leucocitaria en relación a los controles utilizados (con y sin vehículo de la droga). Los valores se encuentran expresados en intensidad de fluorescencia/unidad de área.

## Discusión.

Con el fin de proyectar a todos los niveles posibles la aplicación de la técnica de electroablación en larvas de pez cebra, evaluamos otros efectos biológicos.

Una de las aproximaciones experimentales derivadas de la utilización del sistema de electroablación en el daño de tejidos específicos fue el monitoreo *in vivo* de la infiltración leucocitaria y el análisis de los eventos resolutivos, en este caso, de la fracción lesionada del nervio de la LLP. Los resultados demostraron el decremento gradual de las intensidades de fluorescencia en el sitio lesionado desde las 3 hasta las 12 hpd. Tal disminución se explica por la resolución leucocitaria en los tejidos inflamados, que ocurre por mecanismos apoptóticos o de quimiotaxis retrógrada (Mathias *et al.*, 2006).

También se analizaron los eventos inflamatorios y regenerativos de tejidos dañados específicamente. En este último punto es importante destacar que en nuestro laboratorio se ha implementado una estrategia de daño basada en la exposición continua de larvas de 3 dpf a solución de sulfato de cobre, que genera la destrucción e inflamación de los neuromastos (Hernández *et al.*, 2006). Esta estrategia de daño ha permitido el monitoreo *in vivo* de la migración leucocitaria y ha dado paso a otras investigaciones enfocadas en el estudio del rol de moléculas biológicamente activas sobre la migración de estas células inmunes (d' Alençon *et al.*, 2010). A su vez, esta caracterización farmacológica del proceso inflamatorio ha sido útil para el estudio de aquellas vías de señalización activadas durante los procesos inflamatorios y regenerativos (Peña *et al.*, datos no publicados).

Sin embargo, la exposición prolongada de las larvas a sulfato de cobre presentaría ciertas desventajas. Una de ellas sería que la exposición continua de los peces al compuesto químico afectaría funciones fisiológicas que se relacionan con los procesos regenerativos e inflamatorios de los tejidos. Por otra parte, la solución de sulfato de cobre podría perturbar el efecto de las drogas antiinflamatorias administradas y vice versa. Si bien es cierto, el daño mediante electroablación genera una lesión mayor en área en relación a la aplicación de pulsos láser dos fotones (O'Brien *et al.*, 2009), posee la ventaja de generar un escenario biológico propicio para distinguir el rol de los procesos inflamatorios sobre la regeneración de los tejidos, en este caso, del nervio de la LLP. En este sentido, uno de los resultados interesantes fue la obtención de velocidades de regeneración diferentes en peces morfantes axotomizados con microelectrodos de tungsteno en relación a los axotomizados con un láser dos fotones (Test ANOVA 2 vías) (Figura Suplementaria 4). Una de las variables que estaría determinando esta diferencia sería el grado de inflamación ocasionado. Posterior al daño con los microelectrodos de tungsteno, los índices de inflamación fueron cuantificables únicamente por la emisión de unidades de intensidad de fluorescencia, debido a la imposibilidad de distinguir el número total de leucocitos que se encontraban en el sitio lesionado. Cuando se aplicaron pulsos de láser dos fotones en el nervio de la LLP la concurrencia de los leucocitos al sitio dañado fue menor y las velocidades de regeneración no superaron las 0.5  $\mu\text{m}/\text{min}$  en la fase rápida de regeneración (O'Brien *et al.*, 2009).

En relación a la idea planteada en el párrafo anterior, es sabido que existe un debate respecto al rol benéfico o perjudicial de la inflamación sobre la regeneración de los tejidos. De acuerdo

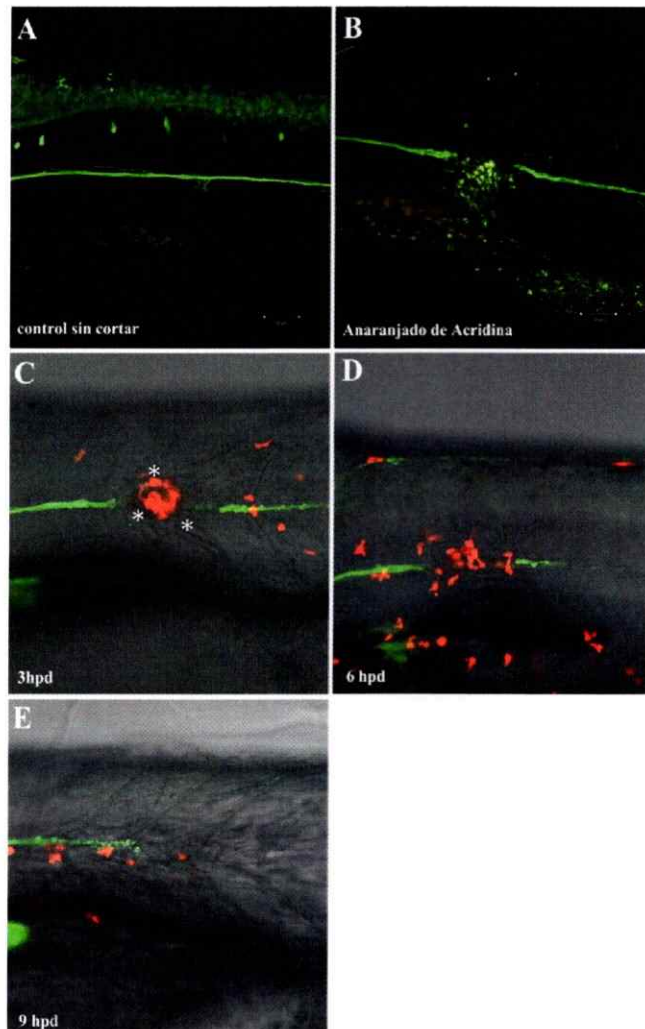


a los resultados obtenidos, pensamos que la inflamación favorece la regeneración de los tejidos. Esta idea se apoya en estudios que han demostrado que los macrófagos que acuden al sitio inflamado secretan factores solubles que promueven la regeneración de tejidos, entre las que destaca la neurotrofina BDNF (Bouhy *et al.*, 2006). Otro de los antecedentes que apoya esta hipótesis se ha resuelto últimamente en nuestro laboratorio. Experimentos de electroablación en neuromastos de larvas de 3 dpf han correlacionado directamente los índices de inflamación con los de regeneración de este órgano mecanosensorial (Sánchez *et al.*, datos no publicados). Este antecedente apoya la propuesta de que las mayores velocidades de regeneración del nervio de la LLP por el sistema de electroablación en relación a la aplicación de pulsos láser dos fotones depende, en parte, del grado de inflamación del tejido lesionado.

Por otra parte, se comprobó la factibilidad de desarrollar ensayos antiinflamatorios luego de la electroablación de tejidos específicos. En cuanto a los resultados obtenidos en esta prueba, la droga antiinflamatoria utilizada inhibió la activación de vías de señalización que promueven la inflamación, como la vía de las ciclooxigenasas (COX) o c-JUN N-terminal kinasa (JNK) (d'Alençon *et al.*, 2010).

## ANEXOS

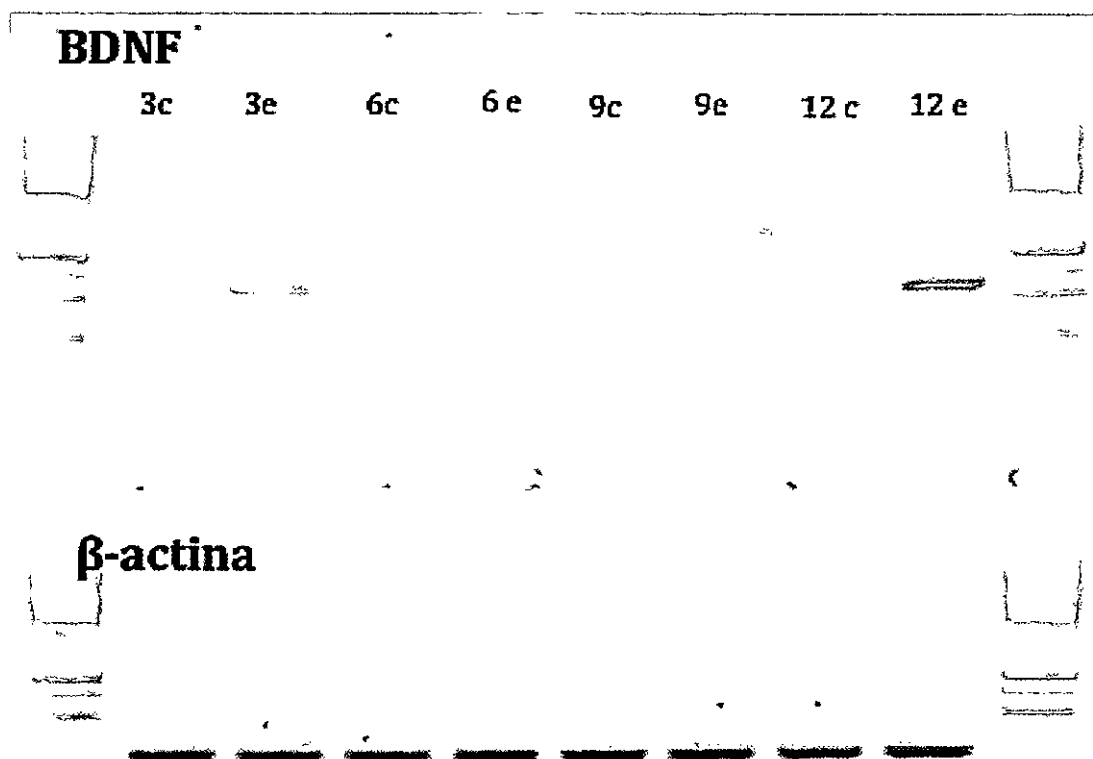
**Figura Suplementaria 1. Caracterización del daño celular luego de la electroablación en el nervio de la LLP.** (A) Larvas transgénicas (*neuroD::GFP*) de 72 hpf que expresan la proteína fluorescente verde en los axones que conforman el nervio de la LLP. (B) La marca de anaranjado de acridina (puntos verdes) demuestra la especificidad del daño en el nervio de LLP luego de la electroablación. (C) 3 hpd. Los asteriscos (blanco) demuestran el daño morfológico de la zona afectada por la electroablación. Simultáneamente se demuestra la infiltración leucocitaria y la regeneración del nervio de la LLP. (D) 6 hpd. El daño morfológico se hace menos perceptible en la zona lesionada. (E) 9 hpd. En este tiempo, ya no hay rastros de tejido dañado en el sitio lesionado. (Aumento 20X, Tamaño de Barra: 50  $\mu$ m).



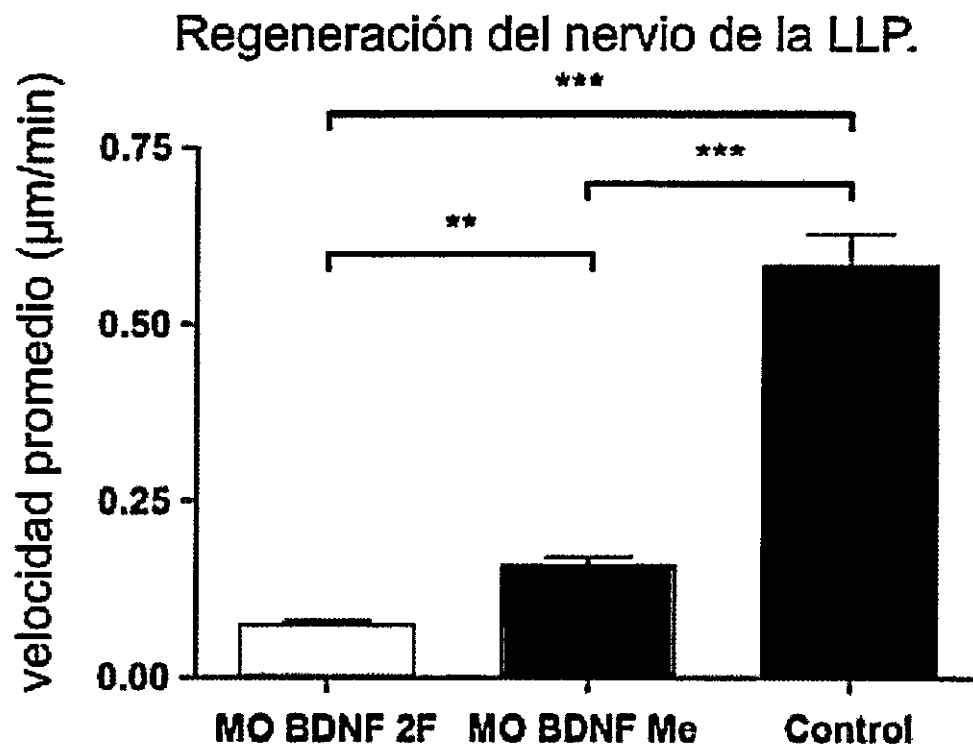
**Figura Suplementaria 2: Análisis cuantitativo de los niveles de expresión de mRNA de BDNF en larvas de pez cebra.** Para cada condición, se evaluaron los patrones de expresión específicos de la neurotrofina en larvas de pez cebra. Para ello, se propusieron dos categorías de marca específica: cerebro y miosepto horizontal. Las fotografías expuestas en la sección de resultados demuestran la expresión característica de cada tiempo. Abreviaciones hpa: horas post-axotomía.(n= 3 experimentos independientes).

| Tratamiento | Número de peces analizados | Marca BDNF + en el cerebro | Marca BDNF + en el miosepto |
|-------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Control     | 17                         | 17                         | 0                           |
| Control (-) | 15                         | 15                         | 0                           |
| 3 hpa       | 21                         | 21                         | 10                          |
| 6 hpa       | 17                         | 17                         | 2                           |
| 9 hpa       | 19                         | 19                         | 0                           |
| 12 hpa      | 16                         | 16                         | 9                           |

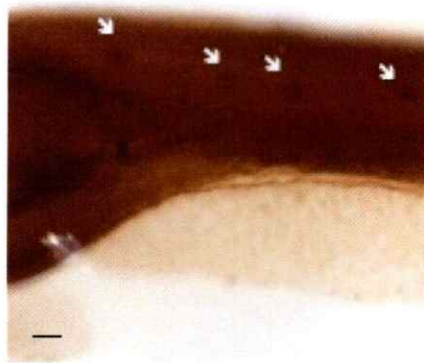
**Figura Suplementaria 3: Productos de amplificación por RT-PCR para *BDNF* y  $\beta$ -*actina*.** Los niveles de expresión para *BDNF* y  $\beta$ -*actina* se muestran para tratamientos axotomizados (e) y sin corte (e). La mayor expresión de *BDNF* se obtuvo a las 3, 6 y 12 hpd en aquellos peces axotomizados en relación a los controles, en tanto que al tiempo de las 9 horas existió disminución de la expresión de la neurotrofina. Los niveles  $\beta$ -*actina* se mantuvieron relativamente constantes en todas las condiciones evaluadas.



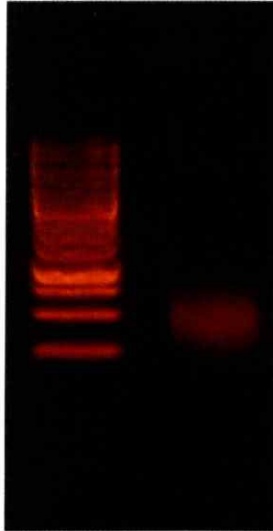
**Figura Suplementaria 4. Comparación de las velocidades \* de regeneración del nervio de la LLP de larvas morfantes para BDNF con dos métodos distintos de axotomía: láser dos fotones y microelectrodos de tungsteno. Peces morfantes para la neurotrofina BDNF axotomizados por dos estrategias distintas fueron monitoreados en su proceso de regeneración entre las 6 y 12 hpd. Durante estos tiempos de regeneración se analizaron las velocidades para cada tramo y mediante análisis estadísticos (ANOVA 2 vías) se estableció la diferencia significativa de las velocidades de regeneración al utilizar las dos estrategias de axotomía. Los resultados se muestran como promedio  $\pm$  error estándar. \*, promedios de las velocidades de regeneración durante el período 6 - 12 hpd.**



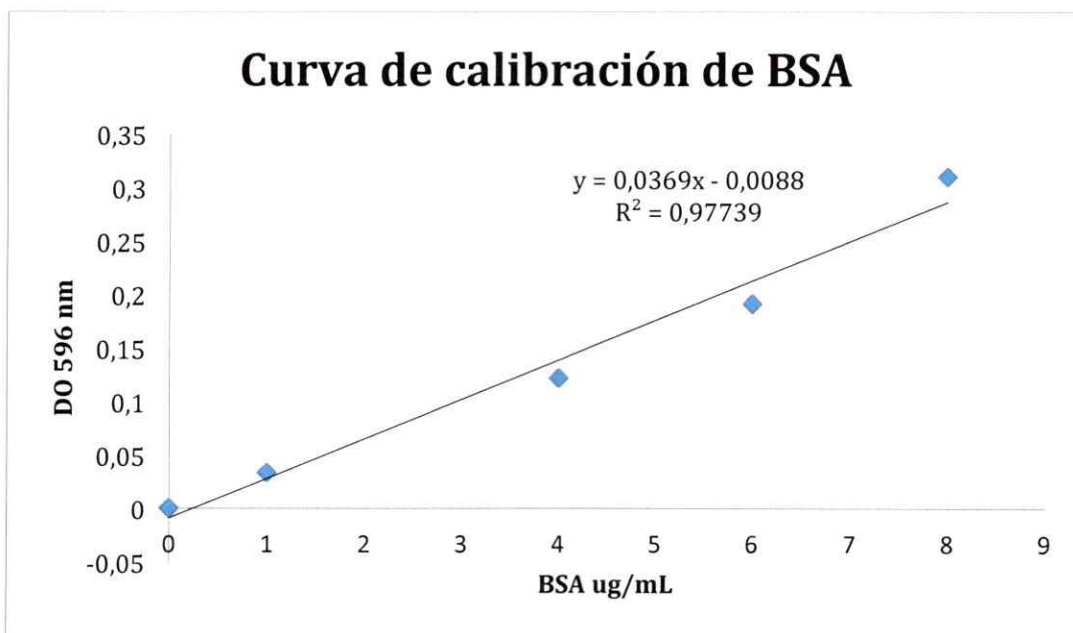
**Figura Suplementaria 5. Inmunohistoquímica contra la detección de la proteína BDNF en peces de 10 dpf.** Los peces de 10 días post-fertilización se marcaron en los neuromastos de los peces, al igual que en la porción cefálica. Únicamente desde este estadio fue posible detectar la expresión de la proteína en el sistema de la línea lateral (flechas blancas). El sitio de detección fue en las células que conformaban los neuromastos de la LLP. A los 3 días no existió detección de la proteína en el sistema de la LLP. (Barra de Tamaño: 100  $\mu\text{m}$ ).



**Figura Suplementaria 6: Sonda de RNA para la detección de BDNF en larvas de pez cebra.** Para la síntesis de la sonda se efectuó la digestión con la enzima *SacI* del clon de BDNF, generando dos fragmentos de 4.4 kB y 2.2 kB. El primer fragmento poseía 760 pb del transcrito hibridante contra BDNF. La sonda fue sintetizada de acuerdo al protocolo establecido por Thiesse *et al.*, (2004) y luego purificada por una columna de afinidad a RNA (RNA probe purification kit, OMEGA) para descartar la presencia de nucleótidos y sales inespecíficas en la sonda hibridante.



**Figura Suplementaria 7: Determinación de la concentración de proteínas de la fracción del sobrenadante del homogenizado de 200 larvas totales de pez cebra.** Las mediciones fueron replicadas 3 veces para las 3 muestras experimentales: silvestre, control *mismatch* y morfante.

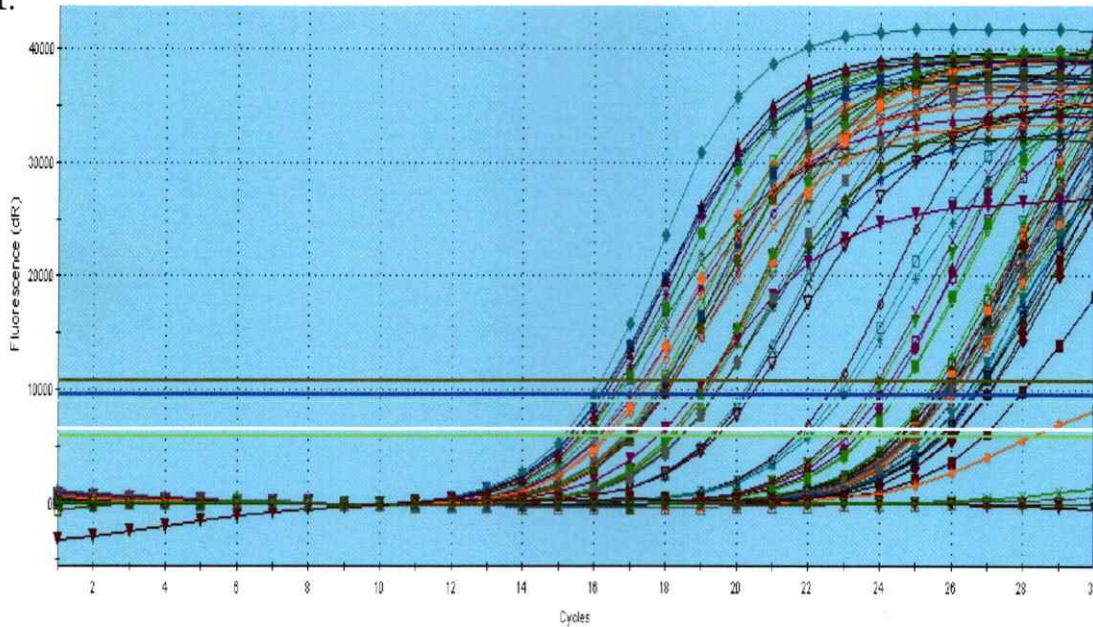


|                        | DO promedio | ug/mL       | stock ug/mL | mg/mL  |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|--------|
| Wildtype (1:10)        | 0,387       | 10,72628726 | 10726,2876  | 10,726 |
| Morfante (1:10)        | 0,563       | 15,49593496 | 15495,934   | 15,495 |
| <i>mismatch</i> (1:10) | 0,397       | 10,99728997 | 10997,289   | 10,997 |

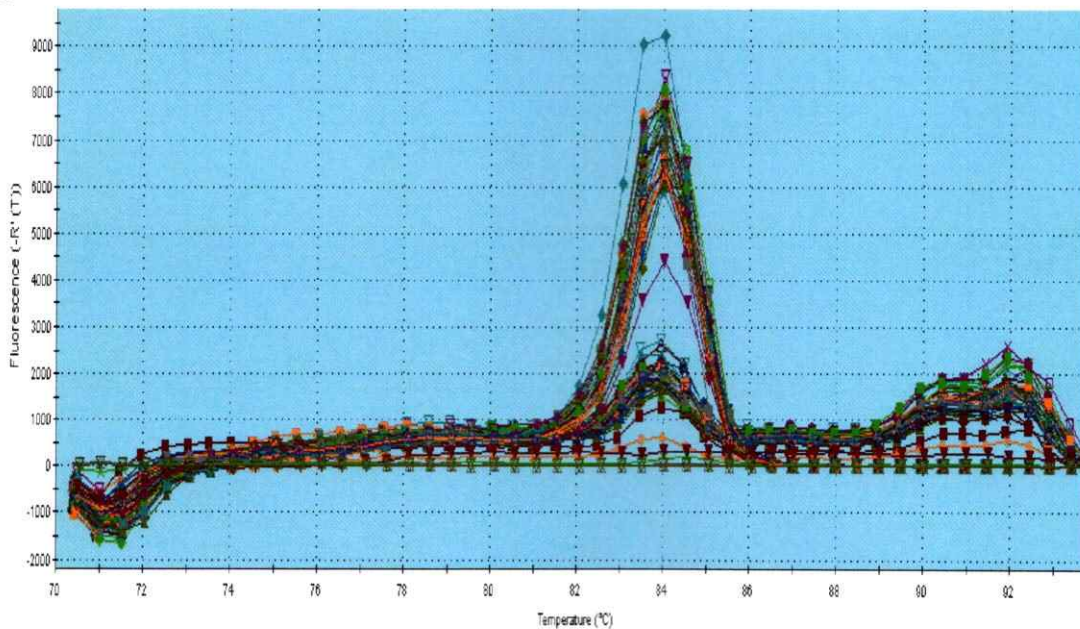


**Figura Suplementaria 8: Curvas de amplificación y disociación para BDNF y  $\beta$ -actina.** El gráfico suplementario 1 muestra las diferencias en los ciclos donde comenzó la amplificación para los genes de BDNF y  $\beta$ -actina, encontrándose los valores CT para el control interno entre el ciclo 13 - 14 y para la neurotrofina entre el 22-26. El gráfico suplementario 2 indica las curvas de disociación de las muestras templado, obteniendo una Tm de 84° C.

1.

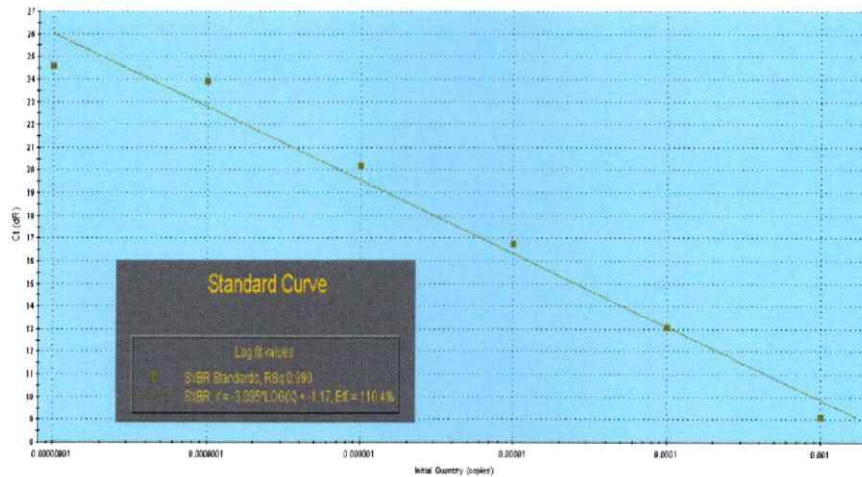


2.

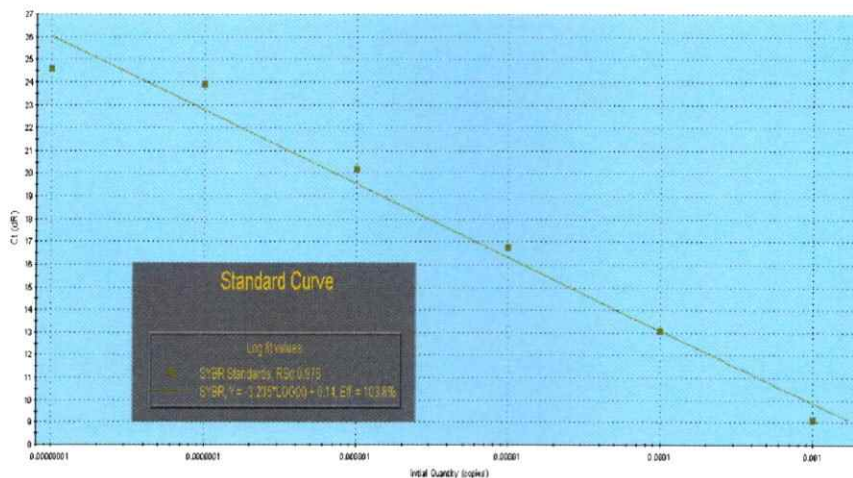


**Figura Suplementaria 9: Rectas para la determinación de la eficiencia de los partidores de BDNF y  $\beta$ -actina.** Las rectas de eficiencia muestran la especificidad de los partidores para la amplificación de los genes de interés en el cDNA templado. Para la determinación de la eficiencia se desarrollaron diluciones seriadas de cDNA de ambos genes amplificados. La eficiencia para  $\beta$ -actina alcanzó un 110,4% y para BDNF un 103,8%, valores procedimentalmente válidos para la determinación de los niveles de expresión de las muestras. (n= 3 experimentos independientes).

Curva de eficiencia  $\beta$ -actina:

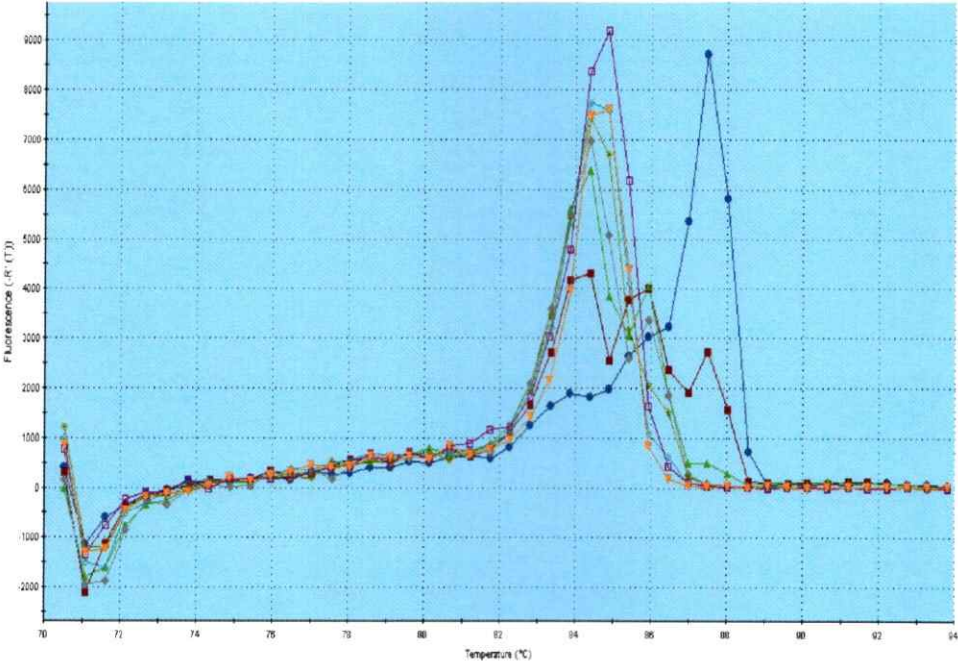


Curva de eficiencia BDNF:

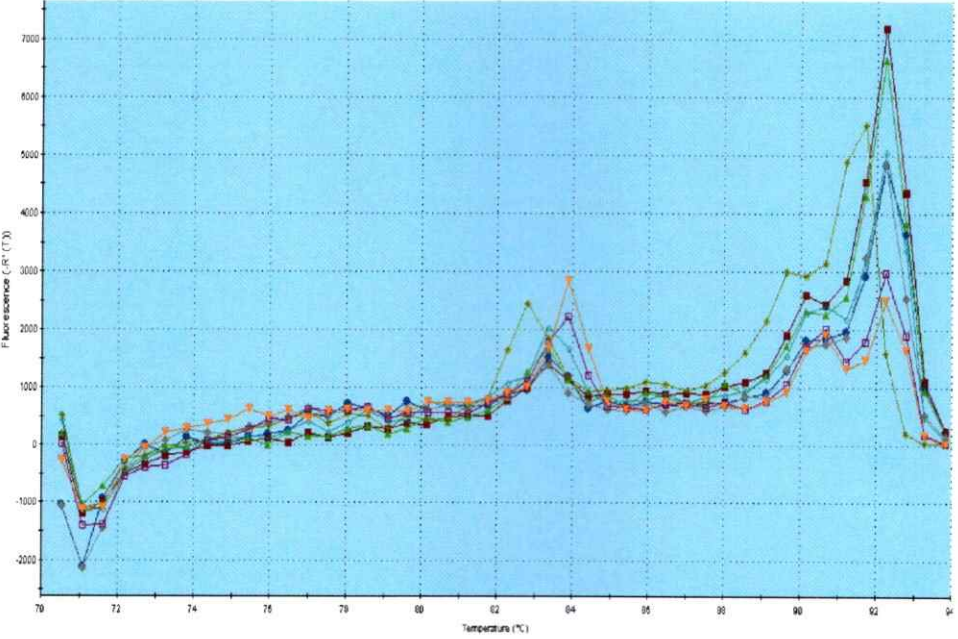




Curva de disociación  $\beta$ - actina:



Curva de disociación BDNF:



## BIBLIOGRAFÍA

Aguayo A.J., Benfey M., David S. 1983. A potential for axonal regeneration in neurons of the adult mammalian nervous system. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 19(4):327-40.

Alrashdan MS., Park JC., Sung MA., Yoo SB., Jahng JW., Lee TH., Kim SJ., Lee JH. 2010. Thirty minutes of low intensity electrical stimulation promotes nerve regeneration after sciatic nerve crush injury in a rat model. *Acta Neurol Belg.* 110(2):168-79.

Barde Y., Edgar A., Thoenen H. 1982 Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBOJ.* 1: 549-553.

Becker C. and Becker T. 2002. Repellent Guidance of Regenerating Optic Axons by Chondroitin\_Sulfate Glycosaminoglycans in Zebrafish. *The Journal of Neuroscience.* 22(3):842-853.

Becker T., Bernhardt R., Reinhard E., Wullmann M., Tongiorgi E., Schachner M. 1998. Readiness of Zebrafish Brain Neurons to Regenerate a Spinal Axon Correlates with Differential Expression of Specific Cell Recognition Molecules. *The Journal of Neuroscience.* 18(15):5789-5803.

Bernhardt RR., Tongiorgi E., Anzini P., Schachner M. 1996. Increased expression of specific recognition molecules by retinal ganglion cells and by optic pathway glia accompanies the successful regeneration of retinal axons in adult zebrafish. *J Comp Neurol.* 376(2):25-32.

Bouhy D., Malgrange B., Multon S., Poirrier AL., Scholtes F., Schoenen J., Franzen R. 2006. Delayed GM-CSF treatment stimulates axonal regeneration and functional recovery in paraplegic rats via an increased BDNF expression by endogenous macrophages. *FASEB J.* 8:1239-41.

Boyd JG., Gordon T. 2002. A dose-dependent facilitation and inhibition of peripheral nerve regeneration by brain-derived neurotrophic factor. *Eur J Neurosci.* 4:613-26.

Boyd JG., Gordon T. 2001. The neurotrophin receptors, trkB and p75, differentially regulate motor axonal regeneration. *J Neurobiol.* 4: 314-25.

Bradke F., Fawcett JW., Spira ME. 2012. Assembly of a new growth cone after axotomy: the precursor to axon regeneration. *Nat Rev Neurosci.* (3):183-93.

Bregman BS., Coumans JV., Dai HN., Kuhn PL., Lynskey J., McAtee M., Sandhu F. 2002. Transplants and neurotrophic factors increase regeneration and recovery of function after spinal cord injury. *Prog Brain Res.* 137:257-73.

- Brösamle C., Halpern E. 2009. Nogo–Nogo receptor signalling in PNS axon outgrowth and pathfinding. *GLIA*. (4) 401–409.
- Camara-Lemarroy CR., Guzman-de la Garza JF, *et al.* 2010. Molecular inflammatory mediators in peripheral nerve degeneration and regeneration. *Neuroimmunomodulation*. 17(5): 314-324.
- Cameron D., Gentile K., Middleton F., Yurco P. 2005. Gene expression profiles of intact and regenerating zebrafish retina. *Molecular Vision*. 11:775-91.
- Canossa M., Griesbeck O., Berninger B., Campana G., Kolbeck R., Thoenen H. 1997. Neurotrophin release by neurotrophins: Implications for activity-dependent neuronal plasticity. *Neurobiology*. 94: 13279–13286.
- Carter, B. D. *et al.* 1996. Selective activation of NF- $\kappa$ B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science*. 272: 542–545.
- Chaisuksunt V., Campbell G., Zhang Y., Schachner M., Lieberman AR., Anderson PN. 2003. Expression of regeneration-related molecules in injured and regenerating striatal and nigral neurons. *J Neurocytol.* 2:161-83.
- Chang W., Hawkes E., Keller C., and Sretavan D. 2010. Axon repair: surgical application at a subcellular scale. *Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*: 2(2): 151–161.
- Chen, Z. L., WM. Yu. 2007. Peripheral regeneration. *Annu Rev Neurosci*. 30:209-233.
- Chen MS, Huber AB, van der Haar ME, Frank M, Schnell L, Spillmann AA, Christ F, Schwab ME. 2000. Nogo is a myelin-associated neurite outgrowth inhibitor and an antigen for monoclonal antibody IN-1. *Nature* 27;403(6768):434-9.
- Cohen A., Bray GM., Aguayo AJ. 1994. Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) increases adult rat retinal ganglion cell survival and neurite outgrowth in vitro. *J Neurobiol.* 25:953–959.
- Coumans JV., Lin TT., Dai HN., MacArthur L., McAtee M., Nash C., Bregman BS. 2001. Axonal regeneration and functional recovery after complete spinal cord transection in rats by delayed treatment with transplants and neurotrophins. *J Neurosci*. 23:9334-44.
- Cui Q., Yip HK., Zhao RC., So KF., Harvey AR. 2003. Intraocular elevation of cyclic AMP potentiates ciliary neurotrophic factor-induced regeneration of adult rat retinal ganglion cell axons. *Mol Cell Neurosci*. 22:49–61.
- d'Alençon CA., Peña OA., Wittmann C., Gallardo VE., Jones RA., Loosli F., Liebel U., Grabher C., Allende ML. 2010 A high-throughput chemically induced inflammation assay in zebrafish. *BMC Biol.* 22;8:151.

- Deng LX., Hu J., Liu N., Wang X., Smith GM., Wen X., Xu XM. 2011. GDNF modifies reactive astrogliosis allowing robust axonal regeneration through Schwann cell-seeded guidance channels after spinal cord injury. *Exp Neurol.* 229(2):238-50.
- Dezawa M., Adachi-Usami E. 2000. Role of Schwann Cells in Retinal Ganglion Cell Axon Regeneration. *Progress in Retinal and Eye Research* Vol. 19, No. 2, pp. (171 – 204).
- Diekmann H., Anichtchik O., Fleming A., Futter M., Goldsmith P., Roach A., Rubinsztein DC. 2009. Decreased BDNF levels are a major contributor to the embryonic phenotype of huntingtin knockdown zebrafish. *J Neurosci.* 29 (5):1343-9.
- Fenrich K., Gordon T. 2004. Axonal Regeneration in the Peripheral and Central Nervous Systems –Current Issues and Advances. *Can. J. Neurol. Sci.* 31: 142-156.
- Frostick SP., Yin Q., Kemp GJ. 1998. Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery.* 7:397-405.
- Funakoshi H., Frisé J., Barbany G., Timmusk T., Zachrisson O., Verge VM., Persson H. 1993. Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *J Cell Biol.* 2:455-65.
- Gaillard S., Nasarre C., Gonthier B., Bagnard D. 2005. The cellular and molecular basis of axonal growth. *Rev Neurol.* 2:153-72.
- Gao Y., Deng K., Hou J., Bryson JB, Barco A., Nikulina E., Spencer T., Mellado W., Kandel ER, Filbin MT. 2004. Activated CREB is sufficient to overcome inhibitors in myelin and promote spinal axon regeneration *in vivo*. *Neuron.* 44(4):609-21.
- Gaudet AD., Popovich PG., Ramer MS. 2011. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation.* 30;8:110.
- Germanà A., Sánchez-Ramos C., Guerrero MC., Calavia MG., Navarro M., Zichichi R., García-Suárez O., Pérez-Piñera P., Vega JA. 2010a. Expression and cell localization of brain-derived neurotrophic factor and TrkB during zebrafish retinal development. *J Anat.* 217(3):214-22.
- Germanà A., Laurà R., Montalbano G., Guerrero MC., Amato V., Zichichi R., Campo S., Ciriaco E., Vega JA. 2010b. Expression of brain-derived neurotrophic factor and TrkB in the lateral line system of zebrafish during development. *Cell Mol Neurobiol.* 30(5):787-93.
- Gilmour D., Knaut H., Maischein HM., Nüsslein-Volhard C. 2004. Towing of sensory axons by their migrating target cells *in vivo*. *Nat Neurosci.* 7(5):491-2.
- Gilmour D., Maischein H., Nusslein-Volhard. 2002. Migration and function of a glial subtype in the vertebrate peripheral nervous system. *Neuron.* 34: 577-588.
- Gompel N., Cubedo N., Thisse C., Thisse B., Dambly - Chaudière C., Ghysen A. 2001. Pattern formation in the lateral line of zebrafish. *Mechanisms of development.* 105:69-77.

Gordon T., Amirjani N., Edwards DC., Chan KM. 2010. Brief post-surgical electrical stimulation accelerates axon regeneration and muscle reinnervation without affecting the functional measures in carpal tunnel syndrome patients. *Exp Neurol.* 1:192-202.

Grant K., Raible D., Piotrowski T. 2005 . Regulation of latent sensory hair cells precursors by glia in the zebrafish lateral line. *Neuron.* 45:69-80.

Ghysen A., Dambly - Chlaudière C. The lateral line microcosmos (2007). *Genes development.* 21: 2118-2130.

Hall C., Flores MV, *et al.* 2007. The zebrafish lysozyme C promoter drives myeloidspecific expression in transgenic fish. *BMC Dev Biol.* 7: 42.

Hashimoto M., Heinrich G. 1997. Brain-derived neurotrophic factor gene expression in the developing zebrafish. *Int J Dev Neurosci.* 15(8):983-97.

Hernández PP., Moreno V., Olivari FA., Allende ML. 2006 Sub-lethal concentrations of waterborne copper are toxic to lateral line neuromasts in zebrafish (*Danio rerio*). *Hear Res.* 213(1-2):1-10.

Huang E., Reichardt L.(2003) Trk receptors: roles in signal transduction. *Annu Rev. Biochem.* 72: 609-942.

Huynh G., Heinrich G. 2001. Brain-derived neurotrophic factor gene organization and transcription in the zebrafish embryo. *International Journal of Developmental Neuroscience.* 19 (7) : 663-673.

Ishikawa H., Takano M., Matsumoto N., Sawada H., Mimura O., Dezawa M.2005. Effect of GDNF gene transfer into axotomized retinal ganglion cells using in vivo electroporation with a contact lens-type electrode *Gene Ther.* 12(4):289-98.

Kandel ER, Squire LR. 2000. Neuroscience: breaking down scientific barriers to the study of brain and mind. *Science.*290(5494):1113-20.

Kim PD., Hayes A., Amin F., Akelina Y., Hays AP., Rosenwasser MP.2010. Collagen nerve protector in rat sciatic nerve repair: A morphometric and histological analysis. *Microsurgery.* 30(5):392-6.

Kirsch M., Campos Friz M., Vougioukas VI., Hofmann HD. 2009. Wallerian degeneration and axonal regeneration after sciatic nerve crush are altered in ICAM-1-deficient mice. *Cell Tissue Res.* 1:19-28.

Klinger M., Taylor JS., Oertle T., *et al.*, 2004. Identification of Nogo-66 receptor (NgR) and homologous genes in fish. *Mol Biol Evol.* 1:76-85.

Kitayama M., Ueno M., Itakura T., Yamashita T. 2011. Activated Microglia Inhibit Axonal Growth through RGMa. *PLoS ONE* 6(9): e25234. doi:10.1371/ journal.pone.0025234.

- Kobayashi NR, Fan DP, Giehl KM, Bedard AM, Wiegand SJ, Tetzlaff WJ .1997. BDNF and NT-4/5 prevent atrophy of rat rubrospinal neurons after cervical axotomy, stimulate GAP-43 and Talpha1-tubulin mRNA expression, and promote axonal regeneration. *Neuroscience*. (24):9583-95.
- Koeberle PD., Gauldie J., Ball AK. 2003. Effects of antiinflammatory cytokine gene transfer on the survival of axotomized retinal ganglion cells in vivo: comparison of IL-10, IL-4 and TGF-beta. *Neuroscience*, to appear.
- Kottis V., Thibault P., *et al.*. 2002. Oligodendrocyte-myelin glycoprotein (OMgp) is an inhibitor of neurite outgrowth *J Neurochem*. 6:1566-9.
- Kunik D., Dion C., Ozaki T., Levin LA., Costantino S. 2011. Laser-based single-axon transection for high-content axon injury and regeneration studies. *PLoS One*.6(11):e26832.
- Le Guellec D., Morvan-Dubois G., Sire JY. 2004. Skin development in bony fish with particular emphasis on collagen deposition in the dermis of the zebrafish (*Danio rerio*). *Int J Dev Biol* 48(2-3):217-231.
- Liu T., Xu J., Chan BP., Chew SY. 2012. Sustained release of neurotrophin-3 and chondroitinase ABC from electrospun collagen nanofiber scaffold for spinal cord injury repair. *J Biomed Mater Res A*. 100(1):236-42.
- Liu HW., Cheng B., *et al.*,2010. The effect of angiotensin II on phosphoinositide-3 kinase/Akt cascade in cultured fibroblasts derived from patients with hypertrophic scars. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*. 26(1):57-60.
- Liu RY., Snider WD. 2001. Different signaling pathways mediate regenerative versus developmental sensory axon growth. *Journal Neuroscience*. 21(17):RC164.
- Lonze BE., Ginty DD. 2002. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron*. 35(4):605-23.
- López-Schier H., Husdpth A. 2005. Supernumerary neuromast in the posterior lateral line of zebrafish lateral line lacking peripheral glia. *Prot. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 1496-1501.
- Lorenzetto E., Panteri R., Marino R., Keller F., Buffelli M. 2008. Impaired nerve regeneration in reeler mice after peripheral nerve injury. *E J Neurosci*: 27(1):12-9.
- Lykissas M., Batistatou A., Charalabopoulos K., Beris A. 2007. The Role of Neurotrophins in Axonal Growth, Guidance, and Regeneration. *Current Neurovascular Research*. 4:143-151.
- Marsick BM., Letourneau PC. 2011. Labeling F-actin barbed ends with rhodamine-actin in permeabilized neuronal growth cones. *J Vis Exp*. 17(49). pii: 2409. doi: 10.3791/2409.



- Mathias JR., Perrin BJ., Liu TX., Kanki J., Look AT., Huttenlocher A. Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish. 2006. *J Leukoc Biol.* 80(6):1281-8.
- May F., Vroemen M., *et al.* 2005. Nerve replacement strategies for cavernous nerves. *Eur Urol* .48(3): 372-378.
- McKerracher L., David S., Jackson DL., Kottis V., Dunn RJ., Braun PE. 1994. Identification of myelin-associated glycoprotein as a major myelin-derived inhibitor of neurite growth. *Neuron.* Oct;13(4):805-11.
- Metcalfé WK. 1985. Sensory neuron growth cones comigrate with posterior lateral line primordial cells in zebrafish. *J Comp Neurol.* 238(2):218-24.
- Meberg PJ., Ono S., Minamide LS., Takahashi M., Bamberg JR. 1998. Actin depolymerizing factor and cofilin phosphorylation dynamics: response to signals that regulate neurite extension. *Cell Motil Cytoskeleton.* 2:172-90.
- Mo W and Nicolson T. 2011 .Both pre- and postsynaptic activity of Nsf prevents degeneration of hair-cell synapses. *PLoS One.* 6(11):e27146.
- Morton P., Johnstone J., Ramos A., Liebl D., *et al.* 2012. Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation in Schwann Cells Regulates Regeneration and Remyelination. 2012. *GLIA* 60:639–650.
- Mowla, S. J. *et al.* 1999. Differential sorting of nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor in hippocampal neurons. *J. Neurosci.* 19: 2069–2080.
- Nagahara A., Tuszynski M. 2010. Potential therapeutic uses of BDNF in neurological and psychiatric disorders. *Nature reviews.* 10: 209-231.
- Nestler EJ .2001. Neurobiology. Total recall-the memory of addiction. *Science.* 292(5525):2266-7.
- Obholzer N., Wolfson S., Trapani JG., Mo W., Nechiporuk A., Busch-Nentwich E., Seiler C., Sidi S., Söllner C., Duncan RN., Boehland A., and Nicolson T. 2008. Vesicular glutamate transporter 3 is required for synaptic transmission in zebrafish hair cells. *J. Neurosci.* 28(9): 2110-2118.
- O'Brien G., Rieger S., Wang F., Smolen G., Gonzalez R., Buchanan J., Sagasti A. 2011. Coordinate development of skin cells and cutaneous sensory axons in zebrafish, *The Journal of Comparative Neurology.* DOI 10.1002/cne.22791.
- O'Brien GS., Rieger S., Martin SM., Cavanaugh AM., Portera-Cailliau C., Sagasti A. 2009. Two-photon axotomy and time-lapse confocal imaging in live zebrafish embryos. *J Vis Exp.* 16(24). pii: 1129. doi: 10.3791/1129.

- Pardo-Martin C., Chang TY., Koo BK, Gilleland CL., Wasserman SC., Yanik MF. 2010. High-throughput in vivo vertebrate screening. *Nat Methods*. (8):634-6.
- Paves H., Sacarman M. 1997. Neurotrophins as in vitro growth cone guidance molecules for embryonic sensory neurons. *Cell Tissue Res*. 290(2):285-97.
- Ramon y Cajal S. 1928. Cajal's degeneration and regeneration of the nervous system. *Oxford University press*: pages 734-760.
- Raphael AR., Perlin JR., Talbot WS. 2010. Schwann cells reposition a peripheral nerve to isolate it from postembryonic remodeling of its targets. *Development*. 137(21):3643-9.
- Rieger S, Sagasti A. 2011. Hydrogen peroxide promotes injury-induced peripheral sensory axon regeneration in the zebrafish skin. *PLoS Biol*. 9(5):e1000621.
- Rolls A., Shechter R., London A., Segev Y., Jacob-Hirsch J., et al. 2008. Two faces of chondroitin sulfate proteoglycan in spinal cord repair: A role in microglia/ macrophage activation. *PLoS Med* 5(8): e171. doi:10.1371/journal.pmed.0050171.
- Rosen JN., Sweeney MF., Mably JD. 2009. Microinjection of zebrafish embryos to analyze gene function. *J Vis Exp*. 9(25).
- Sahenk Z., Oblinger J., Edwards C. 2008. Neurotrophin-3 deficient Schwann cells impair nerve regeneration. *Exp Neurol*. 212(2):552-6.
- Sánchez-Migallón MC., Nadal-Nicolás FM., Jiménez-López M., Sobrado-Calvo P., Vidal-Sanz M., Agudo-Barriuso M. 2011. Brain derived neurotrophic factor maintains Brn3a expression in axotomized rat retinal ganglion cells *Exp Eye Res* 92(4):260-7.
- San José I., Vázquez E., García-Atares N., Huerta JJ., Vega JA., Represa J. 1997 (a). Differential expression of microtubule associated protein MAP-2 in developing cochleovestibular neurons and its modulation by neurotrophin-3. *Int J Dev Biol*. 3 :509-19.
- San José I., Vázquez E., García-Atarés N., Rodríguez S., Vega JA., Represa J. 1997 (b) Expression of the cytoskeletal protein MAP5 and its regulation by neurotrophin 3 (NT3) in the inner ear sensory neurons. *Anat Embryol*. 3:299-310.
- Sarrazin A., Nuñez V., Sapède D., Tassin V., Dambly – Chaudière C., Ghysen A. 2010. Origin and early development of the posterior lateral line. *The journal of neuroscience*. 30: 8234-8244.
- Sato T., Fujikado T., Lee TS., Tano Y. 2008 . Direct effect of electrical stimulation on induction of brain-derived neurotrophic factor from cultured retinal Müller cells. *Invest Ophthalmol Visual Science*. (10):4641-6.
- Schmittgen TD., Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc*. 3(6):1101-8.

- Schuster K., Dambly-Chaudière C., Ghysen A. 2010. Glial cell line-derived neurotrophic factor defines the path of developing and regenerating axons in the lateral line system of zebrafish. *PNAS* 107. (45): 19531–19536.
- Schwalb JM., Gu MF., Stuermer C., Bastmeyer M., Hu GF., Boulis N., Irwin N., Benowitz LI. 1996. Optic nerve glia secrete a low-molecular-weight factor that stimulates retinal ganglion cells to regenerate axons in goldfish. *Neuroscience*. 72:901–910.
- Schwalb JM., Boulis NM., Gu MF., Winickoff J., Jackson PS., Irwin N., Benowitz LI. 1995. Two factors secreted by the goldfish optic nerve induce retinal ganglion cells to regenerate axons in culture. *J Neurosci*. 15:5514–5525.
- Shepherd IT., Pietsch J., Elworthy S., Kelsh RN., Raible DW. 2004. Roles for GFRalpha1 receptors in zebrafish enteric nervous system development. *Development*. 131 (1):241-9.
- Shibata SB., Cortez SR., Beyer LA., Wiler JA., Di Polo A., Pflingst BE., Raphael Y. 2010. Transgenic BDNF induces nerve fiber regrowth into the auditory epithelium in deaf cochleae. *Exp Neurol*. 2:464-72.
- Smith GM., Falone AE., Frank E. 2011. Sensory axon regeneration: rebuilding functional connections in the spinal cord. *Trends Neurosci*. Epub ahead of print.
- Simon M., Porter R., Brown R., Coulton GR., Terenghi G. 2003. Effect of NT-4 and BDNF delivery to damaged sciatic nerves on phenotypic recovery of fast and slow muscles fibres. *Eur J Neurosci*. 9:2460-6.
- Smith GM., Falone AE., Frank E. 2011. Sensory axon regeneration: rebuilding functional connections in the spinal cord. *Trends Neurosci*. Nov 30. Epub ahead of print.
- Soppet D., et al. 1991. The Neurotrophic factors BDNF and NT3 are ligands for the TrkB tyrosine kinase receptor. *Cell*. 65: 895-903.
- Spencer TK., Mellado W., Filbin MT. 2008. BDNF activates CaMKIV and PKA in parallel to block MAG-mediated inhibition of neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci*.(1):110-6.
- Stewart WJ., Mc Henry MJ. (2010) Sensing the strike of a predator fish depends on the specific gravity of a prey fish. *Journal experimental biology*. 15: 3796-3799.
- Stuermer CA .2011 . Microdomain-forming proteins and the role of the reggies/flotillins during axon regeneration in zebrafish. *Biochim Biophys*. (3):415-22.
- Thisse B., Thisse C. 2004. Fast Release Clones: A High Throughput Expression Analysis. *ZFIN Direct Data Submission*. ZFIN ID: ZDB-PUB-040907-1.
- Vargas B. and Barres A. 2007. Why Is Wallerian Degeneration in the CNS So Slow?. *Annual Review of Neuroscience*. 30: 153-179.

- Veldman M., Bembem M., Thompson R., Goldman D. 2007. Gene expression analysis of zebrafish retinal ganglion cells during optic nerve regeneration identifies KLF6a and KLF7a as important regulators of axon regeneration. *Developmental Biology*. 312: 596–612.
- Villegas R. 2011. Caracterización de la regeneración del nervio de la línea lateral en larvas de pez cebra. 2011. Tesis Doctoral.
- Wang KC., Koprivica V., Kim JA., Sivasankaran R., Guo Y., Neve RL., He Z. 2002 Oligodendrocyte-myelin glycoprotein is a Nogo receptor ligand that inhibits neurite outgrowth. *Nature*. 417: 941-4.
- Wong ST., Henley JR., Kanning KC., Huang KH., Bothwell M. 2002. p75(NTR) and Nogo receptor complex mediates repulsive signaling by myelin-associated glycoprotein. *Nat Neurosci*. 12:1302-8.
- Yang Y., Xie Y., Chai H., Fan M., Liu S., Liu H., Bruce I., Wu W. 2006. Microarray analysis of gene expression patterns in adult spinal motoneurons after different types of axonal injuries. *Brain Research*. 1075(1):1-12.
- Yu Y., Cristofanilli M., Valiveti A., Ma L., Yoo M., Morellini F., Schachner M. 2011. The extracellular matrix glycoprotein tenascin-C promotes locomotor recovery after spinal cord injury in adults zebrafish. *Neuroscience*. 183: 238–250.
- Zhao T., Qi Y., Li Y., Xu K. 2011. PI3 Kinase regulation of neural regeneration and muscle hypertrophy after spinal cord injury. *Mol Biol Rep*. Jul 1. [Epub ahead of print].
- Zhang JY., Luo XG., Xian CJ., Liu ZH., Zhou XF. 2000. Endogenous BDNF is required for myelination and regeneration of injured sciatic nerve in rodents. *Eur J Neurosci*. 12: 4171-80.