

UCH-FC
MAB-B
A246
C.1

**Estudio de la regeneración de vasos intersegmentales en un
modelo de larva 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

Geraldine Del Carmen Aedo Vielma

Agosto, 2017

**Director de Tesis: Dr. Miguel Allende Connelly
Co-Director de Tesis: Dr. Tomás Egaña Erazo**



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la candidata.

GERALDINE DEL CARMEN AEDO VIELMA

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 28 de Julio del 2017

Director de Tesis:
Dr. Miguel Allende Connelly

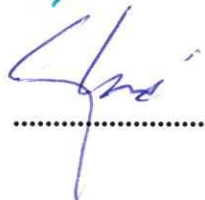


Co-Director de Tesis:
Dr. Tomás Egaña Erazo

Comisión de Evaluación de la Tesis
Dr. Alejandro Roth Metcalfe



Dr. Álvaro Glavic Maurer



DEDICATORIA

A mi ángel en el cielo, mi padre y mi ancla en la tierra, mi familia.

BIOGRAFÍA



Nací en la ciudad de Concepción Chile, un 22 de Julio de 1988. Soy la menor de 4 hermanos; Pedro, Poli y Ximena hija dos padres maravillosos; Luis Aedo Arias y Remigia del Carmen Vielma Salazar. Mis padres me tuvieron de avanzada edad, para ese entonces mis hermanos ya estaban en enseñanza media y uno de ellos en la universidad. Por cierto, este nacimiento para mi familia significó modificar sus vidas en varios aspectos, turnándose para cuidarme, ir a dejarme al colegio, ayudarme en las tareas e ir a dejarme a mis actividades entre ellas gimnasia. Fue en esta última disciplina que logré ser campeona nacional en el elemento de viga a los 10 años. La reflexión que hago a partir de este primer gran logro tiene como actores estelares a mi familia, a los que por la diferencia de edad han sido mis dulces consejeros y mi refugio. A los 12 años nos fuimos a vivir con mis padres a la ciudad de Pucón, donde viví una infancia y adolescencia hermosas, crecí rodeada de naturaleza donde al despertar veía todos los días al lago Villarrica. Comí frutos de los árboles de mi propio patio, tuve una perrita hermosa llamada Blue, hice muchos amigos, mis paseos de fin de semana eran siempre a las montañas, lagos, ríos y Volcán Villarrica. Con esto quiero decir que fui tremendamente bendecida y feliz.

Luego ingresé a la hermosa Universidad de Concepción de la cual egresé el año 2013. Esta fue una etapa maravillosa en mi vida. Aprendí, crecí, hice amigos y viví lecciones de vida muy valiosas. Por todas estas razones me considero una privilegiada y agradecida de la vida, y considero que tengo lo que una persona podría querer en su vida: un pasado y presente cargado de cariño y bendiciones.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia, a mis padres Luis Aedo y Remigia Vielma, a mis hermanos Pedro, Poli y Ximena, y su mejor regalo, sus hijos mis queridos sobrinos, Maximiliano Consuelo, Simón, Valentina y Florencia. Por su apoyo y cariño incondicional, por darme la confianza y apoyo incondicional en todas mis etapas y desiciones y sobre todo a que siempre me alentaron creyendo en mi capacidad.

A Diego Rojas, mi compañero en gran parte de este camino. Quiero agradecer tu amor, tu apoyo incondicional en esta etapa, donde hemos aprendido juntos y estoy feliz de eso. Sin ti este período no habría sido fácil, gracias. Agradezco también a su familia por el gran corazón que tienen.

A Miguel Allende, mi tutor por su guía, sus consejos su buena disposición y su excelente corazón. Por que nunca perdió la confianza en mi y quien me enseñó al noble modelo pez cebra.

A Tomás Egaña, mi co-tutor por su guía, entusiasmo en la entrega de conocimiento y siempre buena disposición.

Al laboratorio del Dr. Brant Weinstein del laboratorio en el cual realicé mi pasantía en NIH Estados Unidos, en especial a Marina Venero Galanternik y al Dr. Weinstein por su apoyo académico y experimental, su cariño y alegría.

A los miembros de todo el laboratorio de biología del desarrollo, constituido por los alumnos de "V.P", "A.G." y "M.A" por su apoyo, amistad y excelentes momentos, especialmente a Maymi Chávez, Cristina Muñoz y Andrea González por su amistad, apoyo y trabajo codo a codo.

A Florencio Espinoza, nuestro querido "Floro", un hombre inigualable, el consejero y amigo de muchos. No tengo como agradecer tu apoyo, cariño y sinceridad. Quiero dar mis agradecimientos también a Juanito, don Victor, Pamela y Dieguito, por su alegría, entrega y velar siempre por el buen estado de los peces y bioterio.

Por último quiero agradecer por tantas alegrías que nos hacen pasar nuestras mascotas: "Fridín" y "Benito".

INDICE DE MATERIAS

INDICE DE MATERIAS	6
LISTA DE TABLAS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	10
RESUMEN.....	11
ABSTRACT	12
INTRODUCCIÓN	13
Desarrollo vascular en pez cebra.....	13
Regulación de la formación de vasos sanguíneos en el pez cebra	16
Modelos descritos para el estudio del desarrollo vascular	17
Ventajas del estudio in vivo del sistema vascular en el pez cebra.....	19
Regeneración vascular en pez cebra	23
HIPÓTESIS	24
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Obtención y crecimiento de larvas de pez cebra.....	25
Electroablación de vasos sanguíneos	26
Ablación por láser multifotón y registro de la regeneración	29
Análisis estadístico.....	33
RESULTADOS.....	34
Generación de daño por electroablación en Vasos Intersegmentales de larvas de pez cebra	34

Generación de daño por fotoablación en Vasos Intersegmentales (ISV) de larvas de pez cebra.....	39
Seguimiento de la regeneración de un ISV posterior al daño provocado por electroablación.	45
Reclutamiento de neutrófilos hacia la zona dañada.	50
DISCUSIÓN.....	52
Los vasos intersegmentales del pez cebra son una poderosa herramienta para estudiar el comportamiento vascular luego del daño tisular.....	52
Los vasos intersegmentales regeneran luego de provocar un daño de distinta magnitud.	53
Los vasos intersegmentales no recapitulan la dirección de crecimiento del desarrollo durante la regeneración.....	54
La dinámica de regeneración de la arteria y la vena es distinta e independiente de la magnitud de daño.	58
Durante la regeneración del ISV se produjo migración de células endoteliales hacia la zona de daño. ...	59
El comportamiento resolutivo de la inflamación esta relacionado a la intensidad de daño sobre los ISV y el tejido adyacente.	61
CONCLUSIONES.....	62
PROYECCIONES FUTURAS	63
BIBLIOGRAFÍA	64

LISTA DE TABLAS

- **Tabla 1:** Líneas transgénicas generadas para el estudio del sistema vascular. Adaptado de Chávez et al. 2016
- **Tabla 2:** Líneas transgénicas de pez cebra utilizadas en esta tesis, tipos celulares marcados y tipo de marca.
- **Tabla 3:** Comportamiento, viabilidad y daño en el tejido del músculo posterior a la electroablación de un ISV en larvas de pez cebra
- **Tabla 4:** Comportamiento, viabilidad y longitud promedio del daño inducido en un ISV por la configuración

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo del sistema vascular temprano y tardío.

Figura 2. Disposición e implementación del equipo de electroablación.

Figura 3. Configuración y disposición de las muestras para la ablación y posterior registro en cámara de flujo por *time lapse*.

Figura 4. Caracterización del daño por electroablación sobre la red vascular y la superficie de la larva de pez cebra.

Figura 5. Caracterización del daño sobre la musculatura adyacente posterior a la electroablación dirigido a un ISV.

Figura 6. Caracterización del daño por fotoablación sobre la red vascular y la superficie del embrión.

Figura 7. Caracterización del daño inducido por fotoablación sobre el tejido muscular que subyace al ISV.

Figura 8. Proyección 3D del daño inducido por fotoablación sobre una célula endotelial intermedia dentro de un ISV.

Figura 9. Extensión del lumen de los ISV de identidad arterial y venosa posterior al daño por electroablación.

Figura 10. Registro y caracterización de la regeneración por *time lapse* de los ISV provenientes de la arteria y la vena posterior al daño por fotoablación en 12 larvas.

Figura 11. Inflamación por neutrófilos de la zona que subyace al daño posterior a electroablación y fotoablación sobre un ISV.

Figura 12. Desarrollo de los vasos intersegmentales ISVs.

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

°C	:Grados Celsius
μA	:micro Amperios
μm	: micrómetros
dpf	: Días post fertilización
E3	:Medio para crecimiento de embriones
GFP	: Proteína fluorescente verde
Cherry	: Proteína fluorescente roja
mpo	: promotor de enzima mieloperoxidasa
hpd	: Horas post daño
dpd	: Días post fertilización
hpf	: Horas post fertilización
min	: minutos
h	: horas
p/v	:Concentración peso/volumen
PBS	: Tampón fosfato salino
PFA	: Paraformaldhído
ISVs	: Vasos intersegmentales

RESUMEN

Introducción: El desarrollo y regeneración de distintos órganos ha sido ampliamente documentado en distintos modelos de vertebrados, entre ellos el pez cebra. Pero los procesos involucrados durante la regeneración de vasos sanguíneos en larvas de pez cebra, aún no han sido dilucidados. Para estudiar el comportamiento de las células endoteliales *in vivo* dañamos una célula medial dentro del vaso intersegmental (ISV) de la larva. **Materiales y métodos:** Comparamos el método de electroablación y fotoablación sobre los vasos intersegmentales de las larvas doble transgénico *Tg(Fli:GFP; Kdrl:nCherry)* de 3 dpf (días post fertilización). Seguimos el comportamiento de regeneración del vaso intersegmental en distintos tiempos y evaluamos el comportamiento celular. **Resultados:** Hemos desarrollado un método reproducible para inducir daño sobre un vaso intersegmental y sobre una célula endotelial del mismo, a los 3 dpf. Notamos que posterior al daño por electroablación el vaso intersegmental regenera dentro de 20 a 24 horas, y la célula dañada por fotoablación regenera dentro de 8 a 10. Observamos que la regeneración de estas estructuras endoteliales es promovido por la migración de células desde los vasos adyacentes. Sin embargo no podemos descartar la contribución de otros tipos de células, lo cual es un aspecto que actualmente sigue en desarrollo. **Discusion:** Debido a la versatilidad y facilidad de nuestros protocolos de ablación, es posible estudiar el comportamiento de diferentes tipos de células durante la regeneración de los vasos sanguíneos. Nuestro trabajo puede tener aplicaciones en enfermedades del corazón, accidentes cerebrovasculares, isquemia y otras patologías que implican la regeneración del tejido y la vascularización.

ABSTRACT

Introduction: Development and regeneration of various organs in the zebrafish have been extensively described, but the mechanisms of vascular regeneration have not been addressed. Our interest is focused on the cellular response to damage to blood vessels. To study the behavior of cells *in vivo* we use the medial cell on intersegmental blood vessels the trunk of larvae. **Material and methods:** We compare two method to ablated intersegmental blood vessels in *Tg(Fli1a:GFP; Kdrl:ncherry)* double transgenic at 3dpf (days post fertilization) larvae using a electroablation setup and multiphoton scope. We followed the behavior of intersegmental vessels at different time intervals and assessed cell movements. **Results:** We have developed a method to reproducibly ablate a single intersegmental blood vessel in 3 dpf larvae. After ablation, we observe complete absence of the cell. However, the vessel regenerates after 20-24 hours, for electroablation, and 8-10 hours for fotoablation technique. We have observed that regeneration of the vessel involves the contribution of at least two of the surviving endothelial cells located adjacent to the damaged area. We cannot rule out the involvement of other cells, an aspect currently being addressed. **Discussion:** Due to the versatility and ease of our ablation protocol, it is possible to study the behavior of different cell types during blood vessel regeneration. Our work may have applications in heart disease, stroke, ischemia and other pathologies involving regeneration of tissue and vascularization.

INTRODUCCIÓN

Desarrollo vascular en pez cebra

La formación del sistema vascular es uno de los primeros eventos en la organogénesis (Coultas *et al.* 2005). Para los embriones de vertebrados en general los vasos sanguíneos permiten el crecimiento de los órganos, ya que proporcionan el oxígeno, transporte de nutrientes necesario para su correcto crecimiento y remueven los residuos metabólicos. Durante el desarrollo de todo vertebrado, la formación *de novo* de los vasos sanguíneos se desarrolla a través de tres procesos distintos, los cuales por cierto, se recapitulan en el pez cebra. El primero es la **vasculogénesis** durante el proceso de epibolia entre las 5 y 11 horas posterior a la fertilización (hpf) (Gore *et al.* 2012; Kimmel *et al.* 1995) que corresponde a la formación de novo de vasos sanguíneos y ocurre a través de la diferenciación de un grupo de células progenitoras de células sanguíneas las cuales surgen de un ancestro común derivado de hemangioblastos ubicados en la capa embrionaria mesodermal, estas células llamadas angioblastos se diferencian hacia células endoteliales maduras (Coultas *et al.* 2005). Una mutación en los genes necesarios para la formación del mesodermo ventral del pez cebra denominado *spadetail (spt)*, da origen a un fenotipo de células endoteliales y hematopoyéticas errantes, lo que demuestra la importancia del mesodermo ventral en el desarrollo vascular (Thompson *et al.* 1998).

El segundo proceso es la **angiogénesis**, el cual corresponde al establecimiento de una red vascular a partir de la división de las células endoteliales de la vasculatura pre-existente para generar nuevos vasos (Aghi y Chiocca, 2005) en el cual el plexo vascular primitivo

progresivamente se va expandiendo mediante la proliferación de células endoteliales en una organizada red vascular, donde a través de los vasos adyacentes de mayor calibre se ramifican los más pequeños (Carmeliet, 2003). El tercer proceso de desarrollo de vasos es la **arteriogénesis**, que constituye el revestimiento de las células endoteliales por células periendotheliales, tales como células del músculo liso y pericitos.

Los procesos que comprenden el desarrollo vascular se subdividen en vasculogénesis, angiogénesis y arteriogénesis resumidos en la figura 1, haciendo referencia al contexto vascular en todo vertebrado, incluyendo al modelo de pez cebra. Las células endoteliales nacientes (CE) cubiertos por pericitos (PCs) y células del músculo liso (SMCs) configuran los vasos sanguíneos maduros.

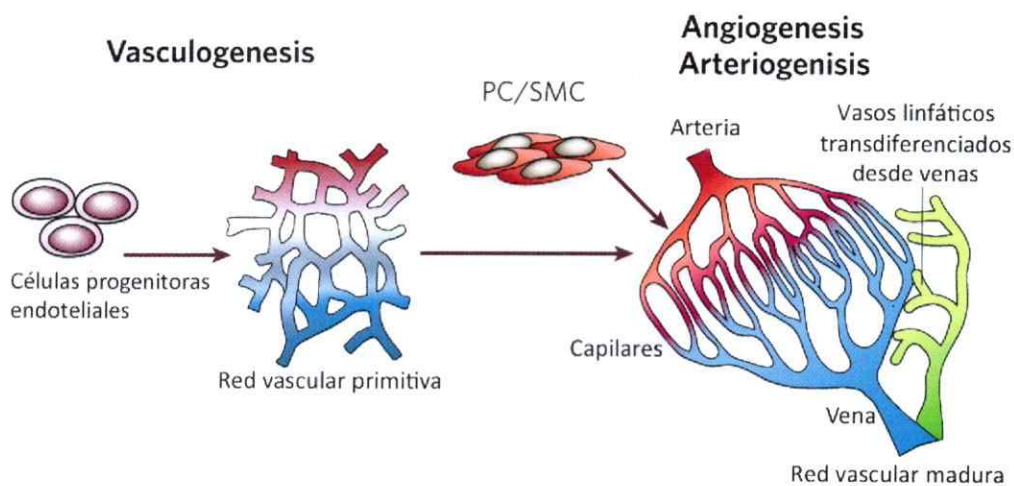


Figura 1. Desarrollo del sistema vascular temprano y tardío. Resúmen del desarrollo vascular en el pez cebra. De izquierda a derecha se observa una representación de la masa de células correspondiente a progenitores endoteliales en el mesodermo lateral, los cuales dan paso a una red vascular primitiva de arterias y venas. Luego del establecimiento de esta red, se da inicio por angiogénesis a plexo vascular primitivo, el cual se expye gradualmente y es cubierto por pericitos (PC) y células musculares lisas (SMC) que cubren canales endoteliales nacientes, lo cual es considerado como una red vascular madura. Modificado de (Carmeliet, 2003).

Esta red vascular madura es capaz de secretar factores de crecimiento como: factor de crecimiento derivado de la plaqueta (PDGF , de sus siglas en inglés), o también el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) el cual es capaz de atraer células del músculo liso mesenquimales, permitiendo la formación de la íntima y media de los nuevos vasos (Aghi y Chiocca, 2005).

Hay evidencia en el modelo de pez cebra que ha demostrado que al exponer las células progenitoras endoteliales (de sus siglas en inglés EPCs) a factores angiogénicos, éstas, son capaces de formar colonias endoteliales altamente proliferativas, lo que indica que la formación de nuevos vasos obedece al gradiente de concentración de factores al que están expuestas las células, por lo tanto se caracterizan por ser células con el potencial de diferenciación y auto-renovación de células endoteliales (Gore *et al.* 2012).

Una vez que se establece la red vascular principal constituida por la arteria dorsal (AD) y la vena cardinal posterior (VCP) se da inicio mediante angiogénesis a la formación de la red vascular que cubre el resto del animal. Los vasos intersegmentales (ISV de sus siglas en inglés) son los vasos angiogénicos visualmente más notorios a través de todo el tronco del embrión de pez cebra (Blum *et al.* 2008), los cuales revisaremos más adelante.

Debido a las implicancias fisiológicas y patológicas de la red vascular, las investigaciones relacionadas a la angiogénesis de los ISV ha sido ampliamente documentada (Carmeliet, 2005).

Regulación de la formación de vasos sanguíneos en el pez cebra

El modelo de pez cebra ha permitido observar mediante resolución de célula única la etapa de gastrulación, donde una proporción de células endoteliales y hematopoyéticas comparte un origen común (Gore *et al.* 2012b), indicando que ambos linajes celulares se desarrollan basándose en un programa genético común (Detrich *et al.* 1995). También se ha demostrado que el origen de ambos linajes en embriones de aves y mamíferos, surgen a partir de islas sanguíneas del anexo extraembrionario constituido por el saco vitelino, mientras que en el pez cebra surge a partir de un agregado de células intermedias derivadas del mesodermo ventral-lateral.

La especificación de las células endoteliales que dan inicio a la red vascular temprana en el desarrollo, están controladas por un delicado balance molecular a cargo de una familia de reguladores transcripcionales dentro de la secuencia de ADN altamente conservado y único de animales, denominados ETS (sigla en inglés referida a: *E26- transformation specific*) los cuales, entre otras implicaciones relacionadas al desarrollo de tejidos, son capaces de inducir la expresión de genes endoteliales específicos tales como *flk1/Vegfr2* (receptor del factor de crecimiento vascular VEGF) y caderinas endotelio-vascular (de las siglas en inglés *vecdn*) (Lelievre *et al.* 2001). Se ha demostrado que una pérdida de función de estos receptores, provoca defectos en el comportamiento y migración adecuada de las células endoteliales. Si el factor ETS o también denominado *friend leukemia integration 1 (fli1)* presenta una mutación en un miembro en particular, por ejemplo de *knockdown* combinatorios (*fli 1a*, *fli1b* y *ets1* relacionado a la proteína *etsrp*) en pez cebra, esto lleva a la pérdida de función de la familia ETS y a consecuencia se observan defectos en la diferenciación y especificación de células endoteliales

(Pham *et al.* 2007).

Modelos descritos para el estudio del desarrollo vascular

Desde hace más de dos siglos los intentos por entender la formación, función y disfunciones fisiopatológicas del sistema hematopoyético y vascular, han sido motivo de interés y eventos claves para generar estudios descriptivos basados en la observación del desarrollo de vasos en distintos modelos (Isogai *et al.* 2001).

El uso de la rana *Xenopus laevis* como modelo de estudio fue popular desde 1950 y tuvo un rápido auge debido principalmente a la facilidad de manipulación, el gran tamaño de los huevos y embriones como también que el desarrollo ocurre en intervalos cortos de tiempo y fuera de la madre. Los estudios relacionados al sistema vascular en esta rana, demostraron que las células endoteliales que forman los vasos sanguíneos provienen del mesodermo ventral-lateral, desde ahí migran hacia la línea media entre el polo animal y vegetal, sobre el endodermo que subyace en esa zona, en este lugar comienzan a formarse los primordios de los vasos axiales y principales del embrión, la AD y VCP. En todos los vertebrados este eje principal de vasos axiales o eventualmente sus primordios, se cierran completamente para formar un solo tubo, a pesar de que el tiempo en que ocurre esto varía entre distintas especies (Cleaver y Krieg 1999). En este mismo modelo se observó que la migración de las células precursoras (o angioblastos) ocurre desde el límite lateral de la línea media del mesodermo del embrión en respuesta al gradiente del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF de sus siglas en inglés) para iniciar la formación de la aorta dorsal, el cual es el vaso más largo e importante de todos los embriones de vertebrado (Cleaver *et al.* 1997).

Otro modelo que ha sido comúnmente utilizado para el estudio del desarrollo vascular han sido los embriones de pollo (*Gallus gallus*) que también han servido como modelos por su fácil manipulación *in ovo*. A menudo hay experimentos que involucran la membrana corioalantoica aviar embrionaria (CAM de sus siglas en inglés), que es una membrana extra embrionaria que le confiere la función respiratoria al embrión. CAM tiene una serie de cualidades útiles, particularmente con el uso para prueba de toxicidad, además el sistema vascular que presenta esta membrana, es comparable a la red de vasos del ojo humano. Estas similitudes han alentado el uso de la membrana como una alternativa de estudio relacionado al área de oftalmología (Luepke, 1985). De hecho actualmente se ocupa para detectar factores de irritación y para detectar el momento ideal de aplicación de un tratamiento por degeneración macular relacionado con la edad (Debefve *et al.* 2010). Adicionalmente el modelo de CAM permite la expresión génica inducida por medio de la electroporación para la liberación de expresión de genes en sitios específicos, donde uno de los sitios más utilizados ha sido el tubo neural (Ogura, 2002).

El modelo murino de ratón (*Mus musculus*) ha servido para estudiar el desarrollo del sistema vascular, a través del cultivo de células embrionarias, las cuales pueden agregarse y diferenciarse *in vitro* para formar cuerpos embrioides, que luego se cavitan para convertirse en cuerpos de forma cística. Estos cuerpos tienen programas de diferenciación, que permiten la formación de una capa embrionaria perteneciente al endodermo y mesodermo que consecuentemente generan la liberación de moléculas correspondiente a estos linajes celulares (Bautch 2002). Sorprendentemente, el endodermo libera VEGF-A para promover la apropiada señalización de diferenciación de los precursores endoteliales, permitiendo la formación de vasos

primitivos y luego el desarrollo de un plexo vascular primitivo a consecuencia del proceso de angiogénesis (Bautch 2008). De esta manera, los cuerpos formados derivados del cultivo primario de células embrionarias pueden ser intervenidos genéticamente y farmacológicamente para generar conocimiento acerca del desarrollo vascular. Sin embargo una de las desventajas que tiene este modelo esta dada por las limitaciones del trabajo *in vivo* de los procesos de desarrollo y regeneración vascular, además las generaciones de embriones no son de un gran número y el desarrollo ocurre intra-uterino.

En 1970 George Streisinger, descubrió que los embriones de pez cebra (*Danio rerio*) pueden ser físicamente manipulables para desarrollar diploides homocigóticos, permitiendo un fácil análisis genético (Streisinger *et al.* 1981). Este modelo se ha convertido en los últimos 30 años en un modelo de estudio ampliamente popular, por las ventajas que se destacaran en la siguiente sección.

Ventajas del estudio in vivo del sistema vascular en el pez cebra

Los embriones de pez cebra presentan múltiples ventajas para llevar a cabo un estudio relacionado al desarrollo y regeneración del sistema vascular (Jin, Beis, Mitchell, Chen, y Stainier, 2005). El desarrollo ocurre fuera de la madre y los huevos y larvas son transparentes, lo que permite una fácil visualización de la vasculatura y el corazón (Asnani y Peterson 2014). Además, los tiempos de generación para obtener peces adultos son relativamente cortos (tres meses), presentan un pequeño tamaño (3 a 4 cm en el adulto) y una alta fecundidad (200 huevos por cruce) lo que permite la ejecución a gran escala de experimentos y manipulación para el

estudio a nivel celular y molecular comprometidos en los programas del desarrollo, disminuyendo con ello los costos asociados (Yancopoulos *et al.* 2000). Existe una amplia gama de transgénicos fluorescentes que marcan la vasculatura y sus componentes (Tabla 1), lo cual sumado a la transparencia óptica de los embriones y la larva, permiten la obtención de imágenes de alta resolución óptica de vasos sanguíneos durante el desarrollo, utilizando luz transmitida o fluorescencia (Chávez *et al.* 2016). Estas ventajas ópticas han llevado al desarrollo de microangiografías confocales para una completa descripción anatómica de la vasculatura temprana y tardía del pez cebra, generadas a través del uso de líneas transgénicas específicas para vasos sanguíneos y el registro de videos *in vivo* por *time lapse* de largos periodos del desarrollo vascular y la regeneración (Isogai, Horiguchi, y Weinstein 2001b; Kamei, Isogai, y Weinstein 2004; Lawson y Weinstein 2002; Weinstein *et al.* 1995).

Tabla 1. Líneas transgénicas generadas para el estudio del sistema vascular. Adaptado de Chávez *et al.* 2016

Línea	Gen	Expresión
<i>Tg(5XUAS:cdh5-EGFP)</i>	<i>VE-cadherina</i>	Pan-endotelial
<i>Tg(-7.8gata4:GFP)ae3</i>	Factor de transcripción <i>GATA-4</i>	Células endocardiales y miocardiales
<i>Tg(dll4:EGFP)</i>	Ligando <i>Notch</i>	Células endoteliales
<i>Tg(efnb2a:EGFP)</i>	Ligando de <i>Eph</i> - receptor	Arteria
<i>Tg(fli:eGFP)^{yl}</i>	Factor de transcripción <i>Fli-1</i>	Células endoteliales, citoplasmico
<i>Tg(Fli1:neGFP)^{y7}</i>	Factor de transcripción <i>Fli-1</i>	Células endoteliales, nuclear
<i>Tg(flt4:YFP)</i>	<i>Vegfr3</i>	Pan- endotelial
<i>Tg(gata1:dsRed)sd2</i>	Factor de transcripción <i>GATA-1</i>	Células sanguíneas
<i>Tg(gata1:GFP)</i>	Factor de transcripción <i>GATA-1</i>	Linaje eritroide
<i>Tg(gata2:eGFP)</i>	Factor de transcripción <i>GATA-2</i>	Células sanguíneas
<i>Tg(hsp70l:canotch3-EGFP)</i>	Dominio intracelular de	Perivascular

	<i>Notch3</i>	
<i>Tg(kdr:eGFP)s843</i>	<i>Vegfr2/flk1/kdr/Vegfr4</i>	Angioblastos/precursores endoteliales
<i>Tg(kdr:G-RCFP)</i>	<i>Vegfr2/flk1/kdr</i>	Angioblastos/precursores endoteliales
<i>Tg(kdr:RFP)la4</i>	<i>Vegfr2/flk1/kdr</i>	Angioblastos/precursores endoteliales
<i>Tg(my17:eGFP)</i>	<i>Cadena liviana de miosina 2 Cardiac</i>	Células miocárdicas
<i>Tg(nkx2.3:efnb2a,myl7:EGFP)</i>	<i>Ligyo de Eph-receptor</i>	Arteria
<i>Tg(scl-aDsRed)</i>	<i>Factor de transcripción Tal-1</i>	Células endoteliales (intermedio)
<i>Tg(scl-β:d2eGFP)</i>	<i>Factor de Transcripción Tal-1</i>	Células endoteliales (anterior-posterior)
<i>Tg(Tie2:eGFP)</i>	<i>Receptor tirosin quinasa Tie-2</i>	Células endoteliales
<i>TgBAC(cdh5:Citrina)</i>	<i>VE-cadherina</i>	Pan-endotelial
<i>TgBAC(cdh5:GAL4FF)</i>	<i>VE-cadherina</i>	Pan-endotelial
<i>TgBAC(dll4:GAL4FF)</i>	<i>Ligyo Notch</i>	Células endoteliales
<i>TgBAC(flt4:Citrina)</i>	<i>Vegfr3</i>	Pan-endotelial
<i>Tg(0.8flt1:RFP)hu5333</i>	<i>Flt1</i>	Fuerte expresión en los ISV provenientes de la arteria

Durante los años cincuenta en el modelo de *Xenopus laevis*, se descubrió que los precursores endoteliales se originan desde el No obstante la arquitectura de los vasos sanguíneos y linfáticos en este modelo son difíciles de visualizar, además los vasos y su identidad son difíciles de distinguir en otros modelos de desarrollo *in vivo* dado por la relativa inaccesibilidad a la observación y manipulación experimental (I. H. Jung *et al.* 2016).

En relación a la vasculatura, este modelo posee un sistema vascular cerrado, anatomía vascular, forma de ensamblaje y mecanismos moleculares similares a los del humano (Isogai *et al.* 2001b).

Las larvas y los adultos de pez cebra son apropiados para determinar las bases genéticas que determinan un fenotipo dado, en base a la sobre-activación o privación de la expresión de

genes en cortos intervalos de tiempo, por medio de técnicas como el uso de morfolidos. Las larvas de pez cebra representan además, una gran plataforma para la prueba de componentes químicos involucrados en los procesos de angiogénesis (Meng *et al.* 2008) y han permitido la identificación de mutaciones vasculares específicas en la regulación de nuevos genes implicados en el desarrollo vascular a través de “*screening*” genéticos (Gore *et al.* 2012b). Por otra parte este modelo, posee un sistema vascular linfático el cual es esencial para la homeostasis de fluidos, respuesta inmune y la absorción de grasas. Por ejemplo, si ambos tipos de vasos tanto de transporte sanguíneo y linfático se ven afectados, se manifiestan enfermedades neoplásicas incluyendo la metástasis tumoral y linfedema (Butler *et al.* 2010). En este sentido el pez cebra ha permitido estudiar perturbaciones en los programas normales del desarrollo en relación a enfermedades cardiovasculares (North y Zon 2003; Asnani y Peterson 2014).

La conservación génica del pez cebra, tanto con el ratón como con el humano, representa otra ventaja del modelo ya que eventualmente se podría entender la dinámica de desarrollo, fisiología y patologías relacionadas al sistema vascular (Stainier *et al.* 1993). Los múltiples transgénicos que marcan genes hemato-vasculares hacen posible estudiar *in vivo* los aspectos relacionados al brote angiogénico durante el desarrollo, que brinda información extrapolable a otros vertebrados, dada su similitud del plan vascular básico (Isogai *et al.* 2001b).

Regeneración vascular en pez cebra

A pesar de que el desarrollo vascular en pez cebra se ha estudiado en gran detalle, pocos estudios se han concentrado en elucidar los procesos celulares que gobiernan la regeneración vascular posterior a un daño. Adicionalmente, los modelos de daño vascular descritos, corresponden a una punción mecánica de un vaso sanguíneo en embriones y al corte de cola de adultos en el pez cebra (Clay y Coughlin 2015; Xu, Volkery, y Siekmann 2015), los cuales presentan baja reproducibilidad y dificultad para diferenciar las identidades vasculares arteriales y venosas.

El uso de larvas de pez cebra presenta numerosas ventajas respecto al uso de peces adultos. Entre otras destacan la transparencia óptica que permite el acceso a otros vasos mucho más fáciles de reconocer en cuanto a la identidad de vena y arteria por la identificación de la dirección del flujo sanguíneo con luz transmitida bajo el microscopio. Estos vasos son los ISV, desarrollados mediante el proceso de angiogénesis desde la arteria y desde la vena a las 22 hpf y dispuestos a través de todo el tronco sin sobreposición entre ellos (Izumi *et al.* 2012)a).

Resumiendo, dada la escasa disponibilidad de técnicas relacionadas al daño vascular en larvas de pez cebra y las desventajas que presenta el uso de peces adultos, en este trabajo proponemos que el daño localizado de los ISV inducido en una larva de pez representa una herramienta importante para el estudio de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en procesos de regeneración vascular.

HIPÓTESIS

El daño inducido en un vaso intersegmental de larvas de pez cebra, permite estudiar los procesos celulares involucrados en regeneración vascular.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los procesos celulares que ocurren durante la regeneración vascular luego de inducir un daño localizado en un modelo de larva de pez cebra.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la capacidad de regenerar de un vaso sanguíneo intersegmental, luego de inducir un daño localizado en larvas de pez cebra.
2. Estudiar la dinámica y velocidad de regeneración *in vivo* de los vasos intersegmentales de identidad venosa y arterial en un modelo de daño localizado en larvas de pez cebra.
3. Caracterizar la respuesta inflamatoria que se observa durante el proceso de regeneración vascular en larvas de pez cebra.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y crecimiento de larvas de pez cebra

Los peces adultos utilizados se mantuvieron en el bioterio del Edificio Milenio de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, con flujo de circulación constante de agua (agua de osmosis inversa, salinizada con "Instant Ocean", 60mg/L pH 6,5 y 7,0, conductividad entre 400-600 μ S) en ciclos circadianos controlados de 14 horas luz y 10 horas de oscuridad, a una temperatura constante de 28,5°C. Los peces llevaron una dieta diaria basada en *Artemia salina* suplementada con Gemma micro (*Skirting, Nutreco Company*).

Se obtuvieron embriones de las líneas transgénicas necesarias en este estudio, a partir de los cruces de adultos, programados de acuerdo al comportamiento de apareamiento regido por un ciclo de luz de 14 horas y 10 horas de oscuridad.

Los huevos fueron colectados luego de 3 horas posterior a sacar las separaciones, luego se mantuvieron en placas Petri plásticas embebidas en solución salina de E3 (5mM NaCl; 0,15mM KCl; 0,33mM CaCl₂; 0,3mM MgSO₄), aproximadamente 60 embriones por placa para asegurar su correcto desarrollo. Durante la eclosión de las larvas, estas se mantuvieron con ciclos de luz y oscuridad de 14 horas, 28°C en un incubador en condiciones de flujo aéreo constante a 28,5 °C (Westerfield, 2000). Los estadios larvales se expresan en días post fertilización (dpf) y se trabajó con larvas en un estadio de 3dpf . Todos los experimentos fueron realizados en animales anestesiados con MS-222 (Tricaína; A5040; Sigma, Saint Louis, MO, USA).

Las líneas transgénicas utilizadas en este trabajo se encuentran resumidas en la Tabla 2. Estas líneas permiten marcar el endotelio de vasos sanguíneos, el núcleo de las células de vasos

sanguíneo y neutrófilos con distintos fluoróforos.

Todos los peces utilizados a través de este trabajo fueron autorizados por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Tabla 2. Líneas transgénicas de pez cebra utilizadas en esta tesis, tipos celulares marcados y tipo de marca.

Línea transgénica	Células marcadas	Tipo de marca	Autor
<i>Tg (fli1: EGFP)</i>	Vasos sanguíneos y linfáticos	Citoplasmático	(Thomson et al. 1998)
<i>Tg (kdr1: mcherry-CAAX)^{yl71}</i>	Membranas endoteliales	Membrana celular	Fujita et al., 2011
<i>Tg (kdr1: mcherry.nls)</i>	Núcleos endoteliales	Membrana nuclear	(Fujita et al. 2011)
<i>Tg (mpo: GFP)</i>	Células de neutrófilos	Citoplasmático	Renshaw et al. 2006
<i>Tg (mpo: mCherry)</i>	Células de neutrófilo	Citoplasmático	Yoo et al., 2010

Electroablación de vasos sanguíneos

Para establecer un método de daño localizado en los vasos sanguíneos se adaptó el protocolo de (Moya-Díaz et al. 2014). Para este protocolo se acopla una fuente generadora de pulsos de corriente (AM system model 2010, Stoelting) a un microelectrodo de tungsteno (número de catálogo; UEWMGGSEBN1M, FHC Inc., Bowdoin, ME, USA) el cual se encuentra acoplado a un micromanipulador. A su vez, este sistema está montado sobre un microscopio de epifluorescencia como se muestra en la Figura 2 para la visualización de la larva y la marca fluorescente. Para inducir daño a nivel de los ISVs de distinta identidad (arterial y venosa) fue necesario montar las larvas en agarosa de bajo punto de fusión a una concentración de 1% p/v, esta fue la concentración óptima para la inmovilización de las larvas y la introducción del

electrodo en el tejido del pez hasta llegar al vaso sanguíneo. El uso de las larvas doble transgénico *Tg(fli1:EGFP);(Kdrl:mcherry.nls)*, nos permitió posicionar el electrodo sobre el núcleo de una célula endotelial dentro del ISV ubicado entre el somito 15 y 18 en el tronco del embrión.

La optimización del daño eléctrico, se estableció provocando 2 pulsos de 22 μ A por vaso.

Cada identidad de vaso sanguíneo, se encuentran dispuestos uno por medio a lo largo del eje desde anterior a posterior, es decir encontramos un ISV de identidad venosa y seguido de él uno de identidad arterial, a lo largo de todo el tronco de la larva. Para provocar la ablación en cada identidad vascular, escogimos peces distintos, dado que el daño que genera el electrodo al entrar en el tejido abarca una gran región dentro de la larva. Para distinguir un ISV de identidad arterial o venosa, observamos la dirección del paso de los eritrocitos en el flujo sanguíneo de la larva en campo claro bajo el microscopio. En relación a la orientación del flujo sanguíneo el ISV de la arteria tiene un flujo de sangre desde ventral hacia dorsal y el ISV de la vena tiene una dirección de flujo desde dorsal hacia ventral.

Posterior al daño por electroablación se desmontaron las larvas embebidas en la agarosa y se mantuvieron en una placa Petri en medio E3 dentro del incubador a 28°C.

El registro de la regeneración de los vasos dañados se siguió durante 24 horas. Se montaron las larvas en agarosa 1% p/v para tomar fotografías en el microscopio de epifluorescencia y confocal cada 2 hpd y registró el comportamiento de la extensión del lumen del endotelio vascular.

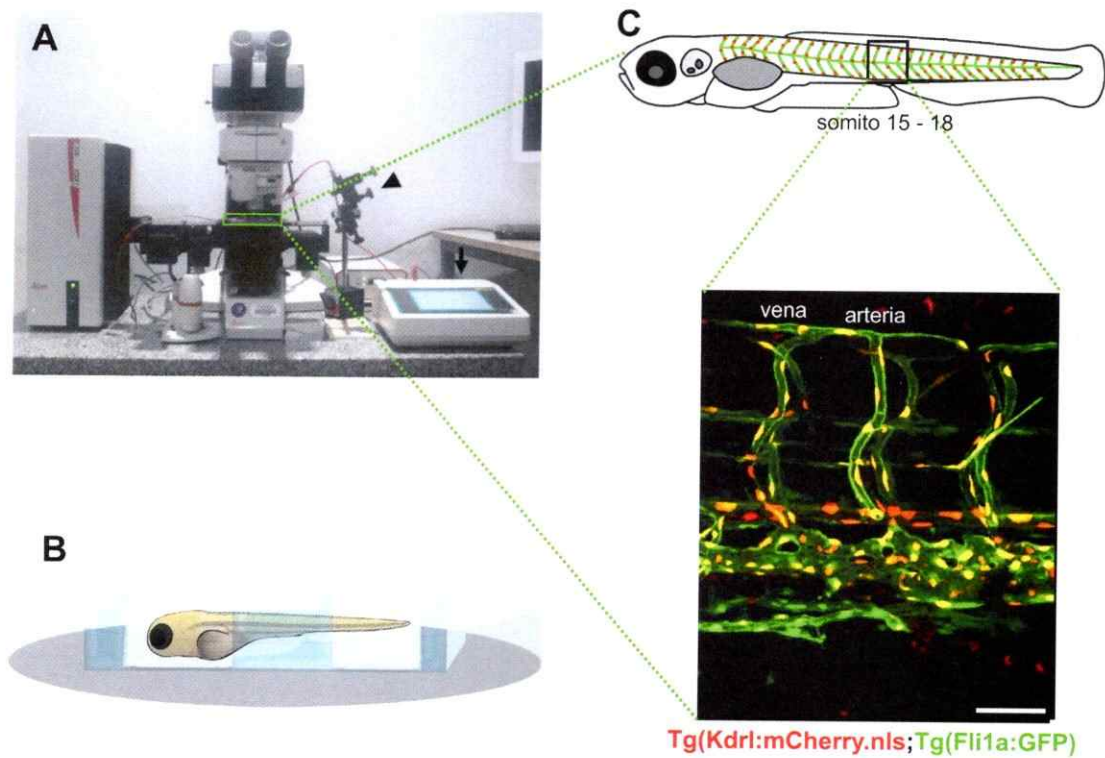


Figura 2. Disposición e implementación del equipo de electroablación. A. Equipo de electroablación, fuente de poder para generar el pulso de corriente (flecha negra) el cual sostiene la platina y la placa donde está embebido el embrión. Desde la placa proyecta la visualización de la larva en la platina (recuadro verde), micromanipulador para sostener el electrodo de tungsteno (cabeza de flecha negra), oculares del microscopio de fluorescencia (punta de flecha blanca). B. Montaje en placa de larva embebida en agarosa 1% p/v sostenida solo desde el centro del tronco, cabeza y cola no quedaron cubiertas. C. Larva doble *Tg* (*Fli1:EGFP*; *Kdrl:mCherry.nls*) y visualización de los ISV donde se aplicó un pulso de corriente entre el somito 15-18 del tronco del embrión. Escala = 30 μ m.

Ablación por láser multifotón y registro de la regeneración

Microscopio Confocal Leica SP5 II:

Para la estandarización de una ablación acotada a una sola célula endotelial de las tres que tiene un ISV a los 3 dpf, fue necesario establecer un método de daño reproducible, que a su vez, no afectara la sobrevivencia de las larvas para el registro posterior y el vaso intersegmental que está por detrás del vaso que queremos dañar. Con este propósito se utilizó un microscopio Confocal Leica SP5 II directo (Ubicado en National Institute of Health NIH), en la colaboración establecida durante la pasantía realizada en el laboratorio del Dr. Brant Weintein, US. Las características del objetivo utilizado permitieron trabajar sobre la muestra atravesando el medio líquido E3 y posicionarlo sobre la agarosa donde estaba embebida la larva ya que, se utilizó un objetivo directo y sumergible en agua (o medio E3 en este caso) de aumento 20X (HCX APO 20X 1.0 NA Water Immersion), provisto de 1.0 de apertura numérica (AN) y 2 mm de distancia de trabajo. Estas características permiten diversas aplicaciones, entre ellas el trabajo en muestras de 1 mm de espesor como las larvas de pez cebra. Para generar y verificar el daño, se montó larvas doble transgénico *Tg (Fli1: EGFP; Kdr1:mcherry.nls)* en agarosa de bajo punto de fusión a una concentración de 0,8% p/v en medio E3 con tricaina como anestésico al 0.01% v/v, que permite inmovilizar parcialmente la larva y admitir que los movimientos producto del crecimiento no afecten la obtención de imágenes durante el daño y registro. Con el doble transgénico distinguimos el núcleo de la célula endotelial hacia el centro del vaso, lo escogimos y dirigimos el láser de multifotón (MF) hacia esa célula endotelial.

El daño fue inducido por medio de la optimización de la longitud de onda y poder del láser de

MF adosado al microscopio confocal (modelo Mai Tai DeepSee made by Spectra Physics), el cual consta de un rango espectral de trabajo en un intervalo entre 680-1300 nm. Además el sistema constituido por el microscopio confocal y el equipo de multifotón se pueden controlar desde un *software* de fácil manipulación (Leica LAS AF Leica Application Suite Advanced Fluorescence).

La configuración final del daño inducido por MF sobre una única célula endotelial en las larvas fue inducido en los ISV entre el somito 15 y 18 y tiene como características: 950 nm de longitud de onda, apertura del 100% de láser, 4 iteraciones y magnificación de la estructura correspondiente al núcleo de la célula endotelial de un 90% (zoom manual desde el microscopio confocal).

El registro posterior al daño, es necesario realizarlo con una cámara de flujo constante de medio sobre el embrión de pez cebra (Kamei *et al.* 2004). El embrión montado en agarosa se encuentra dispuesto dentro de esta cámara adosada a la platina del microscopio. En la cámara que contiene al embrión, se provoca el daño y se da inicio al registro durante toda la noche, haciendo circular por una entrada de la cámara de flujo y por dos salidas 1000 mL de medio E3 al 0.1% p/v temperado a 28°C (el medio está contenido en una botella de vidrio de 1000 mL dentro del baño termorregulado) con una bomba peristáltica a una velocidad de 2 rpm como se resume en la figura 3.

El set de fotografías en una proyección del eje z de la zona de daño en el embrión, se realizó cada 5 minutos, con una distancia de 2 μm entre cada corte óptico, durante un tiempo total correspondiente a 20 horas. En esta configuración de daño y registro se realizó una lesión sobre la célula central de un ISV proveniente de la arteria y la vena dentro del mismo embrión y en

vasos vecinos (Figura 3d).

El análisis y procesamiento de los archivos en formato CZI que proporciona el microscopio confocal se realizó considerando la proyección máxima de los cortes ópticos en los programas *Fiji*, *Volocity* e *Imaris*, permitiendo obtener proyecciones en 3D de la zona dañada y corroborar que el daño por esta configuración se limitó solo a la célula endotelial escogida.

Configuración de daño en microscopio Confocal Espectral Zeiss LSM780

Basado en la estandarización del daño realizada en el Microscopio Confocal Leica SP5 II, se utilizó el Microscopio Confocal Espectral Zeiss modelo LSM780 (Ubicado en el Centro de Microscopía Avanzada de la Universidad de Concepción) para repetir lo realizado en el Laboratorio del Dr. Weinstein. Dentro de las características de este Microscopio, es que consta con un láser de MF (Chameleon Coheren) con un rango espectral de 660-1064nm para muestras *in vivo* con el que se puede obtener la longitud de onda estandarizada en el Microscopio Leica. En este caso el microscopio es invertido y el mejor objetivo utilizado fue 32X (Objetivo C-AchroPlan 32X de inmersión -A.N 0.85-distancia de trabajo 2 mm), y la configuración de daño estandarizada fue provocada con una potencia de láser al 70%, 10 iteraciones y 900 nm de longitud de onda de láser (2250 mW). El daño se provocó marcando dos áreas de trabajo: en el monitor se dibuja un área rectangular con la herramienta de regiones que posee el *software* del microscopio y se encierra el área correspondiente a cuatro ISVs, luego la segunda región es la célula central de interés (de sus siglas en inglés ROI) que queremos dañar. Ésta región se elabora encerrando a mano alzada la región correspondiente a una célula. Para distinguir una célula central dentro del ISV utilizamos larvas del doble transgénico que marcan el endotelio en GFP y

los núcleos en mCherry. Este procedimiento se hace para la célula medial de un ISV proveniente de la vena y otro de la arteria en la misma larva. Sobre la segunda región mencionada se dirigió el pulso de láser de MF para desconectar el vaso. En este equipo, es posible realizar el registro previo al daño y posterior a él de manera inmediata, pero no se puede adosar la cámara de flujo de medio para el registro por adquisición de imágenes *time lapse*.

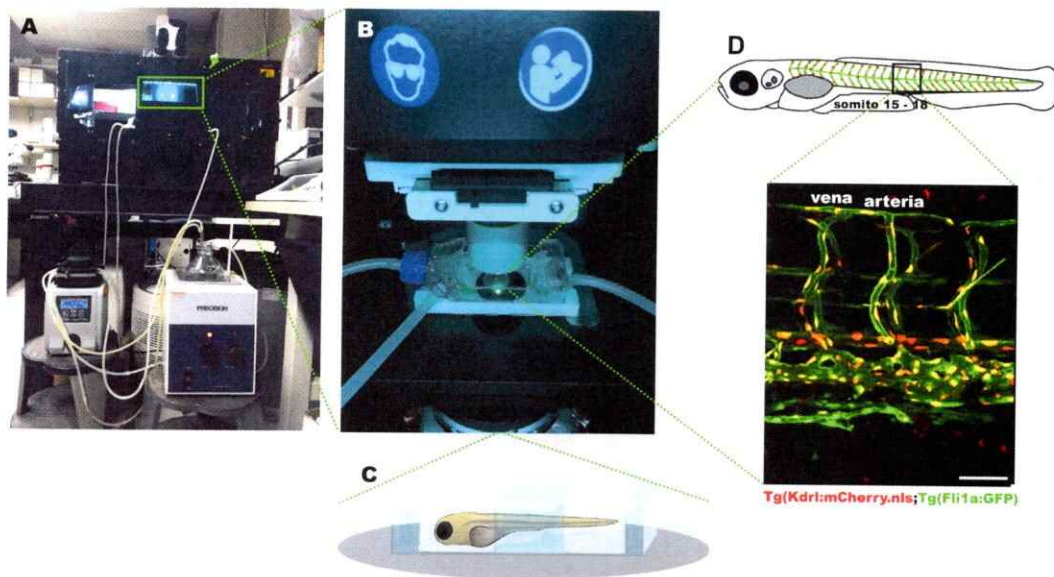


Figura 3. Configuración y disposición de las muestras para la ablación y posterior registro en cámara de flujo por *time lapse*. Microscopio Leica SP 5 II Dr. Brant Weintin (NIH, US), arriba, bomba peristáltica y baño termorregulado pa medio E3, abajo A. Objetivo sumergible y cámara de flujo constante con entrada y salida de medio E3 conteniendo la muestra de pez cebra para obtener el registro por *time lapse* de 24 horas B. Esquema que muestra el montaje de la muestra, donde el pez esta contenido en un anillo de plástico construido del corte transversal de un falcon de 15mL en el cual se embebe sobre un bloque de agarosa de bajo punto de fusión (0.8%), posteriormente se hace una hendidura a la altura de la cabeza y otra en la cola, sosteniendo la larva de 3dpf solo desde el tronco C. Doble transgénico obtenido del cruce entre *Tg (Fli1: EGFP)* y *Tg (kdr1: mcherry.nls)* para localizar el núcleo de una célula medial del ISV y provocar el daño. Además se consideró ablacionar sobre una célula de un ISV proveniente de la arteria y otra de la vena dispuestos a la altura del ano entre el somito 15 -18 D.

Caracterización del daño por ablación sobre el tejido del músculo

Para caracterizar la lesión provocada por el electrodo y el pulso eléctrico en la configuración de electroablación, como también el daño producido por el láser de MF en la configuración por fotoablación, se utilizó la tinción para filamentos de actina polimerizados de las células de la musculatura del embrión de pez cebra con Faloidina-TRITC (Sigma).

Análisis estadístico

Para comparar dos condiciones se utilizó *t-Student*. Para comparaciones múltiples se utilizó un análisis anova de dos vías. Además se consideró una diferencia significativa cuando el valor $p < 0.005$.

RESULTADOS

Objetivo específico 1. Determinar la capacidad de regenerar de un vaso sanguíneo intersegmental, luego de inducir un daño localizado en larvas de pez cebra.

Generación de daño por electroablación en Vasos Intersegmentales de larvas de pez cebra

Para inducir y caracterizar el daño por pulsos eléctricos, se utilizó la configuración señalada en la Figura 2 y se utilizaron larvas doble transgénico *Tg (Flil: EGFP; Kdrl:mCherry.nls)* de 3 pdf. Con este transgénico pudimos distinguir la posición del núcleo de la célula donde posicionamos el electrodo e inducimos la ablación. El daño se realizó sobre un ISV de identidad venosa y arterial, se utilizó un set de embriones para dañar la arteria y otro set para dañar la vena. Observamos la transección completa del ISV a ambos lados de la geometría bilateral de la larva, es decir, que dañamos el vaso intersegmental de adelante y el de atrás. Esto lo corroboramos por que antes del daño diferenciamos el endotelio del ISV marcado por la proteína verde fluorescente GFP y el núcleo endotelial por la marca fluorescente roja mCherry. Luego de introducir el electrodo hasta el vaso y generar el pulso ambas marcas desaparecen sin alterar los vasos vecinos al daño (Figura 4).

Al cabo de una hora pudimos dañar 20 larvas con un 100% de éxito sobre un único ISV por embrión. Al momento de dañar los ISV al 50% de las larvas se le dañaron ISV provenientes de la arteria y el otro 50% son ISV provenientes de la vena.

Notamos que la superficie de la piel del embrión de pez cebra antes del daño (figura 4D) presenta un patrón continuo de segmentación dada por los somitos, mientras que luego del daño

este patrón se pierde (figura 4K), observando una gran extensión del daño ya que abarcó cuatro somitos a través del tronco, que son todos los observados bajo el objetivo al momento de dañar la larva.

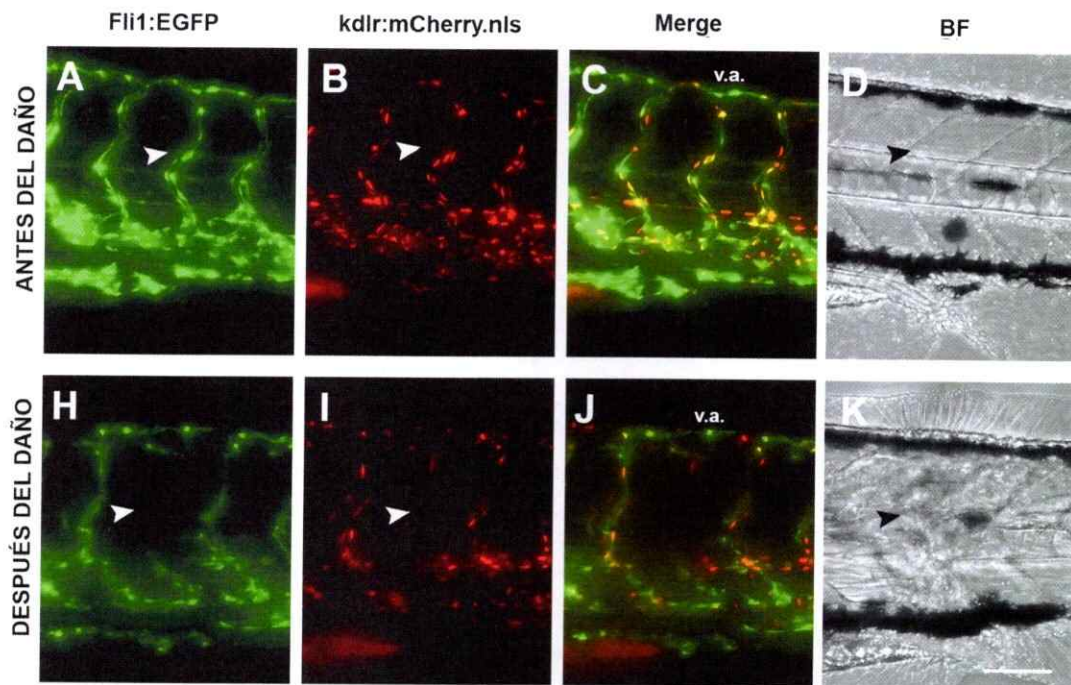


Figura 4. Caracterización del daño por electroablación sobre la red vascular y la superficie de la larva de pez cebra. Desde A a D se observa el doble transgénico *Tg (Fli1:EGFP; Kdr1:mCherry.nls)* antes del daño y desde H a K después del daño. En el panel A y B se observa el endotelio y los núcleos correspondientes al vaso intersegmental que se desea dañar indicados por la punta de flecha blanca, en el panel B la flecha blanca representa el núcleo central sobre el que se posiciona el electrodo antes de dar un pulso eléctrico. En el panel H e I se observa la pérdida de la marca fluorescente *GFP* del endotelio y de la marca roja *mCherry* de los núcleos. El panel D señala como era el tejido segmentado de la piel antes del daño y como este se pierde luego de la electroablación en el panel K. n= 12 embriones de pez cebra, v.a.=vasos anastómicos. La escala corresponde a 100 μ m es igual para todos los paneles.

Con el propósito de caracterizar la ablación por pulsos eléctricos en las células de la musculatura adyacentes al daño, hicimos daño en un set de larvas que fijamos a distintas horas e hicimos una tinción para las fibras de actina con Faloidina (figura 5). Observamos que a las 2 hpd (horas post daño) la extensión abarca un gran área de la musculatura, sin embargo no afecta la musculatura que está por detrás de los ISV vecinos al daño (figura 5A). Medimos el diámetro promedio de esta herida en 12 larvas y hallamos que en promedio el área es de $96 \mu\text{m}^2$ tras la ablación.

Una vez caracterizado el daño inducido por electroablación, evaluamos el potencial regenerativo tanto de la red vascular como del musculo comprometido en el daño. Para ello medimos el área de daño (Figura 5B y 5C) y mediante la observación bajo la lupa hicimos el seguimiento de la regeneración del ISV posterior al daño, donde notamos que a las 6 hpd comienza a extenderse el lumen del endotelio vascular desde ventral hacia dorsal (por lo tanto fijamos otro set de 12 larvas en este tiempo) y advertimos que el área de daño promedio en la musculatura bajó a $68 \mu\text{m}^2$ (figura 5B). A las 24 hpd, el ISV ya sea de identidad arterial o venosa ha regenerado, y lo hace a través del borde del músculo que quedó posterior a la lesión (figura 5C), además en este tiempo el diámetro promedio de lesión en el músculo no varió en relación a las 6 hpd.

Para comprobar si la configuración de daño por electroablación tuvo consecuencias en el desarrollo y comportamiento natatorio o respuesta de escape, se estimuló el lado dañado a nivel del tronco con una fibra de cabello desde los 3 dpf, que es donde se induce el daño, hasta los 7 dpf y se registraron conductas como: natación de costado, retardo para responder a la estimulación y ausencia de natación. Observamos que no todas las larvas hasta los 5 dpf se comportaron de manera normal, teniendo problemas para desplazarse. Por otra parte la viabilidad de los peces hasta los 7 dpf varió significativamente en relación a la condición control, que

consideraba larvas sin electroablacionar como se resume en la tabla 3.

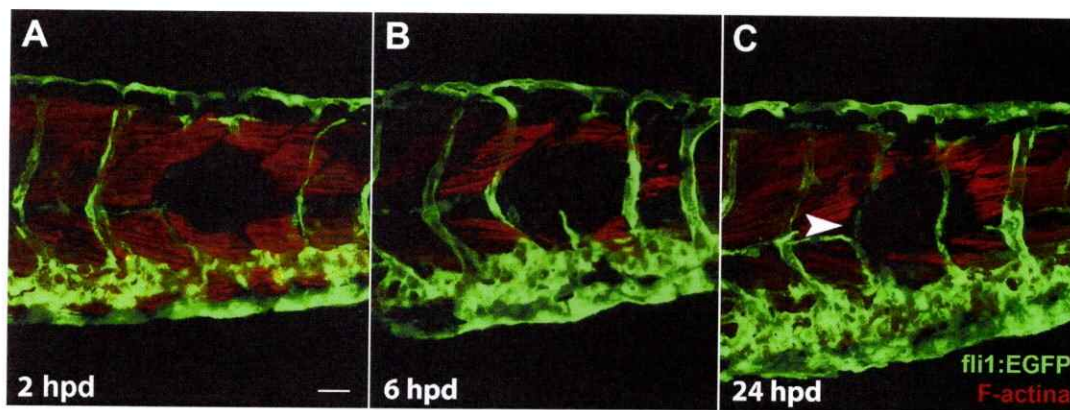


Figura 5. Caracterización del daño sobre la musculatura adyacente posterior a la electroablación dirigido a un ISV. Fotografías representativas durante las 2 hpd (A), 6 hpd (B) y 24 hpd (C) en el transgénico *Tg(Fli:1 EGFP)* que marca el endotelio vascular y la herida provocada sobre los filamentos de actina de los músculos teñidos por Faloidina. El diámetro promedio en un set de 12 larvas a las 2 hpd fue de 96 μm , a las 6 hpd el diámetro promedio de la herida disminuyó a 68 μm y esta no varió a las 24 hpd. El ISV regeneró por el borde de la musculatura entre las 20 y 24 hpd. La escala corresponde a 30 μm para todas las fotos representativas.

Tabla 3. Comportamiento, viabilidad y daño en el tejido del músculo posterior a la electroablación de un ISV en larvas de pez cebra. La electroablación de las larvas a nivel de los vasos intersegmentales afectó la viabilidad y comportamiento natatorio de los peces hasta los 7dpf (días post fertilización). El diámetro promedio del daño en la musculatura por la configuración de electroablación sobre un ISV fue significativamente mayor comparado con la situación control (***) valor de significancia $p < 0.0001$ en el análisis de *t-student*). Se utilizó un número inicial de 35 embriones. La situación control se refiere a larvas que no se dañaron por electroablación, además también se utilizaron 35 larvas.

	Control	3 dpf	4 dpf	5 dpf	6 dpf	7 dpf
Comportamiento natatorio normal (%)	100	6	6	29	31	42
Viabilidad respecto al n inicial (%)	100	97	94	89	80	68
Diámetro promedio expresado en micrómetros (μm) de la región dañada en la musculatura	0	***96 ² $\mu\text{m} \pm 16$	96 $\mu\text{m}^2 \pm 16$	82 $\mu\text{m}^2 \pm 16$	68 $\mu\text{m}^2 \pm 14$	60 $\mu\text{m}^2 \pm 14$

Generación de daño por fotoablación en Vasos Intersegmentales (ISV) de larvas de pez cebra

Para inducir y caracterizar el daño por un haz de fotones, se utilizó la configuración señalada en la Figura 3. Se utilizaron larvas doble transgénico *Tg (Fli1: EGFP; Kdrl:mCherry.nls)* de 3 pdf, lo que permitió distinguir la posición del núcleo de la célula endotelial central dentro del ISV antes del daño (figura 6A-C), en ese núcleo posicionamos el objetivo e provocamos la ablación por MF.

Notamos que luego de inducir la ablación, el daño en la red vascular fue sobre una célula medial dentro de un ISV la cual reconocimos a través de la pérdida y discontinuación de la fluorescencia GFP del endotelio vascular y la fluorescencia roja mCherry de los núcleos endoteliales el cual no traspasó el ISV al otro lado de la larva, que en la figura se observa atrás del dañado (figura 6 H-J). Observamos que la caracterización de este daño hacia la superficie del embrión no provocó una desorganización extensiva del patrón de segmentación comparado con la situación antes del daño (figura 6 D-K).

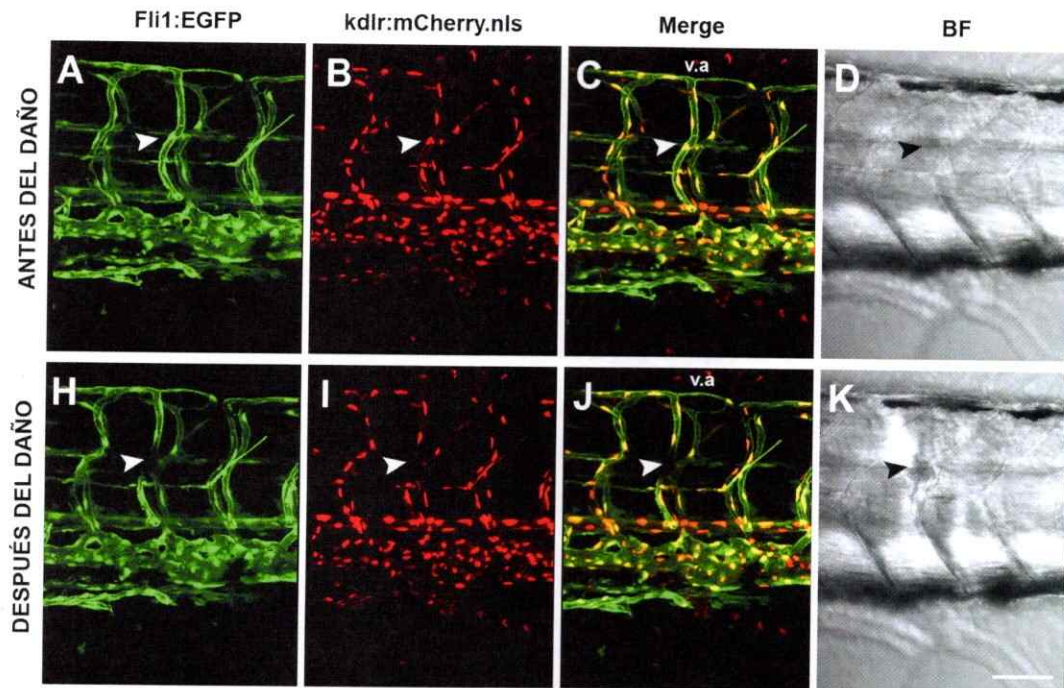


Figura 6. Caracterización del daño por fotoablación sobre la red vascular y la superficie del embrión. Situación antes del daño (A-D) y después del daño (H-K). La flecha blanca en el panel B indica el núcleo de una célula endotelial central del vaso intersegmental, sobre este núcleo se hace el foco para inducir la potencia de láser y eliminar tanto el endotelio como el núcleo de la célula. En el panel I la flecha blanca demuestra que posterior a inducir el daño el núcleo ha desaparecido, en la misma posición que en el merge panel J donde se puede observar la desaparición de la marca *GFP* y *mCherry* de la célula endotelial. La caracterización de este daño hacia la superficie demostró que la incidencia del haz de fotones no desorganiza una gran extensión K comparado con la situación antes del daño D.

Con la finalidad de caracterizar el daño por la configuración de MF en las células de la musculatura adyacentes al daño, realizamos fotoablación en los ISV de identidad arterial y venosa (n= 10) que fijamos a distintas horas e hicimos una tinción para las fibras de actina con Faloidina (figura 7). Observamos que a las 2 hpd la extensión del daño abarca un área acotada de la musculatura bajo la célula endotelial ablacionada, además no afecta la musculatura que está por detrás de los ISV vecinos al daño (figura 7A). Medimos el diámetro promedio de la abertura en la musculatura luego de hacer incidir el haz de fotones y hallamos que en promedio el área es

de $30,4 \mu\text{m}^2$. A las 4 hpd el diámetro promedio en 10 embriones disminuyó a $15,5 \mu\text{m}^2$ (figura 7B). Y por último seguimos la regeneración de estos vasos, la cual culminó a las 8 hpd para el ISV de la arteria y 10 hpd para el ISV de la vena y observamos que el tejido muscular había regenerado (figura 7c).

Al igual que para la electroablación, medimos el comportamiento natatorio y la viabilidad de 30 larvas inmediatamente luego de dañar estimulando el lado del tronco que recibió el laser de MF con una fibra de cabello desde los 3 dpf, que es donde se induce el daño, hasta los 7 dpf. Notamos que el comportamiento natatorio de escape nunca fue afectado comparado con la situación control que fueron larvas no dañadas como se resume en la tabla 4.

Otro aspecto interesante que pudimos determinar a través del uso del *software Velocity e Imaris* una vez que adquirimos el registro de fotos por microscopia confocal luego de inducir la fotoablación, se relaciona a la proyección en 3D del ISV dañado (figura 8) y la medición de la longitud que provocó la entrada del haz de fotones en la estructura tubular del vaso. La longitud promedio de 10 ISV dañados inmediatamente después de la fotoablación fue de $37,1 \mu\text{m}$ y se midió considerando la ablación de una célula medial dentro del ISV, la cual no persistió en los días sucesivos del desarrollo (tabla 4).

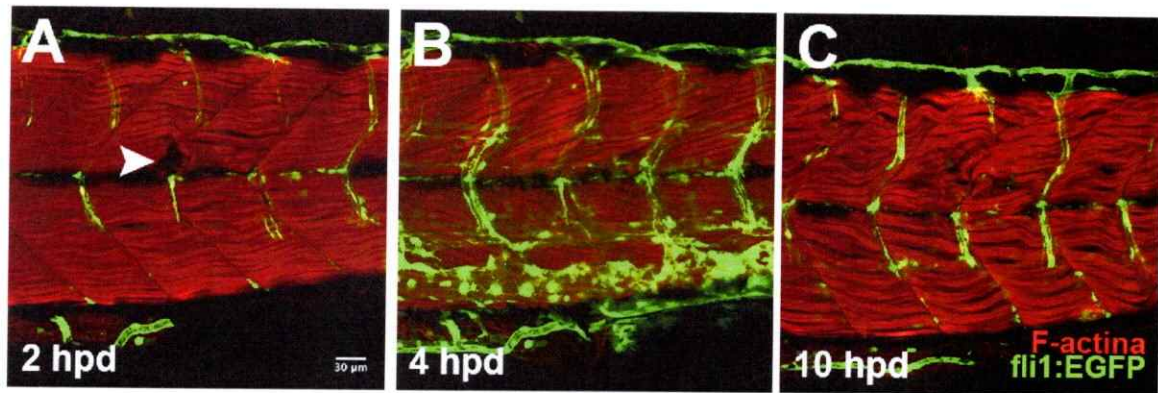


Figura 7. Caracterización del daño inducido por fotoablación sobre el tejido muscular que subyace al ISV. Sección del ISV dañado y tinción con faloidina de las fibras de actina del músculo que subyacen al daño señalado con la punta de flecha blanca a las 2 hpd, además se seleccionó el área de daño y se cuantificó el promedio de daño en el músculo de 10 embriones, el cual correspondió a 30,4 μm **A**. El daño en la musculatura a las 4 hpd disminuyó en promedio a la mitad **B**, y hacia el final de la regeneración a las 10 hpd el ISV ya reconectó y el daño en el tejido del músculo cicatrizó.

Tabla 4. Comportamiento, viabilidad y longitud promedio del daño inducido en un ISV por la configuración de fotoablación. La fotoablación de las larvas a nivel de los vasos intersegmentales no afectó la viabilidad y comportamiento natatorio promedio de 30 embriones durante los siguientes días del desarrollo. Además la longitud promedio de 10 ISV dañados no persiste en los días sucesivos a la fotoablación.

	Control	3 dpf	4 dpf	5 dpf	6 dpf	7 dpf
Comportamiento natatorio normal (%)	100	100	100	100	100	100
Longitud promedio en μm del daño en ISV	0	37,1	0	0	0	0

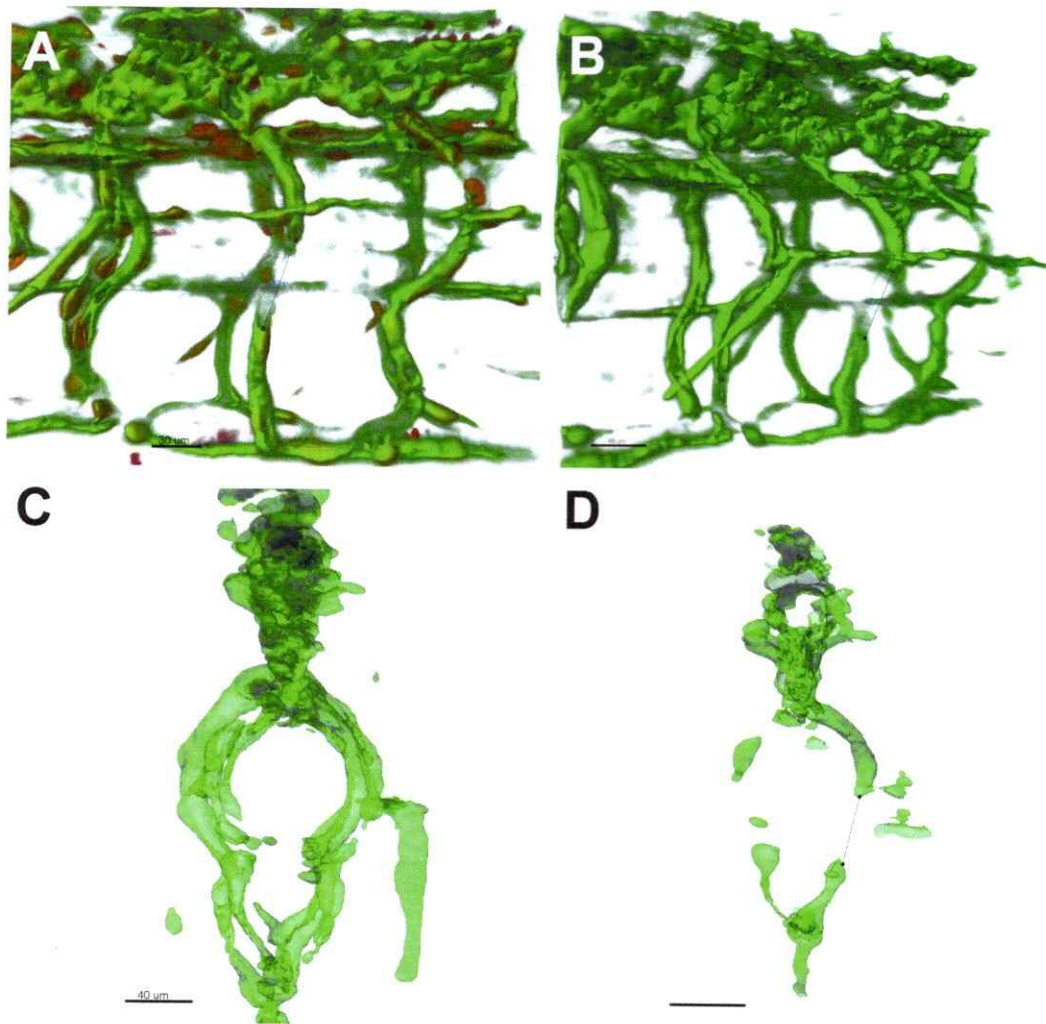


Figura 8. Proyección 3D del daño inducido por fotoablación sobre una célula endotelial intermedia dentro de un ISV. La proyección fue realizada en el *software* *Volocity* e *Imaris*. Transección de una célula medial dentro del ISV y a su vez integridad del vaso que está por detrás del dañado **A**, visión en ángulo de 45° del daño **B**, vista sagital del embrión y la continuidad de los ISV a ambos lados de la geometría bilateral del pez antes del daño **C**, vista sagital del embrión luego del daño por fotoablación **D**.

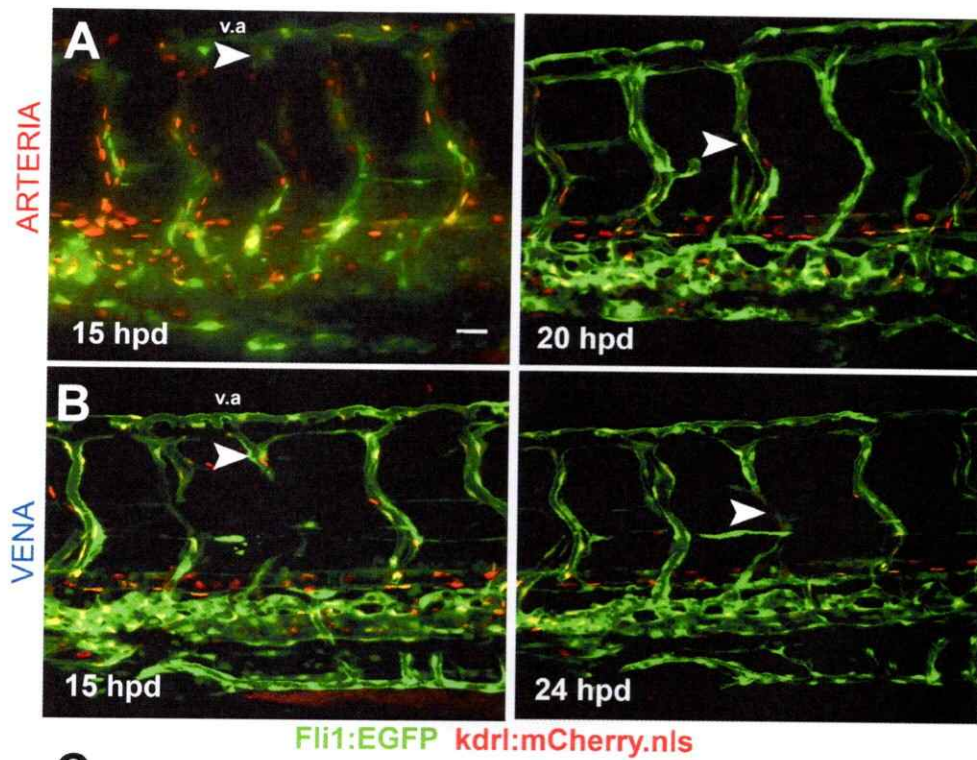
Objetivo específico 2. Estudiar la dinámica y velocidad de regeneración in vivo de los vasos intersegmentales de identidad venosa y arterial en un modelo de daño localizado en larvas de pez cebra.

Seguimiento de la regeneración de un ISV posterior al daño provocado por electroablación.

Para el registro de los procesos celulares involucrados en la regeneración posterior al daño por electroablación, se tomaron fotografías cada 2 horas de las larvas dañadas sobre el ISV proveniente de arteria y vena por separado, utilizamos 8 larvas para registrar la regeneración en la arteria y 8 larvas para el registro de la vena.. El daño producido interrumpió la marca fluorescente verde GFP correspondiente al vaso intersegmental como además la marca roja mCherry de los 3 núcleos que componen el ISV a los 3 dpf. Ambos vasos iniciaron la regeneración desde la orientación ventral a las 6 hpd, el registro nos permitió observar que luego de la electroablación los ISV extendieron el lumen del endotelio desde donde se encuentra el caudal arterial y/o venoso según corresponda el ISV, para luego migrar hacia dorsal. Interesantemente a las 15 hpd notamos que el lumen vascular del ISV tanto de la arteria y la vena, ubicado en dorsal donde se encuentra el vaso anastomótico, comenzó a extenderse en dirección hacia el centro desde donde se inició la lesión hasta conectar con la protrusión del lumen endotelial que venía creciendo desde ventral (figura 9A-B). A las 20 hpd el ISV proveniente de la arteria que fue dañado en toda su extensión, volvió a establecer la conexión por el contacto del lumen endotelial proveniente desde ventral y el lumen que se extendió a las 15 hpd desde dorsal, esta conexión se dio hacia el centro que fue el lugar donde se posicionó el

electrodo para provocar el daño (figura 9A). Además en este tiempo se consideró la regeneración completa del vaso por que el flujo sanguíneo volvió a pasar en la misma orientación desde ventral hacia dorsal, igual que antes de la ablación (la dirección y paso del flujo sanguíneo se distingue por el movimiento de eritrocitos a través del ISV el cual puede ser observado en campo claro o luz transmitida bajo el microscopio-datos no mostrados). Al cabo de 24 hpd el ISV dañado proveniente de la vena regeneró (figura 9B) y el flujo sanguíneo pasó en la misma dirección que antes del daño, es decir, desde dorsal a ventral (dato no mostrado).

Con estas fotografías tomadas para el registro de la regeneración cada cierto periodo, notamos que ambos vasos regeneraron en tiempos distintos, por lo tanto medimos la longitud en la unidad de micrómetros (μm) la extensión del lumen vascular que crece desde ventral a las 0 hpd hasta las 24 hpd (figura 9C). Realizamos el análisis estadístico de estas mediciones por el test anova de dos vías para la comparación de los datos del crecimiento del lumen vascular proveniente desde ventral, entre el grupo de 8 larvas dañadas en la arteria y 8 larvas dañadas en la vena. Observamos que durante los periodos de registro de regeneración correspondientes a las 0, 6, 10, 15 y 24 hpd hubo diferencias significativas entre el crecimiento de la arteria y la vena dado por un nivel de confianza estadística del 95% y un valor de significancia igual o mayor a $p < 0.05$.



C

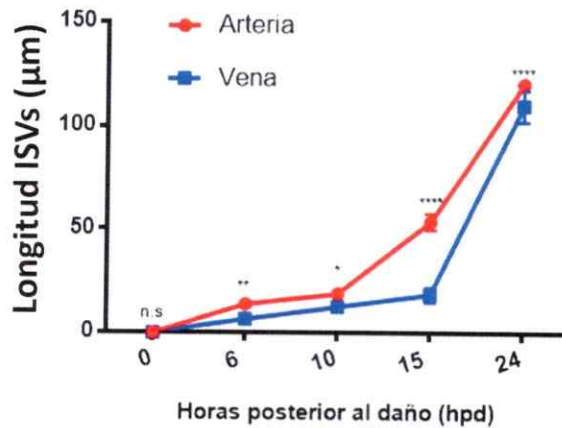


Figura 9. Extensión del lumen de los ISV de identidad arterial y venosa posterior al daño por electroablación. Fotografías representativas del proceso de regeneración luego del daño por electroablación, en el panel A y B observamos que a las 15 hpd el lumen endotelial proveniente desde dorsal se extiende desde los vasos anastomóticos (v.a) tanto en el ISV que proviene de la arteria y de la vena. A las 20 hpd se observa la reconexión del endotelio hacia el centro desde donde se produjo el daño. A las 24 hpd se observa la reconexión del endotelio en la vena. La significancia estadística esta dada por n.s= no significativo, *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ****= $p < 0.001$. Barra = 30 μm.

Análisis de la velocidad de regeneración del vaso intersegmental proveniente de la vena y arteria en la configuración de time lapse.

Tras haber optimizado la inducción de daño sobre un ISV proveniente de la arteria y la vena dentro de un mismo embrión por fotoablación, registramos la velocidad de crecimiento de estos vasos mediante la adquisición de imágenes en microscopía confocal *time lapse* con la configuración detallada en la figura 3. El registro tardó 19 horas luego de la ablación, donde observamos que el comportamiento de la regeneración en la arteria se caracterizó por el movimiento del lumen endotelial en dirección hacia el centro del daño, región donde se encontraba la célula endotelial medial antes de la fotoablación (figura 10 A-G). Como describimos anteriormente luego de la fotoablación sobre una célula medial dentro del ISV quedó un espacio, y sobre este espacio quedó el lumen endotelial del ISV adosado a los vasos anastomótico (v.a) en la sección dorsal del embrión, y debajo de ese espacio quedó lumen endotelial del mismo ISV adosado a la arteria o vena, según sea la identidad del vaso, en el caso de la arteria la reconexión de ambos lúmenes para la regeneración del ISV fue a las 5 hpd (figura 10D). Al término del registro el lumen del ISV con identidad de vena alcanzó hacer contacto pero no la conexión completa del vaso (figura 10H-M).

Mediante la obtención de 12 registros posterior a la fotoablación de los ISV de las larvas de pez cebra, se siguió y cuantificó el número de núcleos marcados en rojo por la marca fluorescente mCherry que se movieron desde el lumen de los vasos dañados en dirección hacia la zona donde se provocó la ablación de la célula endotelial. Hallamos que hubo diferencias significativas relacionadas a una mayor motilidad de células endoteliales hacia la zona dañada en la arteria que en la vena (figura 10N). A partir de estos resultados, notamos que no hubo proliferación celular

Objetivo específico 3. Caracterizar la respuesta inflamatoria desarrollada posterior a un daño sobre un vaso intersegmental.

Reclutamiento de neutrófilos hacia la zona dañada.

Evaluamos la respuesta inflamatoria causada por la inducción del daño por electroablación y fotoablación sobre un ISV. Para ello usamos los dobles transgénicos *Tg(mpo:mcherry;Fli1:EGFP)* para el caso de la electroablación y *Tg(mpo:GFP; Kdrl: mCherry)* para la fotoablación. La infiltración de neutrofilos luego del daño por ambos métodos comienza a las 0 hpd, desde donde se produce una acumulación progresiva y constante alcanzando un pic de inflamación a las 6 hpd para la electroablación y a las 8 hpd para la fotoablación (figura 11 A). En el daño por electroablación observamos que la regeneración del ISV se produce a las 24 hpd, sin embargo cuando medimos unidades arbitrarias de fluorescencia mCherry correspondiente a los neutrófilos por 24 horas notamos que la inflamación no tiene un comportamiento resolutivo. Hallamos que todos los tiempos de inflamación posterior al daño para este método son significativamente distintos, es decir a medida que progresa la regeneración del ISV la inflamación también lo hace y persiste incluso después de la regeneración del vaso. Del mismo modo evaluamos lo que ocurrió con el reclutamiento de neutrófilos por unidades arbitrarias (UA) de fluorescencia de la marca GFP positiva correspondiente a los neutrófilos en la región del daño. Observamos que el comportamiento de la curva inflamatoria se resuelve luego de que el ISV regeneró a las 10 hpd y las diferencias relacionadas a la inflamación por neutrófilos son significativas entre las 0 hpd y 2 hpd respecto al pic inflamatorio y también se da una diferencia significativa de la caída de la inflamación luego de que el ISV regeneró como se resume en la

figura 11B.

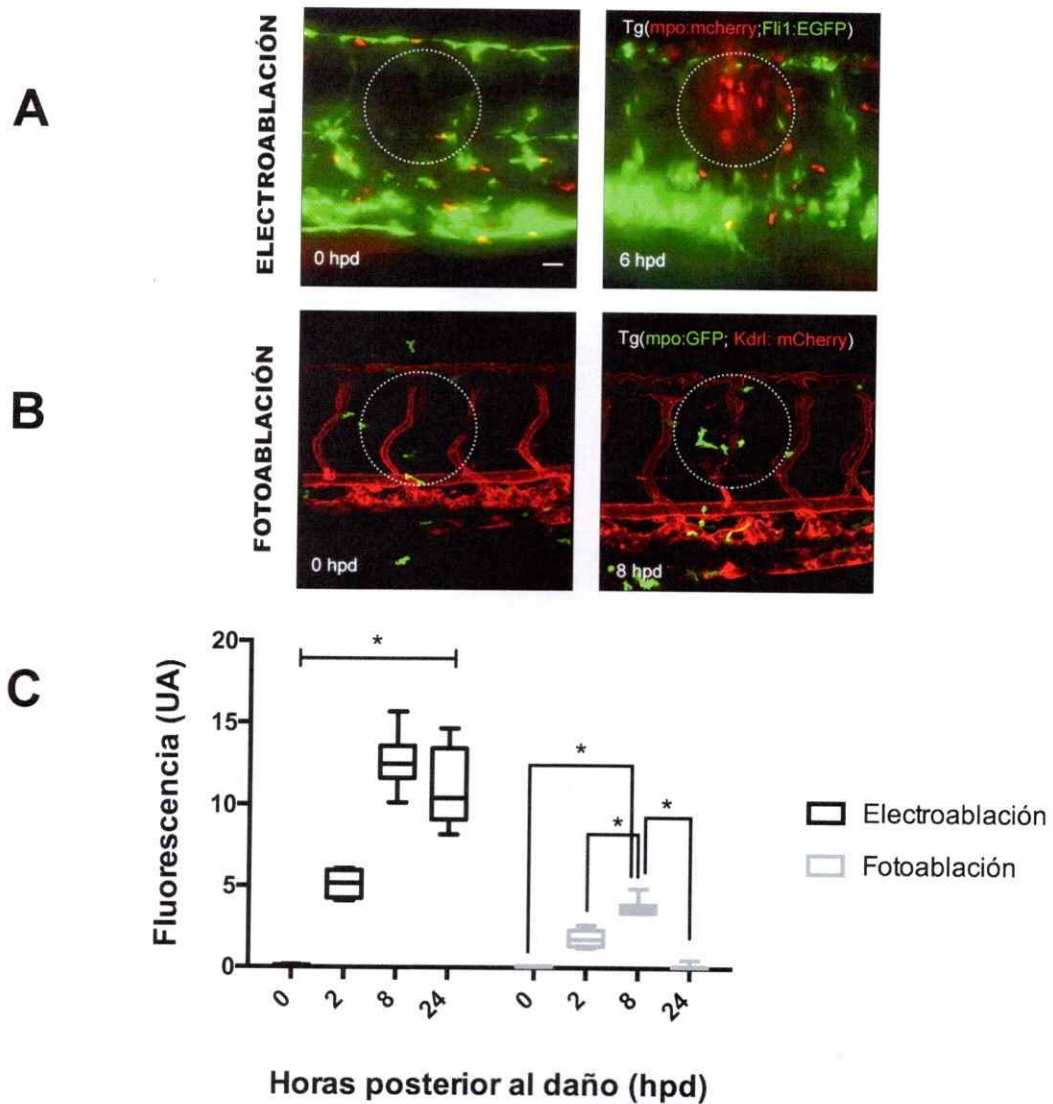


Figura 11. Inflamación por neutrófilos de la zona que subyace al daño posterior a electroablación y fotoablación sobre un ISV. Fotos representativas del área de registro 0 hpd y el pic inflamatorio 6 hpd para el daño provocado por electroablación en el doble transgénico Tg(mpo:mCherry;fli1:EGFP) A. Fotos representativas del área de registro del comportamiento inflamatorio 0 hpd y 8 hpd donde se da el pic de inflamación luego del daño por la configuración de fotoablación en el doble transgénico Tg(mpo:GFP;Kdr1:mCherry) B. Análisis estadístico y comparativo de la inflamación dentro de distintos tiempos, considerando la hora en que los vasos regeneraron en cada configuración de daño C. Estadístico de comparación de grupos anova de dos vías, valor de confianza 95%. $*=p<0.001$.

DISCUSIÓN

Los vasos intersegmentales del pez cebra son una poderosa herramienta para estudiar el comportamiento vascular luego del daño tisular.

El proceso de homeostasis vascular juega un rol fundamental tanto en salud como enfermedad y un desbalance en este proceso se asocia entre otras patologías a isquemia, enfermedades cardiovasculares, desordenes neurodegenerativos y falla en la cicatrización de heridas (Carmeliet 2003, 2005).

Con el propósito de comprender los mecanismos fisiológicos y patológicos relacionados con la angiogénesis y el restablecimiento de las funciones vasculares como también determinar la eficacia de fármacos anti- o pro- angiogénicos, se han establecido modelos para estudiar parámetros como longitud, diámetro, ramificación y la densidad vascular (Staton, Reed, y Brown 2009). Actualmente para desarrollar este tipo de investigación se realiza una combinación de aproximaciones *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* (H. M. Jung et al. 2016). Entre las aproximaciones *in vivo* destacan los modelos murinos y aviares, sin embargo, su utilización para el estudio de regeneración vascular y procesos angiogénicos es limitada debido a que en ellos no es posible distinguir con claridad la identidad de los vasos ni de otras estructuras que subyacen a los vasos.

Entre las muchas ventajas de utilizar un modelo de pez cebra para estudiar regeneración vascular destacan: el seguimiento *in vivo* de la regeneración posterior a un daño extensivo sobre el tejido adyacente a los vasos y la gran cantidad de muestras que se pueden procesar en un corto periodo. Es por ello que en este trabajo propusimos al embrión de 3 dpf ya que accedimos con facilidad a

los vasos intersegmentales para provocar un daño dirigido y además tuvimos acceso al registro de asociación entre estos vasos y otros tejidos que subyacen a la región de daño. La claridad óptica nos permitió distinguir la dirección del flujo sanguíneo en luz transmitida y así distinguir una vena de una arteria fácilmente.

A los 3 dpf los vasos intersegmentales se consideran vasos maduros como en un adulto por que están cubiertos de musculatura lisa y pericitos que le proporciona resistencia al lumen endotelial para el paso de flujo sanguíneo (Bergers y Song 2005), de esta manera nos aseguramos de trabajar con una red vascular con todas las características de un adulto pero sin las limitaciones relacionadas a la claridad óptica, ya que el único acceso a vasos sanguíneos en un adulto son los de la cola y la red vascular es compleja. Por lo tanto el fácil acceso y visualización de los ISV a los 3 dpf hizo de estos vasos una herramienta para inducir ablación del endotelio vascular y registrar la regeneración. Pudimos establecer un daño extenso por la configuración de electroablación y uno más discreto, y comparar el comportamiento de la red vascular en cada caso.

Los vasos intersegmentales regeneran luego de provocar un daño de distinta magnitud.

La mayoría de los vertebrados incluidos seres humanos, carecen de la capacidad de regenerar, dado que en lugar de ello solo tienen la capacidad de cicatrizar (Raya *et al.* 2004). Contrario a lo que ocurre en otros vertebrados como el pez cebrá y salamandras los cuales poseen la habilidad innata de regenerar el tejido dañado o reemplazar un órgano completo. Este tipo de regeneración

se denomina epimórfica, la cual se caracteriza por que en la zona de lesión las células que subyacen al daño se dediferencian para formar una masa de células denominada blastema con la capacidad de volver a diferenciarse al tejido que fue removido (Stewart y Stankunas 2012). Nuestros resultados son consistentes con la literatura demostrando que los vasos intersegmentales cuentan con la capacidad de regeneración incluso después de inducir un daño extenso sobre el tejido que subyace por la configuración de electroablación.

Los vasos intersegmentales no recapitulan la dirección de crecimiento del desarrollo durante la regeneración.

Durante el desarrollo del pez cebra al estadio de 13 somitos (estructuras que dan un patrón segmentado al embrión, a través del tronco y la cola) los precursores endoteliales ubicados en el mesodermo lateral, originan un plexo vascular primitivo y forman un sistema circulatorio sanguíneo, el cual es posible visualizar a las 24hpf. Luego de que se establece el plexo inicial conformado por el corazón, la aorta dorsal y la vena cardinal posterior el crecimiento de los otros vasos sanguíneos continúa por angiogénesis. Un ejemplo de esto último es el desarrollo de los vasos intersegmentales (ISV por sus siglas en inglés) del tronco (Figura 13A) (Baldessari y Mione 2008). El desarrollo de los ISVs comienza a las 22hpf, donde el primer brote angiogénico corresponde a las células endoteliales de la aorta dorsal (AD) las cuales crecen hacia dorsal hasta alcanzar el tubo neural dorsal, al llegar se conectan con el endotelio de los vasos vecinos de la parte anterior y posterior para formar un vaso transversal llamado vaso anastomótico longitudinal dorsal (de sus siglas en inglés DLAV). Diez horas más tarde, a las 32 hpf, comienza el brote angiogénico de células endoteliales provenientes de la vena cardinal posterior (de sus siglas en

ingés PCV) y de igual manera crecen hacia dorsal y se unen con los otros vasos vecinos (Ellertsdóttir *et al.* 2010). Por lo tanto es posible observar en un corte transversal del embrión una estructura y localización estereotipada de ISV en pares (uno por la derecha y otro por la izquierda) de ISVs en los límites de los somitos que rodean la notocorda (Childs *et al.* 2002). En relación al proceso de brote angiogénico posterior al daño, este inició a las 6 hpd desde la posición ventral, desde la arteria y la vena principal lo que hasta esa hora de registro es consistente con lo reportado en la literatura durante el desarrollo, lo que sugiere que las células endoteliales encargadas de extender protrusiones desde ventral podrían estar obedeciendo a un gradiente de VEGF localizado y a su vez la elongación de las células podría estar dado por el proceso de inhibición lateral relacionado a la señalización del ligando Delta 4 (*dll4*) proveniente de las células del tronco hacia las células vecinas que reciben esta señalización a través del receptor Notch-3. De esta manera el crecimiento angiogénico de estos vasos sigue un patrón de desarrollo correcto a través del tronco (Blanco y Gerhardt 2013). Sin esta señalización, como ocurre en el mutante para el ligando *dll4*, el patrón angiogénico sería defectuoso, afectando la forma en que se extienden estos vasos desde ventral hacia dorsal y también el flujo sanguíneo (Leslie *et al.* 2007). No obstante a través de nuestro trabajo demostramos que a las 15 hpd, se da inicio a la extensión de los vasos anastomóticos desde dorsal. Interesantemente esto no había sido reportado anteriormente, haciendo de este hallazgo un hito interesante en la descripción del comportamiento del endotelio posterior a un daño .

En experimentos realizados por Childs en el 2002, se analizaron las uniones oclusivas intercelulares entre estos vasos, hallaron que desde las 30 a 36 hpf un ISV se constituye de tres

células endoteliales (Figura 13B). Una de estas células está ubicada en ventral, embebida en la aorta dorsal o vena cardinal posterior, las cuales tienen como característica ser una célula endotelial líder (*tip cells*) en iniciar el brote angiogénico hacia dorsal extendiendo protrusiones de filopodios censando el factor angiogénico VEGF (Gerhardt *et al.* 2003). Flanqueando a esta célula líder se encuentran las células del tronco (*stalk cell*), y se caracteriza por tener una capacidad proliferativa quiescente (Blum *et al.* 2008). Hacia dorsal se encuentra una célula en forma de T que va a formar los vasos anastomóticos. Hacia el centro se encuentra una célula elongada que une las dos células descritas anteriormente. Nuestros resultados demuestran que la regeneración de los ISV provenientes de la arteria y la vena luego de que han regenerado vuelven a constituirse de 3 células endoteliales longitudinalmente, lo que se condice con el patrón vascular que adoptan estos vasos durante el desarrollo.

Las células líder y del tronco difieren por el perfil de expresión génica, además las células endoteliales angiogénicas difieren de las no angiogénicas por la expresión del gen *H2.0-like Homeobox-1 (hlx1)* (Herbert, Cheung, y Stainier 2012). Este perfil nos podría ayudar a distinguir en estudios posteriores cual es la célula líder a cargo del brote angiogénico durante la regeneración.

Estudios *in vivo* sugieren que la lumenización del ISV se forma a través de la fusión de vacuolas intracelulares con las células endoteliales vecinas para generar un tubo continuo provisto de lumen intracelular capaz de hacer circular eritrocitos y otros elementos sanguíneos (H. M. Jung *et al.* 2016). A las 36 hpf los ISV ya han adquirido la función de hacer circular flujo sanguíneo (Pan *et al.* 2017). En nuestros experimentos notamos que el ISV tomó la misma forma tubular

que tenía antes del daño, lo que podría sugerir que el proceso de regeneración recapitula el ensamblaje de vacuolas intracelulares entre las células endoteliales que subyacen al daño, además se re-estableció el flujo sanguíneo a través del ISV de la arteria y la vena en 24 horas posterior al daño tisular que provocó la electroablación, lo cual es interesante ya que la transección fue completa pero el sistema re-estableció la conexión en menos de 36 horas que es lo que tarda un vaso intersegmental en adquirir flujo sanguíneo.

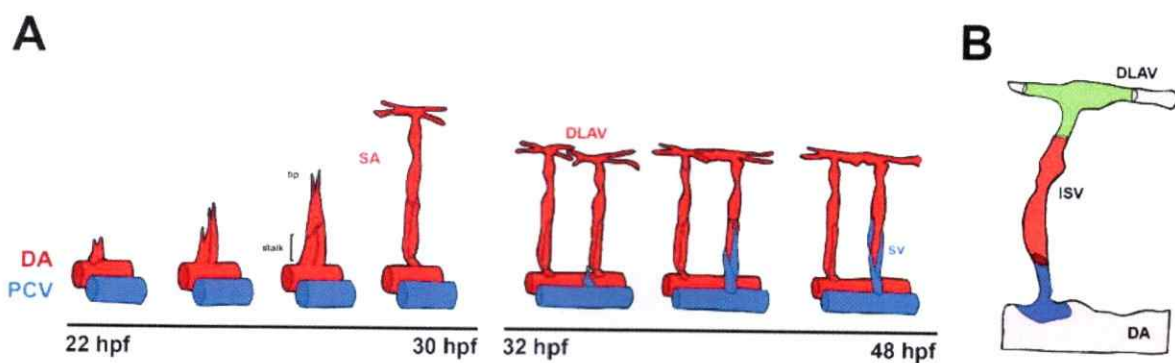


Figura 12. Desarrollo de los vasos intersegmentales ISVs. Línea de tiempo del desarrollo de los ISV, Aorta dorsal (de sus siglas en inglés DA), Vena cardinal posterior (siglas en inglés PCV) y Vasos anastomóticos longitudinales (siglas en inglés DLAV) del embrión de pez cebra en desarrollo panel **A**. Célula líder (*tip cells*) en azul, células del tronco (*Stalk cells*) en rosado, célula endotelial intermedia en rojo y célula en forma de T que va a formar los vasos anastomóticos en verde **B**.

La dinámica de regeneración de la arteria y la vena es distinta e independiente de la magnitud de daño.

Independiente de la configuración que usamos para inducir daño sobre el ISV, nuestros resultados siempre mostraron que la arteria regeneró antes que la vena, induciendo el mismo daño en todas las muestras. Este proceso podría ser explicado por *shear stress*, mecanismo relacionado con la formación de flujos sanguíneos y la diferenciación de células progenitoras endoteliales (Lu y Kassab 2011). Este fenómeno es conocido como la unidad de fuerza por unidad de área, creada cuando la fuerza tangencial del flujo sanguíneo, actúa sobre la superficie del endotelio, en donde si ocurre estrés mecánico o también conocido como mecanotransducción, se desencadena una respuesta bioquímica particularmente en arterias, a través de nitrovasodilatadores, prostaglandinas, lipoxigenasas, factores hiperpolarizantes y factores de crecimiento. Esto se produce una vez que ocurren cambios locales hemodinámicos que promueven la adaptación y remodelación de la pared de la arteria a través de la regulación génica local (Davies 2009). Por lo tanto nuestros resultados sugieren estar relacionados a la rápida adaptación y en este caso conexión por parte de la liberación de factores locales del endotelio arterial, para reestablecer el flujo sanguíneo local (Chien 2006).

Las arterias deben hacer circular sangre en alta concentración de oxígeno, por lo tanto estos conductos requieren volver a ser reconstruidos de manera que sean adecuado para la entrega rápida, eficiente y sostenible de sangre (Kametani *et al.* 2015). No obstante, queremos mencionar que si bien el daño por ambos métodos se realizó siempre de la misma manera por el protocolo

establecido durante este trabajo, notamos que en algunos casos luego de inducir la lesión la vena retrajo el endotelio en algunas oportunidades hasta el doble comparado con el de la arteria, esta retracción no la medimos pero cabe la posibilidad que el retraso en el crecimientos del ISV proveniente de la vena sea a causa de que tarda más en iniciar la elongación del endotelio versus la arteria, por que notamos que luego de 5 hpd la vena comienza a crecer visualmente con la misma velocidad de la arteria hacia el centro del daño.

Durante la regeneración del ISV se produjo migración de células endoteliales hacia la zona de daño.

Los vasos sanguíneos de transgénicos que marcan el endotelio en el adulto de pez cebra se distinguen en la cola (Wanjare, Kusuma, y Gerecht 2014). Estudios previos realizados en los vasos de la cola amputada del pez cebra adulto, describen tres pasos importantes para la reconstitución del endotelio vascular. Proponen, que el inicio de la regeneración se da con la formación de una cicatriz donde quedan células endoteliales remanentes. Luego de 2 dpd (días posterior al daño), el remanente de células endoteliales que quedó luego de la cicatrización comienza a brotar y se forma un plexo vascular primitivo, cuya estructura se asemeja al plexo capilar formado al inicio del desarrollo durante la vasculogénesis. A los 4 dpd este plexo se separa en un par de venas que flanquean a la arteria (Tu y Johnson 2011). Además de reportar que el tejido vascular amputado regenera y toma la disposición que tenía antes del daño han reportado que la vena contribuye a la regeneración de la arteria, es decir que células endoteliales de la vena las que inician el brote angiogénico para formar una red vascular primitiva y progresivamente formar la arteria dañada, esto lo comprobaron mediante el uso de transgénicos

que marcan la arteria y el registro por *time lapses* en la zona de daño (Kametani *et al.* 2015). A su vez otros reportes respaldan los antecedentes presentados y agregan que las células endoteliales líder (*tip cells*) de la vena son las encargadas de formar el plexo vascular primitivo, contribuyendo a la morfogénesis de los vasos de origen arterial nascentes durante la regeneración por migración de células de identidad venosa (Xu *et al.* 2014). Interesantemente a través de nuestros resultados demostramos por el registro de configuración por fotoablación que durante el periodo de regeneración hubo migración de células endoteliales hacia la zona de daño en el centro del ISV, consistente a lo observado en los resultados para la regeneración de los vasos en la cola. El movimiento de las células endoteliales provino del lumen remanente que quedó adosado hacia dorsal y ventral, sin embargo no observamos que la vena contribuyera con células endoteliales hacia la arteria como se reportó en adultos.

Para el caso de la arteria se ha reportado al receptor de citoquinas *cxcr4* y sus ligandos *cxcl12a* y *cxcl12b* como genes pro-migratorios, y el receptor está ubicado en las células de la punta (*tip cells*) (Bussmann, Wolfe, y Siekmann 2011). Una mutación para la pérdida de función de este receptor desencadena una reducción del número de células endoteliales y un acortamiento de los vasos provenientes de la arteria en la cola de adultos de pez cebra (Montes *et al.* 1982). Estos reportes podrían ser validados en embriones en el contexto de regeneración, dada la disponibilidad de daños dirigidos que logramos establecer y de la claridad óptica de las larvas, además es un mecanismo establecido y reportado que podría extender el conocimiento acerca de la regeneración de la arteria en los ISV como vasos angiogénicos.

El comportamiento resolutivo de la inflamación esta relacionado a la intensidad de daño sobre los ISV y el tejido adyacente.

Los neutrófilos son la primera línea defensiva del sistema inmune innato con una alta movilidad hacia la zona dañada, dado que en un tejido afectado son capaces de ingerir y remover microorganismos tales como bacterias, hongos y virus. Además estas células están encargados de remover del lugar de lesión los residuos celulares cuando el daño ha ocurrido sin la presencia de patógenos, si no más bien por un daño mecánico, conocido como inflamación estéril (Galdames *et al.* 2014). En el modelo de pez cebra a los 3 dpf solo podemos encontrar células del sistema inmune innato tales como macrófagos y neutrófilos, siendo estos últimos los primeros en reclutarse posterior a la lesión. A través de las configuraciones de daño provocamos una lesión denominada estéril y demostramos que al hacer un daño extensivo sobre el tejido la inflamación no se resolvió inclusive hasta el término de la regeneración del vaso, situación que fue totalmente opuesta para un daño más acotado. Por lo tanto podríamos sugerir que la electroablación podría ser una buena configuración para estudiar si existe una contribución del sistema inmune en la regeneración de vasos sanguíneos.

CONCLUSIONES

1. A través del establecimiento de métodos dirigidos de daño vascular, es posible registrar los procesos asociados a la regeneración vascular, sobre identidad arterial y venosa.
2. El daño inducido sobre los ISV por la configuración de electroablación como un daño extensivo por la transección completa de este vaso, tarda aproximadamente el doble del tiempo en regenerar que el daño sobre una sola célula endotelial y central dentro del ISV por la configuración de fotoablación.
3. En el registro de regeneración realizado posterior a la electroablación del vaso, el ISV proveniente de la arteria tardó menos en regenerar que la vena. En el daño por fotoablación se dio la misma situación, sin embargo este daño demostró en algunos casos retraer mayor longitud del endotelio remanente hacia ventral.
4. La respuesta inflamatoria es diferencial para la lesión producida por cada configuración de daño. El daño tisular producido por la electroablación no permite una resolución de la inflamación posterior a que el ISV regeneró. Por otra parte el daño dirigido a una célula única resuelve la inflamación en el momento en que regeneró el ISV.

PROYECCIONES FUTURAS

Las técnicas de daño reportadas en este trabajo y la amplia disponibilidad de transgénicos que marcan estructuras endoteliales, permitirán inducir daños dirigidos hacia vasos sanguíneos de distinta identidad, con el propósito de estudiar los mecanismos celulares que gobiernan la regeneración de la red vascular en embriones de pez cebra y validar estos experimentos en adultos del mismo modelo.

BIBLIOGRAFÍA

- Aghi, Manish y E. Antonio Chiocca. 2005. "Contribution of bone marrow-derived cells to blood vessels in ischemic tissues and tumors." *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 12(6):994–1005. (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525001605014310>).
- Asnani, A. y R. T. Peterson. 2014. "The zebrafish as a tool to identify novel therapies for human cardiovascular disease." *Disease Models & Mechanisms* 7(7):763–67. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24973746>).
- Baldessari, Danila y Marina Mione. 2008. "How to create the vascular tree? (Latest) help from the zebrafish." *Pharmacology & Therapeutics* 118(2):206–30. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18439684>).
- Bautch, V. L. 2002. "Embryonic stem cell differentiation and the vascular lineage." *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 185:117–25. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11768984>).
- Bautch, Victoria L. 2008. "Animal Models of Vascular Development and Endothelial Cell Biology." Pp. 355–60 en *Sourcebook of Models for Biomedical Research*. Totowa, NJ: Humana Press. (http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-285-4_38).
- Bergers, *et al.* 2005. "The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance." *Neuro-Oncology* 7(4):452–64. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16212810>).
- Blanco, *et al.* 2013. "VEGF and Notch in tip and stalk cell selection." *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 3(1):1–19.
- Blum, *et al.* 2008. "Complex cell rearrangements during intersegmental vessel sprouting and vessel fusion in the zebrafish embryo." *Developmental Biology* 316(2):312–22. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18342303>).
- Bussmann, *et al.* 2011. "Arterial-venous network formation during brain vascularization involves hemodynamic regulation of chemokine signaling." *Development* 138(9):1717–26. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21429983>).
- Butler, *et al.* 2010. "Endothelial Cells Are Essential for the Self-Renewal and Repopulation of Notch-Dependent Hematopoietic Stem Cells." *Cell Stem Cell* 6(3):251–64. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20207228>).
- Carmeliet, Peter. 2003. "Angiogenesis in health and disease." *Nature Medicine* 9(6):653–60.

- (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12778163>).
- Carmeliet, Peter. 2005. "Angiogenesis in life, disease and medicine." *Nature* 438(7070):932–36. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16355210>).
- Chávez, *et al.* 2016. "Zebrafish as an Emerging Model Organism to Study Angiogenesis in Development and Regeneration." *Frontiers in physiology* 7:56. (<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fphys.2016.00056/abstract>).
- Chien, S. 2006. "Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell." *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 292(3):H1209–24. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17098825>).
- Childs, *et al.* 2002. "Patterning of angiogenesis in the zebrafish embryo." *Development* 129(4). (<http://dev.biologists.org/content/129/4/973>).
- Clay, *et al.* 2015. "Mechanical Vessel Injury in Zebrafish Embryos." *Journal of Visualized Experiments* (96). (<http://www.jove.com/video/52460/mechanical-vessel-injury-in-zebrafish-embryos>).
- Cleaver, O. y P. A. Krieg. 1999. "Expression from DNA injected into *Xenopus* embryos." *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 127:133–53. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10503231>).
- Cleaver, *et al.* 1997. "Neovascularization of the *Xenopus* embryo." *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 210(1):66–77. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9286596>).
- Coultas, *et al.* 2005. "Endothelial cells and VEGF in vascular development." *Nature* 438(7070):937–45. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16355211>).
- Davies, Peter F. 2009. "Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology." *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* 6(1):16–26. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19029993>).
- Debefve, E. *et al.* 2010. "Photodynamic therapy induces selective extravasation of macromolecules: Insights using intravital microscopy." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 98(1):69–76. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20056552>).
- Detrich, H. W. *et al.* 1995. "Intraembryonic hematopoietic cell migration during vertebrate development." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(23):10713–17. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7479870>).

- Ellertsdóttir, Elín *et al.* 2010. "Vascular morphogenesis in the zebrafish embryo." *Developmental biology* 341(1):56–65. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19895803>).
- Fujita, M. *et al.* 2011. "Assembly and patterning of the vascular network of the vertebrate hindbrain." *Development* 138(9):1705–15. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21429985>).
- Galdames, *et al.* 2014. "Gcsf-Chr19 Promotes Neutrophil Migration to Damaged Tissue through Blood Vessels in Zebrafish." *The Journal of Immunology* 193(1):372–78. (<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1303220>).
- Gore, *et al.* 2012a. "Vascular development in the zebrafish." *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2(5):a006684. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3331685&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Gore, *et al.* 2012b. "Vascular development in the zebrafish." *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2(5):a006684. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22553495>).
- Herbert, *et al.* 2012. "Determination of endothelial stalk versus tip cell potential during angiogenesis by H2.0-like homeobox-1." *Current biology : CB* 22(19):1789–94. (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982212008627>).
- Isogai, *et al.* 2001a. "The vascular anatomy of the developing zebrafish: an atlas of embryonic and early larval development." *Developmental biology* 230(2):278–301. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11161578>).
- Isogai, *et al.* 2001b. "The vascular anatomy of the developing zebrafish: an atlas of embryonic and early larval development." *Developmental biology* 230(2):278–301. (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012160600999950>).
- Izumi, *et al.* 2012. "Fbxw7 controls angiogenesis by regulating endothelial notch activity." *PLoS ONE* 7(7).
- Jin, *et al.* 2005. "Cellular and molecular analyses of vascular tube and lumen formation in zebrafish." *Development (Cambridge, England)* 132(23):5199–5209. (<http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.02087>).
- Jung, H. M. *et al.* 2016. "Imaging blood vessels and lymphatic vessels in the zebrafish." Pp. 69–103 en. (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0091679X16300152>).
- Jung, In Hye *et al.* 2016. "Impaired Lymphocytes Development and Xenotransplantation of Gastrointestinal Tumor Cells in Prkdc-Null SCID Zebrafish Model." *Neoplasia (New York,*

- N.Y.) 18(8):468–79. (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1476558616300975>).
- Kamei, *et al.* 2004. “Imaging blood vessels in the zebrafish.” *Methods in cell biology* 76:51–74. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15602871>).
- Kametani, *et al.* 2015. “Notch signaling regulates venous arterialization during zebrafish fin regeneration HHS Public Access.” *Genes Cells* 20(5):427–38. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4996968/pdf/nihms-667732.pdf>).
- Kimmel, *et al.* 1995. “Stages of embryonic development of the zebrafish.” *Developmental Dynamics* 203(3):253–310. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8589427>).
- Lawson, *et al.* 2002. “In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish.” *Developmental biology* 248(2):307–18. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12167406>).
- Lelievre, E. *et al.* 2001. “Signaling Pathways Recruited by the Cardiotrophin-like Cytokine/Cytokine-like Factor-1 Composite Cytokine: specific requirement of the membrane-bound form of ciliary neurotrophic factor receptor ? component.” *Journal of Biological Chemistry* 276(25):22476–84. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11294841>).
- Leslie, *et al.* 2007. “Endothelial signalling by the Notch ligand Delta-like 4 restricts angiogenesis.” *Development (Cambridge, England)* 134(5):839–44.
- Lu, Deshun y Ghassan S. Kassab. s. f. “Role of shear stress and stretch in vascular mechanobiology.” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3163429/pdf/rsif20110177.pdf>).
- Luepke, N. P. 1985. “Hen’s egg chorioallantoic membrane test for irritation potential.” *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 23(2):287–91. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4040077>).
- Meng, *et al.* 2008. “Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases.” *Nature Biotechnology* 26(6):695–701. (<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2502069&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Montes, *et al.* 1982. “Fine structure and histochemistry of the tail fin ray in teleosts.” *Histochemistry* 75(3):363–76. Recuperado 7 de agosto de 2017 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7141889>).
- Moya-Díaz, José *et al.* 2014. “Electroablation: a method for neurectomy and localized tissue

- injury." *BMC developmental biology* 14(1):7.
(<http://bmcdevbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-213X-14-7>).
- North, *et al.* 2003. "Modeling human hematopoietic and cardiovascular diseases in zebrafish." *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 228(3):568–83. Recuperado 23 de junio de 2017
(<http://doi.wiley.com/10.1002/dvdy.10393>).
- Ogura, Toshihiko. 2002. "In vivo electroporation: a new frontier for gene delivery and embryology." *Differentiation* 70(4-5):163–71. Recuperado 22 de junio de 2017
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12147136>).
- Pan, *et al.* 2017. "Angiostatic actions of capsicodendrin through selective inhibition of VEGFR2-mediated AKT signaling and dysregulated autophagy." *Oncotarget* 8(8):12675–85. Recuperado 25 de junio de 2017 (<http://www.oncotarget.com/abstract/9307>).
- Pham, *et al.* 2007. "Combinatorial function of ETS transcription factors in the developing vasculature." *Developmental biology* 303(2):772–83. Recuperado 12 de enero de 2016
(<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1859867&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>).
- Raya, *et al.* 2004. "Cloning and stem cells the Zebrafish as a Model of Heart Regeneration." 6(4). (<http://belmonte.salk.edu/pubs/2004/2004-112-clonstemcell.raya.pdf>).
- Renshaw, S. A. *et al.* 2006. "A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation." *Blood* 108(13):3976–78. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16926288>).
- Stainier, *et al.* 1993. "Cardiovascular development in the zebrafish. I. Myocardial fate map and heart tube formation." *Development (Cambridge, England)* 119(1):31–40.
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8275863>).
- Staton *et al.* 2009. "A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays." *International journal of experimental pathology* 90(3):195–221.
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19563606>).
- Stewart, *et al.* 2012. "Limited dedifferentiation provides replacement tissue during zebrafish fin regeneration." *Developmental Biology* 365(2):339–49.
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22426105>).
- Streisinger, G., *et al.* 1981. "Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*)." *Nature* 291(5813):293–96.
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7248006>).
- Thompson, M. A. *et al.* 1998. "The cloche and spadetail genes differentially affect hematopoiesis

- and vasculogenesis." *Developmental biology* 197(2):248–69.
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9630750>).
- Thomson, J. A. *et al.* 1998. "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." *Science (New York, N.Y.)* 282(5391):1145–47.
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9804556>).
- Tu *et al.* 2011. "Fate Restriction in the Growing and Regenerating Zebrafish Fin." *Developmental Cell* 20(5):725–32. Recuperado 25 de junio de 2017
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21571228>).
- Wanjare *et al.* 2014. "Defining differences among perivascular cells derived from human pluripotent stem cells." *Stem cell reports* 2(5):561–75.
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24936446>).
- Weinstein, B. M. *et al.* 1995. "Gridlock, a localized heritable vascular patterning defect in the zebrafish." *Nature medicine* 1(11):1143–47.
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7584985>).
- Xu *et al.* 2014. "ARTICLE Arteries are formed by vein-derived endothelial tip cells." *Nature Communications* 5. (<https://www.nature.com/articles/ncomms6758.pdf>).
- Xu *et al.* 2015. "Intubation-based anesthesia for long-term time-lapse imaging of adult zebrafish." *Nature protocols* 10(12):2064–73. Recuperado
(<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nprot.2015.130>).
- Yancopoulos *et al.* 2000. "Vascular-specific growth factors and blood vessel formation." *Nature* 407(6801):242–48. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11001067>).
- Yoo *et al.* 2010. "Differential regulation of protrusion and polarity by PI3K during neutrophil motility in live zebrafish." *Developmental cell* 18(2):226–36.
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20159593>).