

UCH-FC
Biotecnología
H 557
C. 1

ESCUELA DE PREGRADO - FACULTAD DE CIENCIAS - UNIVERSIDAD DE CHILE



“EFECTOS DEL COBRE EN LARVAS DE PEZ CEBRA”

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

PEDRO PABLO HERNÁNDEZ CERDA

DR. MIGUEL ALLENDE CONELLY
Director Seminario de Título

Miguel Allende

Comisión de Evaluación Seminario de Título

DR. VÍCTOR CIFUENTES GÚZMAN
Presidente Comisión

[Firma]



Dra. VERÓNICA PALMA ALVARADO
Correctora

[Firma]

Santiago de Chile, julio de 2007





Santiaguino de nacimiento, Pedro vive su infancia y adolescencia en la comuna de Macul, periodo durante el cual estudia en distintos colegios: Colegio San Marcos, Liceo José Victorino Lastarria, Colegio Hispano-Americano y por último Liceo de Aplicación. Luego ingresa a la Universidad de Chile al programa de Bachillerato debido a su indecisión sobre que carrera elegir. A pesar de su pasión por la filosofía, decide embarcarse en el camino de la ciencia. Además de su interés por estas dos áreas del conocimiento, Pedro también se desarrolla como músico estudiando bajo eléctrico y formando parte de variadas bandas que deambulan entre el rock y el jazz. Luego de comenzar estudios de postgrado en Chile, Pedro decide viajar a Alemania a continuar dichos estudios.



DEDICATORIA

A mis pasiones y amores: Coté, la música y la ciencia.



AGRADECIMIENTOS

A Carmen Feijó por su organizacionalidad y orden

A Pablo Sandoval por su niñez

A Francisco Olivari por su feliz apatía y por hablar tanto

A Undu por sus años de amistad, carrete y también trabajo

A Javiera de la Paz por sus preguntas

A Viviana Gallardo por su espíritu deportivo

A Florencio Espinoza por su buena onda y buena disposición

A Gustafro por su servicialidad y trabajolicidad

A Catalina Lafourcade por cuidar a nuestra fuente de trabajo

A Francisco Romero por ser fan de mis bandas

A Andrés Sarrazin y Viviana Nuñez por sus opiniones, buena onda y por tener a la Julieta

A Juan Silva por su pañito, sus lavados y los queques baratos

A Natalia Mackenzie por haberme introducido al laboratorio

A mi madre por aguantarme tanto tiempo, por su alegría de vivir y por haberme dado libertad absoluta desde siempre

A Coté por su amor, amistad y ayuda

A los PALINDROMO por su rock

A los TECH CERRADO por su jazz, drum&bass y otros

A la música por ser tan apasionante

Al pez cebra por ser tan bonito

A Miguel Allende por aguantarme tanto rato en su laboratorio, por practicar y transmitir la horizontalidad en las relaciones de trabajo y por generar un ambiente en el cual da gusto dedicarse a investigar



INDICE DE CONTENIDOS



DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE DE CONTENIDOS	iv
INDICE DE TABLAS	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN	x
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El gen <i>zctr1</i> codifica para un transportador funcional de cobre	1
1.2 Letalidad de larvas inducida por cobre	4
1.3 Inducción la expresión de la proteína de estrés térmico HSP70	6
1.4 El cobre presente en el agua daña los neuromastos de la línea lateral del pez cebra	7
2. MATERIALES Y MÉTODOS	10
2.1 Materiales	10
2.1.1 Material Biológico	10
2.1.2 Reactivos para Biología Molecular	11
2.1.3 Reactivos para hibridación <i>in situ</i>	12
2.1.4 Reactivos para inmunocitoquímica e inmunofluorescencia	12
2.1.5 Reactivos para experimentos en levaduras	13
2.1.6 Soluciones de uso general	13
2.1.7 Otros	14
2.2 Métodos	15
2.2.1 Curvas de letalidad provocada por cobre en larvas de pez cebra	15
	iv

2.2.2 Cálculo de los valores de LC50	15
2.2.3 Construcciones de plásmidos para experimentos en levaduras	15
2.2.4 Obtención de levaduras competentes	15
2.2.5 Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	15
2.2.6 Complementación en levaduras mutantes de la cepa MPY17	16
2.2.7 Incorporación de cobre radioactivo en levaduras	16
2.2.8 Inducción de la expresión de la proteína de estrés térmico HSP70	17
2.2.9 Inmunocitoquímica en secciones	17
2.2.10 Tinciones vitales de embriones <i>in vivo</i>	17
2.2.11 Inmunocitoquímica en embriones completos (whole mount)	18
2.2.12 Protección de las células ciliadas del efecto del cobre mediante temperatura y obstrucción de canales iónicos	18
2.2.13 Relación entre la actividad de las células ciliadas y su sensibilidad al cobre	19
2.2.14 Análisis de proliferación celular mediante detección de la incorporación BrdU	19
2.2.15 Preparación de sonda de RNA para hibridación <i>in situ</i>	19
2.2.16 Hibridación <i>in situ</i>	20
2.2.17 Estadística, gráficos e imágenes	22
3. RESULTADOS	23
3.1 El gen <i>zctr1</i> codifica para un transportador funcional de cobre	23
3.1.1 Complementación en levaduras mutantes	23
3.1.2 Incorporación de cobre radioactivo en levaduras	26
3.2 Letalidad de larvas inducida por cobre	27



3.3 En larvas de pez cebra expuestas a cobre se induce la expresión de la proteína de estrés térmico HSP70	29
3.4 El cobre presente en el agua daña los neuromastos de la línea lateral del pez cebra	32
3.4.1 El daño provocado por el cobre sobre las superficie de las larvas es dependiente de la concentración y su ubicación coincide con la de los neuromastos	32
3.4.2 Pérdida de funcionalidad y muerte celular luego de tratamientos con cobre	33
3.4.3 Microscopía de campo claro y cuantificación de la muerte celular en neuromastos de larvas tratadas con cobre	35
3.4.4 Análisis de marcadores de neuromastos en larvas expuestas a cobre a través de microscopía convencional y confocal	37
3.4.5 En el neuromasto los tipos celulares dañados varían según la concentración de cobre usada	39
3.5 Protección de las células ciliadas de los efectos del cobre mediante cambios de temperatura y obstrucción de canales iónicos	42
3.6 Relación entre la actividad de las células ciliadas y su sensibilidad al cobre	44
3.7 Sensibilidad de los neuromastos al cobre en comparación con otros metales	45
3.8 Uso de la toxicidad del cobre para estudiar la regeneración de células ciliadas	47
3.8.1 La regeneración de los neuromastos depende de la concentración de cobre presente en el medio	47
3.8.2 Proliferación celular luego de los tratamientos con cobre	51



3.8.3 La regeneración de células ciliadas a partir de precursores mitóticos o no mitóticos depende de la profundidad del daño en el neuromasto	52
3.8.4 Presencia de células troncales en los neuromastos	54
4. DISCUSIÓN	56
4.1 El gen <i>zctr1</i> codifica para un transportador funcional de cobre	56
4.2 Letalidad de larvas inducida por cobre	57
4.3 En larvas de pez cebra expuestas a cobre se induce la activación del promotor de la proteína de estrés térmico HSP70	58
4.4 El cobre presente en el agua daña los neuromastos de la línea lateral del pez cebra	59
5. BIBLIOGRAFÍA	68



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sensibilidad de los neuromastos al cobre en comparación con otros metales 47



ÍNDICE DE FIGURAS

1. La expresión heteróloga de <i>zctr1</i> complementa la deficiencia respiratoria de la cepa MPY17, la cual no posee transportadores de cobre de alta afinidad	25
2. La expresión de <i>zctr1</i> en MPY17 estimula el incorporación de ^{64}Cu	26
3. Letalidad de larvas expuestas a cobre	28
4. Valores de LC50 para distintos tiempos de exposición a cobre	29
5. Efecto de la exposición aguda a distintas concentraciones de cobre en larvas transgénicas <i>hsp70:gfp</i>	30
6. Larvas transgénicas <i>hsp70:gfp</i> de 6 dpf expuestas a cobre por dos horas a los 3 dpf.	31
7. El cobre presente en el agua daña los neuromastos de la línea lateral	33
8. Funcionalidad y muerte celular en los neuromastos luego de tratamientos con cobre	35
9. Microscopía de campo claro y cuantificación de la muerte celular en neuromastos de larvas tratadas con cobre	37
10. Inmunodetección de tubulina acetilada en larvas expuestas a cobre	39
11. Tipos celulares del neuromasto.	40
12. Efecto del cobre en los distintos tipos celulares del neuromasto	42
13. Los efectos dañinos del cobre en los neuromastos son inhibidos con distintos tratamientos	44
14. Relación entre la actividad de las células ciliadas y su sensibilidad al cobre	45
15. Regeneración de neuromastos funcionales luego de incubaciones con cobre.	49
16. Reparición de células ciliadas luego de tratamientos con cobre	50
17. Proliferación en neuromastos luego de tratamientos con cobre	52
18. Regeneración de células ciliadas a partir de precursores mitóticos y no mitóticos	54
19. Expresión de <i>sox2</i> en la línea lateral	55

RESUMEN

El cobre es un ión esencial que participa como cofactor en una variedad de enzimas metabólicas. Sin embargo un exceso de este metal produce radicales libres que son tóxicos para las células y el organismo. Los peces han sido ampliamente usados para estudiar los efectos de metales pesados, incluyendo el cobre, presentes en el alimento y en el medio externo. Se ha demostrado que en peces adultos los metales inducen diferentes respuestas adaptativas. Hasta la fecha, existe poca información acerca de los efectos que produce el cobre durante los distintos estadios del desarrollo de los peces. En este trabajo se buscó describir el efecto que produce el cobre presente en el medio en la supervivencia de larvas de pez cebra. Se realizaron ensayos de toxicidad aguda y se generaron curvas de LC50, datos que mostraron ser muy útiles para diseñar experimentos destinados a encontrar efectos letales o subletales de este metal en el desarrollo de estos peces. También se comprobó la funcionalidad del transportador de cobre de alta afinidad de pez cebra (*zctr1*) realizando ensayos de complementación en levaduras mutantes para este tipo de transportadores. Aprovechando las ventajas de la utilización de embriones y larvas de pez cebra para estudiar la expresión génica durante el desarrollo, como por ejemplo su transparencia y fácil manipulación genética con herramientas moleculares, se estudió la expresión *in vivo* del gen de respuesta a estrés *hsp70* inducida al agregar este metal al medio externo. Finalmente, se analizó en mayor profundidad el efecto tóxico que produce este metal sobre el sistema mecanosensorial de la línea lateral de este pez. Además se propone, con resultados preliminares, el uso del daño que produce el cobre sobre la línea lateral como un sistema para estudiar la regeneración de este órgano sensorial.

INTRODUCCIÓN

En el desarrollo de esta tesis se analizó si el cobre presente en el medio influye en la supervivencia de larvas de pez cebra, se comprobó la funcionalidad del transportador de cobre de alta afinidad zCTR1, se estudió si este metal induce la expresión del gen de respuesta a estrés *hsp70* y finalmente se analizó el efecto tóxico que produce este metal sobre el sistema mecanosensorial de la línea lateral de este pez. Además se muestra la utilidad del cobre como un agente tóxico para estudiar la regeneración de este órgano sensorial.

1.1 El gen *zctr1* codifica para un transportador funcional de cobre.

La homeostasis de los iones metálicos es finamente regulada por diferentes procesos de incorporación, almacenamiento y secreción, por lo que existen una serie de transportadores en cada compartimiento celular que mantienen un delicado balance en las actividades de transporte a través de las membranas. Una baja actividad en los transportadores de cualquier ión metálico puede generar desregulación en el crecimiento celular y, a la vez, un exceso en su funcionamiento puede ser altamente tóxico para la célula. Estudios en transportadores de metales indican una acción coordinada de los sistemas de absorción y secreción para lograr una correcta homeostasis en los tejidos (Peña y cols., 1999).

Los organismos vivos requieren cobre para su crecimiento y desarrollo. Debido a su gran potencial redox, el cobre es un cofactor esencial de gran número de proteínas como la citocromo c oxidasa, la lisil oxidasa y la superóxido dismutasa y también es un elemento central en la proteína hemocianina de artrópodos y moluscos, equivalente a la hemoglobina humana, con un rol en el transporte del oxígeno. Muchas enfermedades humanas son atribuidas a defectos en el metabolismo del cobre. Atp7a es un exportador

que permite el paso de cobre desde las células intestinales hacia el torrente sanguíneo donde se une a albúmina para luego viajar al hígado. La disfunción de Atp7a en humanos provoca una deficiencia en la adquisición de cobre por el organismo llamada la enfermedad de Menkes (Lim y cols., 2006). A pesar de su papel esencial, el cobre en exceso resulta perjudicial para la supervivencia de las células debido a su naturaleza altamente reactiva. Mutaciones en la proteína Atp7b, un exportador similar al Atp7a, provocan una falla en la excreción de cobre en la bilis y una incorporación defectuosa de cobre en la ceruloplasmina, proteína que porta la mayoría de este metal circulante en la sangre. De esta manera el cobre se acumula en distintos tejidos produciendo especialmente en el hígado donde desencadena una toxicosis severa (Llanos y cols., 2002).

La adquisición de cobre en células eucariontes es llevada a cabo por transportadores. En vertebrados, el cobre es transportado principalmente a través del transportador de cobre de alta afinidad CTR1 o mediante el transportador de metales divalentes DMT1. Se ha descrito que DMT1 es capaz de transportar distintos metales divalentes, mientras que CTR1 es específico para cobre (Sharp y cols., 2003). Además de CTR1, una serie de otras proteínas que participan en la homeostasis de cobre en mamíferos han sido descritas en el pez cebra como por ejemplo la metalotioneína (Yan y cols., 2004, Chen y cols., 2004, Chan y cols., 2006), el factor de transcripción MTF-1 (Dalton y cols., 2000, Chen y cols., 2002), ceruloplasmina (Korzh y cols., 2001), e incluso se ha descrito una línea mutante para el gen de la enfermedad de Menkes (*atp7a*) (Mendelsohn y cols., 2006).

CTR1 es una proteína transmembrana altamente conservada que media la internalización de cobre desde el medio extracelular. El cDNA de *zctr1* codifica una proteína con un 69% de identidad con su ortólogo humano y muestra conservación de los residuos aminoacídicos específicos involucrados en el transporte de cobre. En el genoma del pez

cebra se encuentra una sola copia de este gen y su estructura genómica, consistente en 5 exones, es conservada con los genes *ctr1* de mamíferos. Análisis mediante hibridación in situ muestran que *zctr1* se expresa ubicuamente durante estadios tempranos, restringiéndose al cerebro y tejidos ventrales a las 24 horas postfertilización (hpf). A los 3 días de vida la expresión se centra principalmente en el intestino en desarrollo (Mackenzie y cols., 2004). En ratón se ha demostrado que la deficiencia de este gen provoca la muerte en etapas tempranas de la gestación, mientras que animales heterocigotos muestran una alta sensibilidad a niveles bajos de cobre en la dieta y acumulan bajos niveles de cobre en algunos tejidos (Lee et al., 2001; Kuo et al., 2001). En pez cebra el bloqueo de la expresión de *zctr1* utilizando oligonucleótidos (morpholinos) antisentido provoca la letalidad en larvas tempranas, indicando la esencialidad de este gen para el desarrollo (Mackenzie y cols., 2004).

Estudios en bacterias y levaduras han permitido la identificación de componentes esenciales en la homeostasis de cobre. A pesar de que los mecanismos no son completamente conservados entre especies, las proteínas relacionadas con el transporte del cobre comparten dominios funcionales modulares. La identificación de proteínas transportadoras de cobre en microorganismos ha permitido dilucidar su funcionamiento y ha ayudado a identificar sus homólogos en mamíferos.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* el transporte y la distribución intracelular del ión cobre han sido ampliamente estudiados debido a que se conoce la totalidad de su genoma y a la facilidad con la que es posible aislar y estudiar mutantes. A excepción de los factores de transcripción metaloreguladores Ace1 y Mac1 (Koch y cols., 1997, Winge 1998), todos los genes relacionados con la homeostasis de cobre que han sido identificados en levadura presentan homólogos en humano. Si bien no se han determinado todos los mecanismos de absorción de cobre en levaduras, estudios

genéticos han comenzado a entregar información importante acerca de proteínas relacionadas en este proceso.

Las primeras descripciones del transportador de membrana CTR1 se realizaron en estudios de mutantes de levadura para este gen. Una alteración cromosomal del gen *ctr1* de *Saccharomyces cerevisiae* genera fenotipos asociados con la pérdida de absorción de cobre como son: disminución del crecimiento en medio pobre en cobre, deficiencia en la cadena respiratoria (debido a la incapacidad de entregar cobre a la citocromo C oxidasa), sensibilidad al estrés oxidativo (debido al déficit de cobre en la superóxido dismutasa), incapacidad de transportar hierro (debido a la inhabilidad de proveer de cobre a la ferroxidasa multicobre Fet3 requerida para la absorción de alta afinidad de hierro), entre otras.

En 1997, se identificó una secuencia humana de DNA (cDNA) homóloga al transportador de alta afinidad *ctr1* de levaduras, denotado *hctr1* (Zhou y cols., 1997). Este gen se obtuvo a partir de complementación funcional de levaduras defectuosas en la respiración que presentaban deficiencia en el transporte de cobre ya que eran mutantes para el transportador CTR1.

Como se verá en los resultados de este trabajo, ensayos de complementación de esta levadura mutante basados en la expresión heteróloga del gen *ctr1* de pez cebra, permitieron comprobar el funcionamiento de esta proteína como transportador.

1.2 Letalidad de larvas inducida por cobre.

Los metales pesados son considerados importantes agentes contaminantes en ecosistemas acuáticos. Las sales de los metales pesados solubles en agua son tóxicas y acumulables por los organismos que los absorben, los cuales al ser ingeridos se convierten en fuente de contaminación para otros organismos de la cadena alimenticia. Bacterias, protozoos, nemátodos, plantas acuáticas y peces han sido utilizados como

organismos modelo para estudiar la toxicidad de metales pesados en ambientes acuáticos (Fenske y cols., 2006). El uso de peces como modelo experimental ha incrementado de manera importante debido a ventajas como su pequeño tamaño y su rápida reproducción lo que los hace idóneos para las más variadas pruebas, especialmente como animales de prueba en investigaciones toxicológicas y el monitoreo de la contaminación de ambientes acuáticos. A partir de la década de los 70 se empezó a utilizar el Pez Cebra (*Danio rerio*) como modelo experimental en el área de biología del desarrollo y en la última década se ha vuelto un importante modelo para la investigación toxicológica. También ha sido una herramienta útil para el descubrimiento de drogas de relevancia biomédica. Entre las ventajas generales del uso del pez cebra se pueden mencionar:

- La fertilización y desarrollo externo permiten que su observación y manipulación sea mucho más fácil que con modelos animales.
- Los embriones son transparentes por lo que los órganos y tejidos internos pueden ser visualizados fácilmente.
- El costo de su manutención es bajo en comparación con otros modelos debido a su pequeño tamaño, alta tasa de reproducción y corto tiempo generacional.
- Su desarrollo ocurre rápidamente. En 24 horas un embrión de pez cebra se encuentra en un estadio de desarrollo similar al que alcanza un ratón a los 21 días.
- Su genoma se encuentra secuenciado completamente lo que junto con la gran progenie obtenible a partir de una pareja permite mapeos de mutaciones y genes con una alta resolución.
- Es un vertebrado, y por lo tanto, presenta una alta homología genética con el resto de los vertebrados, el hombre incluido.

Los bioensayos han sido el método tradicional para documentar los efectos de los contaminantes sobre los sistemas vivos. Las pruebas de letalidad o de toxicidad aguda permiten evaluar los principales efectos de los contaminantes sobre los organismos o las

poblaciones acuáticas a corto plazo. La mayoría de los estudios de toxicidad aguda en peces reportan sus resultados calculando el valor de LC50, que es la concentración que resulta letal para el 50% de los peces expuestos durante un período de tiempo específico. El pez cebra ha sido extensamente usado para la detección de contaminación de metales pesados convirtiéndose en un conveniente sensor biológico (Dave y Xiu, 1991; Ribeyre y cols., 1995; Rougier y cols., 1996; Blechinger y cols., 2002b; Li y cols., 2004; Chan y Cheng, 2003). Sin embargo, existe muy poca información acerca de los efectos del cobre en el desarrollo temprano de los peces y de su potencial toxicidad a bajas concentraciones.

1.3 Inducción la expresión de la proteína de estrés térmico HSP70.

Las proteínas de estrés térmico (heat shock proteins, HSPs) son una familia de chaperonas moleculares altamente conservadas presentes en las células de todos los organismos conocidos (Cyr y Neupert, 1996, Jaattela y cols., 1999, Whitley y cols., 1999). Se ha descrito que al exponer células animales a diferentes tipos de estrés como son calor, metales pesados, agentes virales y especies reactivas de oxígeno, la inducción de la expresión del gen *hsp70* protege a las células de los efectos dañinos del agente estresante (Beckmann y cols., 1990, Chiang y cols., 1989, Grosvik y Goksoyr, 1996, Parsell y Lindquist, 1993, Sanders y cols., 1995, Wagner y cols., 1999). El cobre cataliza la producción de iones altamente reactivos como por ejemplo el radical hidroxilo a través de una reacción similar a la reacción de Fenton. De esta manera el cobre puede causar estrés oxidativo en las células donde se encuentra en exceso.

Diversas señales ambientales desencadenan la activación de genes de estrés térmico a través de el factor de transcripción de estrés térmico HSF. La región promotora de estos genes contienen elementos de estrés térmico (heat shock element, HSE), los que son responsables de la regulación transcripcional mediante la unión de HSF. En peces se ha

descrito la unión de HSF a los sitios HSE durante la inducción de la expresión de *hsp70* (Airaksinen y cols., 1998).

Los metales pesados, además de inducir la expresión de HSPs son capaces de inducir la expresión de metalotioneínas (MTs) (Durnam y Palmiter, 1981). Las MTs participan en la homeostasis y detoxificación de metales (Palmiter, 1998), y son comúnmente clasificadas como una familia de proteínas de respuesta a estrés, ya que su expresión no es inducida solo por metales sino que también por citoquinas (Karin y cols., 1985, De y cols., 1990), mitógenos (Imbra y Karin, 1987), y glucocorticoides (Karin y Herschman, 1979). Sin embargo las MTs no están estructuralmente relacionadas a la familia de HSPs, es más, su peculiar estructura rica en cisteínas les confiere la especializada función de unirse con alta afinidad a los metales protegiendo a la célula de un potencial daño. (Klaassen y cols., 1999).

En un estudio reciente se utilizaron embriones transgénicos de pez cebra para estudiar la toxicidad aguda producida por el cadmio presente en el medio externo. Esta línea transgénica posee en su genoma la proteína fluorescente verde (GFP, por sus siglas en inglés) bajo el control del promotor del gen de respuesta a estrés térmico *hsp70*. Los experimentos llevados a cabo en este estudio mostraron que el cadmio induce la expresión de GFP en órganos como el hígado, las branquias y el ducto pronéptico (Blechinger y cols., 2002b).

1.4 El cobre presente en el agua daña los neuromastos de la línea lateral del pez cebra.

En pez cebra, la línea lateral se desarrolla durante los estadios larvales tempranos. Este sistema sensorial consiste en un arreglo regular de neuromastos presentes en la superficie del cuerpo que están en contacto directo con el medio externo (Ghysen y Dambly-Chaudière, 2004). El neuromasto está compuesto de por lo menos dos tipos

celulares: las células mecanosensoriales, llamadas células ciliadas, y las células de soporte. Las células ciliadas del neuromasto son similares a las presentes en el oído de los vertebrados y debido a que están expuestas al medio externo, pueden ser marcadas fácilmente *in vivo* con tinciones fluorescentes como 4-Di-2-Asp (DiAsp), DASPEI y FM1-43 (Collazo y cols., 1994; Nishikawa y Sasaki, 1996). Aunque aún no existe consenso sobre cual es el mecanismo de entrada de estas tinciones, existen evidencias que apoyan las dos hipótesis propuestas: por medio de endocitosis (Seiler y Nicolson, 1999; Griesinger y cols., 2002) o a través de canales de mecanotransducción presentes en el polo apical de las células ciliadas (Gale y cols., 2001; Meyers y cols., 2003; Corey y cols., 2004).

Las células ciliadas del oído interno de mamíferos son altamente sensibles a variados compuestos, incluyendo drogas de importante uso clínico. La ototoxicidad es el mayor efecto secundario de los antibióticos de tipo aminoglicosídico y de las drogas anticáncer basadas en plata (Nakashima y cols., 2000; Schweitzer, 1993). Se ha demostrado que las células ciliadas de la línea lateral del pez cebra son sensibles a neomicina (Harris y cols., 2003), mostrando un paralelo funcional con las células ciliadas del oído interno de mamíferos.

A diferencia de los que sucede en mamíferos, en anamniotos las células ciliadas son capaces de regenerar luego de sufrir un daño, sugiriendo la presencia de una población de progenitores o un alto grado de plasticidad de las células de soporte, las cuales podrían dividirse y/o transdiferenciarse a células ciliadas (Balak y cols., 1990). Existen pocos estudios sobre la potencial toxicidad de los iones metálicos en las células ciliadas.

En un reciente trabajo se describió que el cobre presente en el agua durante la embriogénesis del pez "fathead minnows" afecta negativamente su quimiosensación (Carreau y Pyle, 2005).

Los resultados expuestos en esta tesis muestran que exposiciones transitorias de larvas de pez cebra a concentraciones micromolares de cobre, producen un efecto dañino

específico sobre la línea lateral, manteniéndose su morfología gruesa y su supervivencia intactos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Material biológico.

2.1.1.1 Pez cebra.

Los experimentos aquí descritos se llevaron a cabo utilizando embriones y larvas de pez cebra (*Danio rerio*), obtenidos realizando cruces de peces adultos. Los peces se mantuvieron en acuarios con circulación constante de agua y aire a una temperatura de 28°C, con un ciclo de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad. Se alimentaron tres veces al día y se monitorearon sus condiciones de temperatura y pH. Para realizar cruces, se separaron los machos de las hembras durante la noche y se juntaron en la mañana siguiente en el momento en que la luz del vivero se enciende. De esta manera, es posible controlar el momento de la fertilización. El estadio de los embriones es expresado en horas post-fertilización (hpf) y días post fertilización (dpf). Durante el cruce los peces se colocaron en estanques pequeños provistos de una rejilla para impedir que los peces se alimentaran de sus huevos. Los embriones y larvas se mantuvieron en incubadores a 28°C en medio E3 1X el cual contiene azul de metileno que evita el crecimiento de hongos.

2.1.1.2 Bacterias.

En las transformaciones con ADN para diferentes usos en biología molecular se utilizó bacterias competentes de las cepas *DH5 α* y *JM109* de *Escherichia coli*.

2.1.1.3 Levaduras.

Se usó la cepa mutante de *Saccharomyces cerevisiae* MPY17 (*ctr1 Δ* , *ctr3 Δ* , genotipo *MATa ctr1::ura3::Kan^r ctr3::TRP1 his3 lys2-801 CUP1^R*) donada por el Dr. Dennis J. Thiele, The University of Michigan Medical School, Ann Arbor, Michigan y la levadura

silvestre cepa RSY255 (genotipo Mat α Ura3-52, leu2-2111) donada por el Dr. Ariel Orellana, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias, Laboratorio de Fisiología vegetal.

2.1.2 Reactivos para Biología Molecular

- Acetato de Sodio 3M pH5.2, Winkler Ltda., Chile.
- Agarosa, Winkler Ltda., Chile.
- Agua sin nucleasas, Winkler Ltda., Chile.
- Cloroformo: Alcohol iso-amílico 24:1, Winkler Ltda., Chile.
- DNAsa, Boehringer, Mannheim, Alemania.
- DTT 0.1M, Amersham Pharmacia Biotech, Inglaterra.
- EDTA 0.5M pH8, Winkler Ltda., Chile.
- Enzimas de restricción: Apal, BamHI, EcoRI, EcoRV, HindII, SacI, SacII, XbaI, XhoI, MBI Fermentas.
- Enzimas polimerasas T7, T3, Sp6, MBI, Fermentas.
- Etanol, Merck, Alemania.
- Fenol: Cloroformo básico, Winkler Ltda., Chile.
- Isopropanol, Merck, Alemania.
- LiCl 10M, Winkler Ltda., Chile.
- MgCl₂ 50mM, New England Biolabs, Estados Unidos.
- Naranja de acridina, Merck, Alemania.
- NTPs, MBI Fermentas, Lituania.
- Plasmidio p413GPD, Mumberg D., y cols (1995).
- Plasmido pSC2+MT-zctr1, Mackenzie NC y cols (2004).
- RNAsa (libre de DNAsa), Boehringer, Mannheim, Alemania.
- RNAsin (inhibidor de RNAsas), Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Alemania.
- Silica, Winkler Ltda., Chile.
- Tampón T4 DNA Ligasa 10x y T4 DNA Ligasa, Biolabs, New England.

- Tampón transcriptasa reversa.

-Tampón de reacción de PCR 10x sin cloruro de Magnesio, Taq polimerasa y Deoxinucleósidos de trifosfato para PCR, dTTP, dATP, dCTP, dGTP, GibcoBRL, Inglaterra.

- X-gal, Winkler Ltda., Chile.

2.1.3 Reactivos para Hibridación *in situ*

- Anticuerpo Anti-Digoxigenina y NBT/BCIP (Nitro blue tetrazolium chloride/5-bromo-4 – chloro-3-indolphosphate), Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Alemania

- Formamida, Merck, Alemania

- Metanol, Merck, Alemania

- Peróxido de hidrógeno, Merck, Alemania

- Proteinasa K, Merck, Alemania

- NBT/BCIP, Boehringer Mannheim, Alemania.

- PFA 4%, J.T. Baker, Phillipsburg, USA.

2.1.4 Reactivos para inmunocitoquímica e inmunofluorescencia.

- Acetona, Merck, Alemania.

- Anticuerpo anti-myc, Santa Cruz Biotechnology, EEUU.

- Anticuerpo anti-tubulina acetilada, Santa Cruz Biotechnology, EEUU.

- Anticuerpo anti-GFP, Molecular Probes, EEUU.

- Anticuerpo anti-PCNA, Santa Cruz Biotechnology, EEUU.

- Diaminobenzidina (DAB, 30mg en 100ml PBS, 0.03% w/v), Sigma, Saint Louis, EEUU.

- Alexa Fluor 488-conjugado anti-ratón IgG (Molecular Probes A21200).

- Anti-ratón IgG, horseradish peroxidasa (HRP) linked whole antibody (Molecular Probes G21040).

- Anti-conejo IgG, conjugado a TRITC, Santa Cruz Biotechnology, EEUU.

- Metanol, Merck, Alemania.

- Peróxido de hidrógeno, Merck, Alemania.
- PFA 4%, J.T. Baker, Phillipsburg, USA.
- Solución de bloqueo (20% suero de bovino, 1% DMSO, 0.3% Tween-20 en PBS, 0.5% tritón).

2.1.5 Reactivos para experimentos con levaduras.

- CuSO₄ radioactivo, actividad específica de 1.6 mCi/mg, Comisión Chilena de Energía Nuclear.
- Medio YPD (extracto de levadura 1%, bactopectona 2%, glucosa 2%).
- Medio YPG (extracto de levadura 1%, bactopectona 2%, glicerol 3%).
- Medio YPE (extracto de levadura 1%, bactopectona 2%, etanol 3%).
- Medio SC-Histidina: base nitrogenada de levaduras sin aminoácidos (YNB) 0,17%, sulfato de amonio 0,5%, glucosa 2%, lisina 30µg/ml, uracilo 30µg/ml.
- Para preparar los medios sólidos en placas petri, se agregó a los ingredientes anteriores agar al 1,5%.

2.1.6 Soluciones de uso general.

- Acetona, Merck, Alemania.
- CuSO₄, ZnSO₄, FeCl₃, AgNO₃, SnCl₂, MnCl₂, CoCl₂, y CdCl₂ Merck, Alemania.
- EDTA 0.2M Winkler Ltda, Chile.
- PBS (Winkler Ltda, Chile).
- PBST (PBS+Tween-20 0.1%).
- Solución E3 1X (NaCl 5mM; KCl 0.17mM; CaCl₂ 0.13mM; MgSO₄ 0.33mM; Azul de Metileno 10⁻⁵ %).
- Solución de corrida de electroforésis TAE 50x (242 grs de tris base, 57.1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de EDTA 0.5 M pH 8 para un volumen final de 1 lt).
- Solución blanqueo (5.95 ml de agua destilada, 0.25 ml de SSC20x, 0.5 ml de formamida, 3.3 ml de peróxido de hidrógeno al 30% para 10 ml totales).

2.1.7 Otros

- Sistema comercial "Concert Rapid Gel Extraction System", GibcoBRL, Reino Unido.
- Sistema comercial "Concert Rapid PCR Purification Protocol", GibcoBRL, Reino Unido.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Curvas de letalidad provocada por cobre en larvas de pez cebra.

Larvas 72 horas post fertilización (hpf) fueron expuestas a 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 μM CuSO_4 disuelto en el medio de incubación E3. El número de larvas muertas fue contado y removido después de 1, 2, 3, 6, 18, 24, 30, 42, 48, 54, 66, 71, 78, 90 y 96 horas de incubación. Para cada concentración fueron incubadas 15 larvas en placas petri de 10 cm de diámetro y se calculó el promedio de 3 experimentos independientes. Se calculó el porcentaje de larvas muertas (acumulativamente) en cuanto a la cantidad de larvas al inicio de la incubación.

2.2.2 Cálculo de los valores de LC50.

Los datos de las curvas de letalidad fueron usados para calcular los valores de LC50, con un límite de confianza de 95%, para cada tiempo de incubación. Se utilizó el programa Trimmed Spearman-Kärber method version 1.5 (Hamilton, 1977).

2.2.3 Construcciones de plásmidos para experimentos en levaduras.

La construcción del plasmidio p413GPD-zctr1 (gen *zctr1* insertado en un vector de expresión para *S. cerevisiae*) se llevó a cabo liberando el gen *zctr1* desde el plasmidio pCS2+MT-zctr1myc (Mackenzie et al., 2004) utilizando las enzimas de restricción BamHI y ClaI, para luego subclonarlo en el vector p413GPD digerido con las mismas enzimas presentes en su polylinker. Con esta estrategia el gen se subclonó en la orientación adecuada para su expresión.

2.2.4 Obtención de levaduras competentes.

Se cultivó la levadura en 300 ml de medio YPD hasta una DO_{600} de 0,2 - 0,3. Luego el cultivo se lavó dos veces en agua estéril y se resuspendió en 1,5 ml de solución fresca de acetato de litio (Acetato de litio 100mM en TE pH 7,5).

2.2.5 Transformación de *S. cerevisiae*.

Se mezclaron 100 μ l de *S.cerevisiae* competentes con 100 μ g de ADN de espermio de salmón y 0,1 μ g del plasmidio p413GPD o p413GPD-ZCRT1. Se agregaron 600 μ l de una solución al 50% de polietilenglicol (PM 3.350) y acetato de litio 0,1 M, y se incubó a 30 °C por 30 min. con agitación constante. Se agregaron 70 μ l de DMSO. La mezcla completa se incubó en hielo por 10 min., luego a 42°C por 15 min. e inmediatamente después se incubaron en hielo por 10 min. Las células se sedimentaron a 14.000 g, 4°C durante 5 segundos y se resuspendieron en medio mínimo líquido. Para la selección de transformantes, las células sometidas al procedimiento anterior fueron cultivadas en medio mínimo a 30°C por 16 horas en agitación. Posteriormente, alícuotas de cultivo fueron sembradas en medio mínimo sólido e incubadas a 30 °C por dos días o hasta la aparición de colonias.

2.2.6 Complementación en levaduras mutantes de la cepa MPY17.

Las levaduras mutantes MPY17 transformadas con p413GPD o p413GPD-ZCTR1, al igual que la mutante sin transformar y la RSY255, fueron sembradas en placas con medio sólido restrictivo YPG o YPE, y en medio rico YPD. Las placas se incubaron por 4 días a 30°C.

2.2.7 Incorporación de cobre radioactivo en levaduras.

Células de la cepa MPY17 (*ctr1 Δ* , *ctr3 Δ*) transformadas con el vector p413GPD o con el vector p413GPD-ZCTR1 fueron crecidas en medio líquido (YPD para la cepa sin transformar y SC-His para la cepa transformada)] hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm entre 0.9 y 1.1. Se adicionó cobre radioactivo a un 1 ml de cada una de las cepas hasta alcanzar una concentración final de 10 μ M y después se incubaron durante 10 minutos a 30°C ó 4°C. Transcurrido este tiempo, el contenido de cada tubo fue filtrado en una membrana de nitrocelulosa, usando una cámara de vacío. Inmediatamente las membranas fueron lavadas con 5 ml de EDTA 10 mM frío seguido de 1 ml de CuSO₄ 10 μ M frío. Las membranas fueron secadas y colocadas en tubos eppendorf de 1.5 ml con 1

ml de líquido de centelleo los cuales fueron colocados dentro de viales de vidrio. Las muestras fueron analizadas por un contador de centelleo Packard Tricarb 2100TR. Los valores obtenidos fueron normalizados a una densidad óptica igual a 1. Los datos de las incubaciones a 4°C fueron restados a los de 30°C para eliminar el centelleo del cobre unido a las células de manera no específica. Cada experimento fue hecho por triplicado.

2.2.8 Inducción de la expresión del gen de estrés térmico *hsp70*.

Se expusieron embriones transgénicos que expresan la proteína fluorescente verde (GFP) bajo el promotor del gen de la proteína de estrés térmico HSP70 (Halloran MC y cols., 2000) a diferentes concentraciones de sulfato de cobre disuelto en el medio. Larvas de 80 hpf permanecieron en medio con 0, 100, 200 ó 400 μ M de sulfato de cobre durante dos horas a 28°C. Se analizó *in vivo* el patrón de expresión de GFP luego de 24 horas para permitir la acumulación de GFP en una lupa estereoscópica de fluorescencia. Como control negativo se expusieron embriones transgénicos durante los mismos períodos de tiempo a medio libre de sulfato de cobre.

2.2.9 Inmunocitoquímica en secciones.

Se expusieron larvas transgénicas de 80 hpf a cobre 300 μ M y luego de 3 días se prepararon para la inmunodetección de GFP en cortes histológicos.

2.2.10 Tinciones vitales de embriones *in vivo*.

Para la visualización de neuromastos funcionales se utilizó la tinción vital DiAsp 4-(4-diethylaminostyryl)-*N*-methylpyridinium iodide (4-di-2-Asp), Sigma D-3418) a una concentración 5 mM en medio E3. La tinción vital FM1-43 se utilizó a una concentración de 2 μ M diluida en medio E3. Las larvas se incubaron durante 5 minutos en DiAsp o FM1-43 y luego se lavaron sucesivamente con medio E3. Finalmente se observaron los neuromastos utilizando una lupa o microscopio de fluorescencia (Collazo y cols. 1994).

Para la detección células muertas se usó Naranja de Acridina (AO, acridinium chloride hemi-(zinc chloride), Sigma, Abrams y cols., 1993). Las larvas fueron incubados por 15

minutos en AO 5 µg/ml, lavados con medio E3 4 veces y anestesiados con tricaina para su observación.

2.2.11 Inmunocitoquímica en embriones completos (whole mount).

Las larvas se fijaron incubándolas en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS durante dos horas a temperatura ambiente o durante toda una noche (O/N) a 4 grados Celsius. Luego se lavaron con PBS dos veces por 5 minutos, se traspasaron a metanol y se mantuvieron a -20°C durante 1 hora. Se incubaron en agua destilada por 1 hora, para luego incubarse en acetona por 7 minutos, a -20°C. Posteriormente se lavaron nuevamente con agua destilada por 1 hora y se incubaron con solución de bloqueo por 1 hora. Luego se incubó con el anticuerpo primario correspondiente diluido en solución de bloqueo a 4°C durante toda la noche (diluciones: anti- α -tubulina acetilada 1/1000, anti-GFP 1/500, anti-PCNA 1/500). Al día siguiente se lavó con solución de bloqueo 4 veces por 20 minutos y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente (anti-raton o anti-conejo acoplados a peroxidasa o a fluoresceína según el caso). Luego se lavaron 4 veces por 20 minutos. Cuando se ocupó anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa para revelar la presencia de anticuerpo se preincubó con DAB 0.03% por 10 minutos y después se agregó peróxido de hidrógeno a una concentración final de 3% durante 15 minutos o durante el tiempo necesario para que se produzca la tinción producida por la reacción. La reacción fue finalizada lavando con PBST. Los embriones o larvas se transfirieron a glicerol para su visualización en lupa o montaje en portaobjetos, en caso de utilizar un microscopio.

2.2.12 Protección de las células ciliadas de los efectos del cobre mediante temperatura y obstrucción de canales iónicos.

Larvas de 80 hpf fueron incubadas en medio E3 con cobre 1µM durante 30 minutos a 4°C o a temperatura ambiente, luego fueron lavadas con E3 a 4°C, aclimatadas a temperatura ambiente y finalmente teñidas con DiAsp para analizar la presencia de células ciliadas.

Como una alternativa al tratamiento con frío se incubaron larvas en amilorida 1mM (Seiler and Nicolson, 1999) o CaCl_2 0.1M (Nishikawa and Sasaki, 1996)

en medio E3 durante 5 minutos, luego se adicionó cobre hasta una concentración de 1 μM , condición en la que se mantuvo a las larvas durante 30 minutos. Posteriormente las larvas fueron lavadas y teñidas con DiAsp para analizar al presencia de células ciliadas.

2.2.13 Relación entre la actividad de las células ciliadas y su sensibilidad al cobre.

Se incubaron larvas transgénicas ET4 (células ciliadas con GFP) de 48 hpf con FM1-43 y luego se trataron con 1 ó 10 μM de cobre. Las larvas incubadas con cobre 1 μM fueron analizadas a partir de los 20 minutos de incubación mediante "time lapse" a través de un microscopio de epifluorescencia. Se tomaron de manera automatizada fotografías de larvas anestesiadas en intervalos de 5 minutos hasta completar 40 minutos de exposición a cobre. Para los tratamientos con cobre 10 μM , las larvas se analizaron mediante el mismo procedimiento pero inmediatamente comenzada la incubación.

2.2.14 Análisis de proliferación celular mediante detección de la incorporación BrdU.

Se realizaron experimentos de pulso y caza incubando embriones o larvas en medio E3 con BrdU 10 mM y DMSO al 1.5% por diferentes tiempos luego de ser incubados con distintas concentraciones de cobre. Luego de las incubaciones con BrdU los peces fueron fijados con paraformaldehído 4% por una noche a 4°C. Posteriormente se realizó el mismo protocolo utilizado para inmunohistoquímica pero incluyendo, luego de la incubación con metanol a -20°C, una incubación con proteinasa K (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 20 minutos seguida de HCl 2N durante 1 hora.

2.2.15 Preparación de sonda de RNA para hibridación *in situ*.

La sonda de RNA se preparó a partir de cDNA del gen *sox2* que fue comprado a la empresa Open Biosystems (Huntsville, AL). El clon con este gen posee el número de acceso a Genbank BC065656. El plasmidio fue digerido con la enzima KpnI y luego se

realizó una extracción fenólica para eliminar las proteínas contaminantes. A continuación se procedió a la transcripción *in vitro* de la sonda de RNA marcada con digoxigenina a partir de aproximadamente 1.5 µg de DNA linearizado, 10 µL de NTP mix-digoxigenina, 5µL de tampón de transcripción 10x, 1 µL de RNAsin y 90 unidades de la RNA polimerasa T7. Esta mezcla se incubó durante dos horas a 37°C. Luego se agregaron 5 µL de DNAsa I 10 mg/mL durante 5 minutos y se incubó a 37°C para degradar el resto de DNA que quedó sin transcribir. Se detuvo la reacción agregando 5µl de EDTA 0,2M y se precipitó el RNA con 2 µL de LiCl 10 M y 200 µL de etanol absoluto durante toda la noche. A continuación se recuperó el RNA centrifugando a 14000 g durante 30 minutos, se eliminó el sobrenadante, se lavó el precipitado con etanol al 70% y se dejó secar a temperatura ambiente. La sonda recién sintetizada se analizó en un gel de agarosa al 1% para verificar la presencia del RNA. El precipitado de RNA se resuspendió en 1 mL de tampón de hibridación *in situ*.

2.2.16 Hibridación *in situ*.

Se fijaron embriones de 72 hpf en PFA al 4% (en PBS) a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, los embriones se deshidrataron en metanol 100% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizó un cambio de metanol 100% y se incubaron a -20°C durante al menos 1 hora (los embriones se pueden almacenar en esta etapa a -20°C hasta 6 meses). Luego se rehidrataron durante 5 minutos en 75% metanol/25% PBS, 5 minutos en 50% metanol/50% PBS, 5 minutos en 25% metanol/75% PBS y 4 veces durante 5 minutos en PBS-T. Con el objetivo de eliminar los pigmentos se realizó el blanqueo de los embriones de más de 48 hpf con una solución que contiene 5,95 ml de agua destilada, 0,25 ml de SSC 20x, 0,5 ml de formamida y 3,3 ml de peróxido de hidrógeno al 30%. Los embriones se incubaron en esta solución 10 minutos expuestos a un tubo fluorescente de luz, la cual permite una reacción de oxidación de los pigmentos

por parte de el peróxido de hidrógeno. Luego se realizaron tres lavados con PBS-T durante 5 minutos cada uno.

Para permeabilizar y digerir las proteínas asociadas al mRNA, los embriones se trataron durante 10 minutos a temperatura ambiente con 25 µg/mL de proteinasa K en PBS. Para los embriones de 72 hpf se incubo con proteinasa K durante 40 minutos. Después se realizaron 2 lavados de 5 minutos con PBS-T para detener la digestión. Para volver a fijar los tejidos, los embriones se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente en PFA al 4% en PBS y luego se lavaron 5 veces durante 5 minutos cada una en PBS-T. A continuación los embriones se incubaron con tampón de hibridación a 65°C durante 10 minutos y luego de hacer un recambio de la solución, se incubó toda la noche. La ribosonda-DIG fue previamente denaturada durante 5 minutos a 60°C para luego incubar los embriones toda la noche a 60°C.

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

apareciera la tonalidad púrpura esperada en la zona de expresión del mRNA. Finalmente, se lavo los embriones 3 veces durante 5 minutos en PBS-T.

2.2.17 Estadística, gráficos e imágenes.

Para realizar los análisis estadísticos correspondientes se utilizó el software SigmaStat 3.1 y Microsoft Excel 2000. Para graficar se utilizó SigmaPLot 9.0 y Microsoft Excel 2000. El tratamiento de imágenes se realizó en Photoshop 7.0.

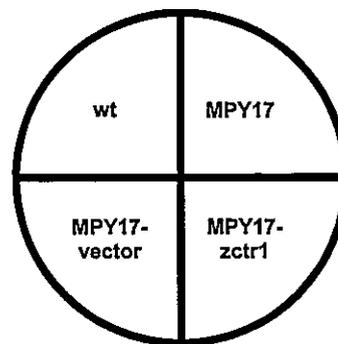
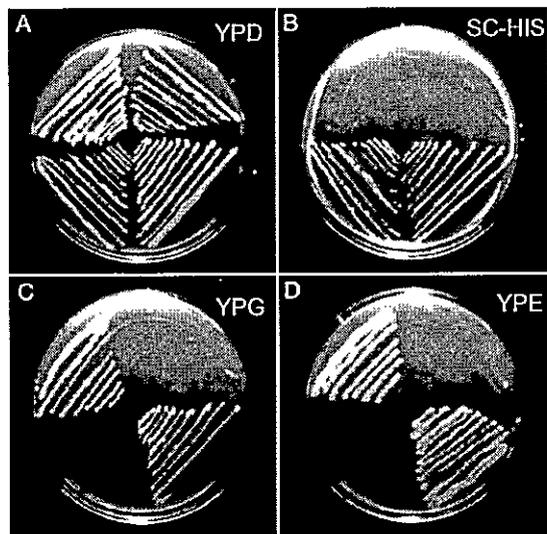


Figura 1. La expresión heteróloga de *zctr1* complementa la deficiencia respiratoria de la cepa MPY17, la cual no posee transportadores de cobre de alta afinidad. A) medio enriquecido. La cepa MPY17 (*ctr1* Δ - *ctr3* Δ) puede crecer sobre una fuente de carbono fermentable como la dextrosa. B), medio mínimo de selección de cepas transformadas con el plasmidio. C) y D), la cepa MPY17 no puede crecer sobre fuentes de carbono no fermentables como etanol y glicerol producto de las deficiencias en la cadena respiratoria mitocondrial. Las placas fueron fotografiadas luego de 5 días de crecimiento a 30 °C.

3.1.2 Incorporación de cobre radioactivo en levaduras.

Para complementar los datos obtenidos en el ensayo anterior, se midió la capacidad de incorporar cobre radioactivo en las levaduras mutantes y en las mutantes transformadas con el gen *zctr1*. En la Figura 2 se puede observar que la cepa mutante transformada con el gen *zctr1* incrementa significativamente la incorporación de cobre radioactivo en comparación a la cepa sin transformar y a la cepa mutante transformada solamente con el vector ($p < 0.01$). La cantidad de cobre incorporado por la cepa mutante transformada con el vector vacío fue similar a la incorporada por la cepa sin transformar ($p > 0.01$) (ver leyenda de la Figura 2 para más detalles). En suma, los datos de complementación de levaduras mutantes y la medición de incorporación de cobre radioactivo demuestran que el gen *zctr1* es un transportador funcional de cobre.

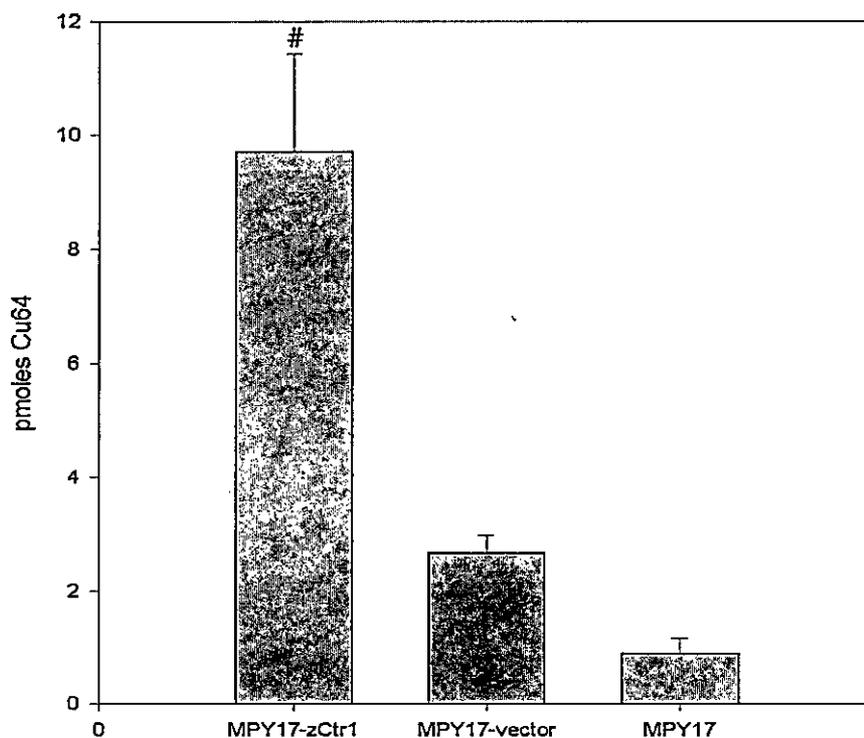


Figura 2. La expresión de *zctr1* en la levaduras MPY17 estimula el incorporación de ^{64}Cu . Las cepas MPY17 (*ctr1* Δ - *ctr3* Δ), MPY17-vector y MPY17 que expresa *zctr1* fueron utilizadas para medir la incorporación de cobre radioactivo. Se agregó 10 μM de ^{64}Cu y las cepas fueron expuestas a este isótopo durante 10 minutos a 4°C y 30°C. Las cuentas obtenidas a 4°C fueron restadas de las obtenidas a 30°C para así eliminar la unión inespecífica. (# $p < 0.01$)

3.2 Letalidad de larvas inducida por cobre.

El cobre puede ser un metal severamente tóxico para los peces cuando está presente en el agua (Scudder y cols., 1988; Jezierska y cols., 1997). Sin embargo, se han realizado pocos estudios que analicen el efecto de este metal en el desarrollo y crecimiento de embriones y larvas. Con el fin de conocer el rango de concentraciones de cobre que provoca la letalidad de larvas de pez cebra, se incubaron estos peces desde las 72 hpf en cantidades crecientes de cobre. Durante el tratamiento se contó el número de larvas muertas (ausencia de latidos del corazón) a distintos tiempos hasta completar 4 días de incubación. Los resultados se muestran como porcentaje de larvas muertas acumulativamente en cuanto a la cantidad de larvas al inicio de la incubación.

Las larvas control (sin cobre adicionado al medio) mostraron una total ausencia de mortalidad hasta las 66 horas de incubación (larvas de 138 hpf). Posteriormente la mortalidad aumentó lentamente en función del tiempo (Figura 3), por ejemplo, 71 horas después de comenzar el tratamiento (6 dpf de edad) la mortalidad llegó a un 10% y a las 96 horas (7 dpf de edad) alcanzó un 23,3%. Al adicionar cobre al medio ocurrió un incremento en la mortalidad de manera proporcional a la concentración de metal usada. A las más altas concentraciones utilizadas (250 y 500 μM), las larvas comenzaron a morir a las pocas horas de comenzada la incubación, muriendo el 100% de ellas al cabo de 20 horas (Figura 3). En contraste, al utilizar CuSO_4 50 y 25 μM este porcentaje de mortalidad se alcanzó luego de 42 y 90 horas respectivamente de exposición. Al utilizar concentraciones menores la letalidad provocada por el cobre disminuyó notoriamente.

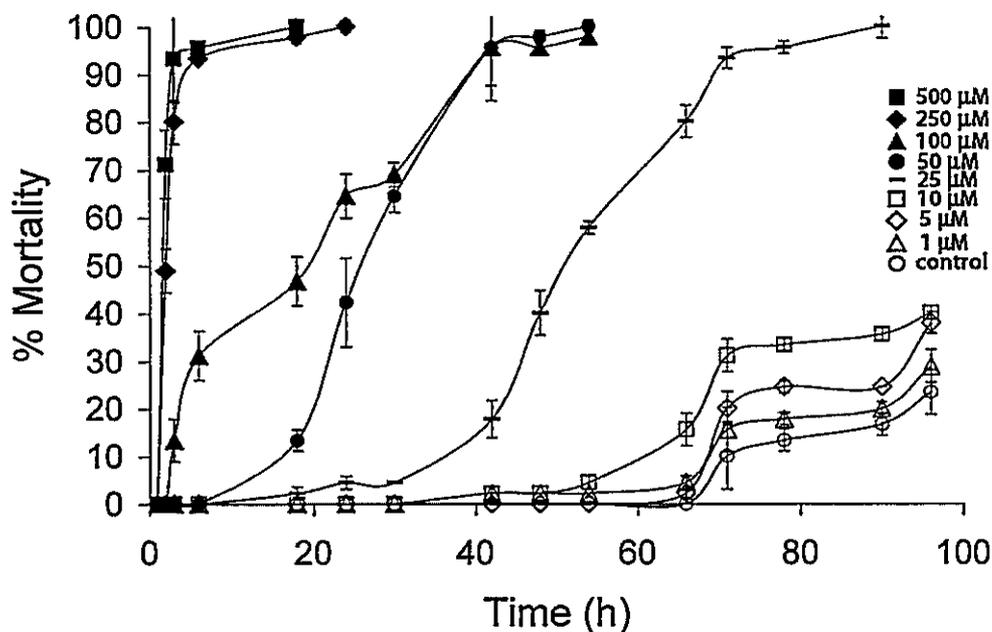


Figura 3. Letalidad de larvas expuestas a cobre. Peces de 72 hpf fueron expuestos a distintas concentraciones de CuSO_4 . El número de larvas muertas fueron contadas y removidas a distintos tiempos durante la incubación.

Con los datos de mortalidad obtenidos se calcularon, a través de un software, los valores de LC_{50} para distintos tiempos de exposición a este metal (Figura 4). LC_{50} es una concentración teórica a la cual se espera que muera la mitad de los individuos expuestos a un agente tóxico durante un tiempo determinado. Este valor es calculado a partir de los datos de letalidad con distintas concentraciones de este compuesto. La curva que muestra la Figura 4 tiene la típica forma de decaimiento logarítmico que se obtiene al calcular el valor de LC_{50} para distintos tiempos en este tipo de ensayos, sea con datos provenientes de curvas de letalidad o con modelos matemáticos predictivos. Como se verá más adelante, esta curva es de gran utilidad para establecer las concentraciones y tiempos adecuados para realizar estudios de un agente potencialmente tóxico.

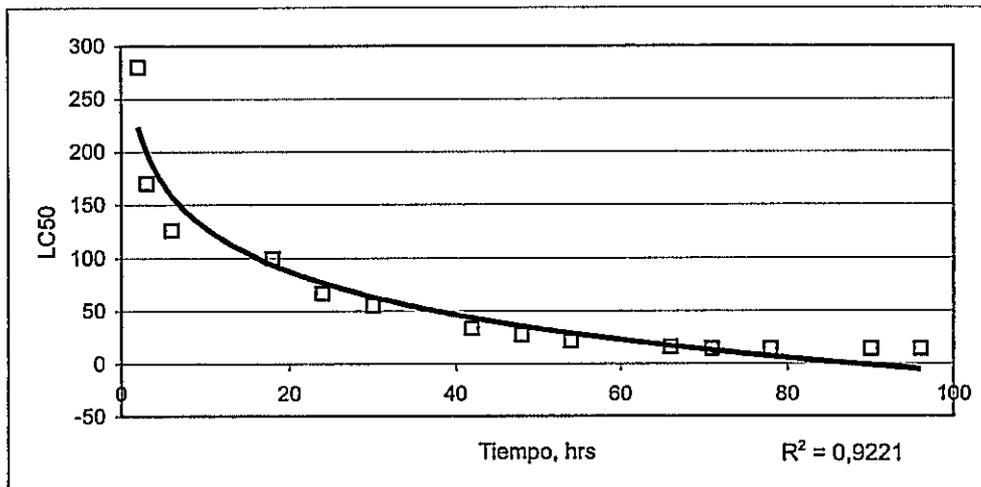


Figura 4. Valores de LC50 para distintos tiempos de exposición a cobre. Los valores LC50 fueron calculados a partir de los datos de letalidad aguda utilizando el método Trimmed Spearman-Kärber.

3.3 En larvas de pez cebra expuestas a cobre se induce la expresión de la proteína de estrés térmico HSP70.

Las células responden al estrés metabólico induciendo la expresión de variados genes, incluyendo los de respuesta a estrés térmico (Heat Shock Proteins, HSPs). Se utilizó una línea transgénica de pez cebra que posee el promotor del gen *hsp70* fusionado a la proteína fluorescente verde (GFP, Halloran MC y cols., 2000; Blechinger y cols., 2002a) para investigar si el cobre presente en el medio externo es capaz de inducir la expresión de este gen reportero. El patrón de expresión de GFP en esta línea transgénica durante el desarrollo normal, bajo condiciones de estrés térmico (Halloran MC y cols., 2000; Blechinger y cols., 2002a), o luego de una exposición a cadmio (Blechinger y cols., 2002b) es equivalente al de la proteína HSP70 endógena bajo estas mismas condiciones, lo que la convierte en una herramienta muy útil para el análisis de expresión de este gen *in vivo*.

Para estudiar en estos peces la expresión de GFP inducida por cobre, se expusieron larvas transgénicas a pulsos de medio con este metal a distintas concentraciones y luego observamos el patrón de expresión de GFP. Larvas transgénicas de 80 hpf fueron

expuestas a sulfato de cobre 100, 200 ó 400 μM durante 2 horas (concentraciones cercanas al LC50 para 2 horas (280,16 μM)) y se observaron después de 24 horas para permitir la acumulación de GFP (Figura 5). Las larvas control mostraron una expresión permanente en los lentes oculares, lo cual es característico de esta línea transgénica (Figura 5A; Halloran y cols., 2000). La exposición transitoria a CuSO_4 100 μM , indujo una moderada expresión en las branquias y el cerebro (Figura 5B); esta expresión incrementó al usar 200 μM y se observó además la aparición de fluorescencia en el epitelio olfatorio y la médula espinal (Figura 5C). Tratamientos con CuSO_4 400 μM indujeron una mayor expresión en los tejidos ya mencionados, además de expresión en algunas zonas de la superficie de la larva (Figura 5D).

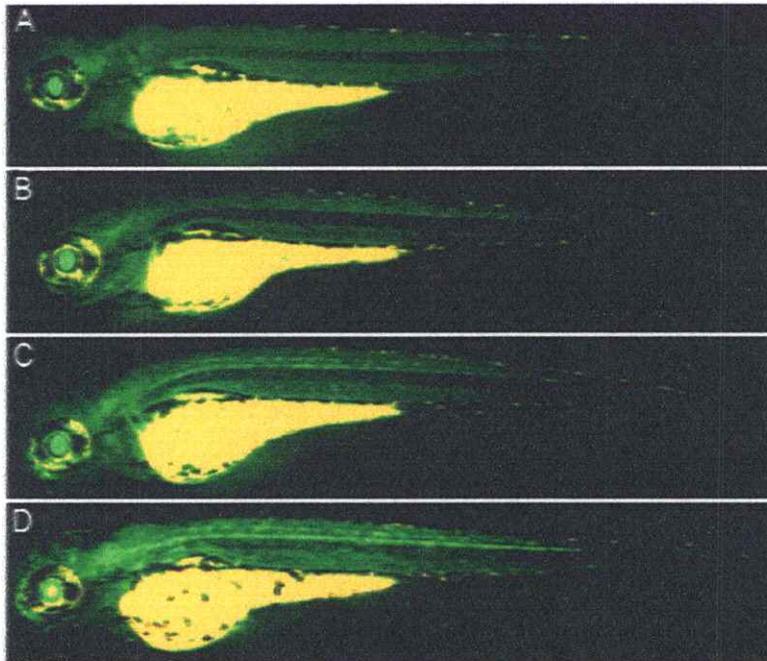


Figura 5. Efecto de la exposición aguda a distintas concentraciones de cobre en larvas transgénicas *hsp70:gfp*. Se expuso larvas *hsp70:gfp* de 80hpf a diferentes concentraciones de cobre durante dos horas y se analizaron 24 horas luego de terminada la incubación. A), control sin cobre adicionado al medio, B) 100 μM , C) 200 μM , y D) 400 μM .

Con el fin de analizar la expresión de GFP con mayor detalle, se realizaron inmunodetecciones de la proteína reportera en cortes histológicos de larvas transgénicas expuestas previamente a cobre. Se incubaron larvas de 80 hpf a cobre 300 μ M durante 2 horas y se prepararon para la inmunodetección de GFP luego de permanecer 3 días en medio sin cobre adicionado, ya que se observó un aumento de la cantidad de tejidos que expresan GFP en comparación a 1 y 2 días luego de terminar la incubación, como por ejemplo en el hígado (Figura 6A y B). Las secciones embebidas en parafina mostraron la característica expresión de GFP en la retina (r), sin embargo también se observó expresión específica en el telencéfalo (tl) (Figura 6C). Además, los cortes a nivel de la médula espinal mostraron inducción de la expresión de GFP en la parte ventral de la médula espinal (sc), glomérulo pronéfrico (pg), ducto pronéfrico (pd), ducto neumático (pnd), estómago (s), hígado (L) e intestino (i) (Figura 6D y E).

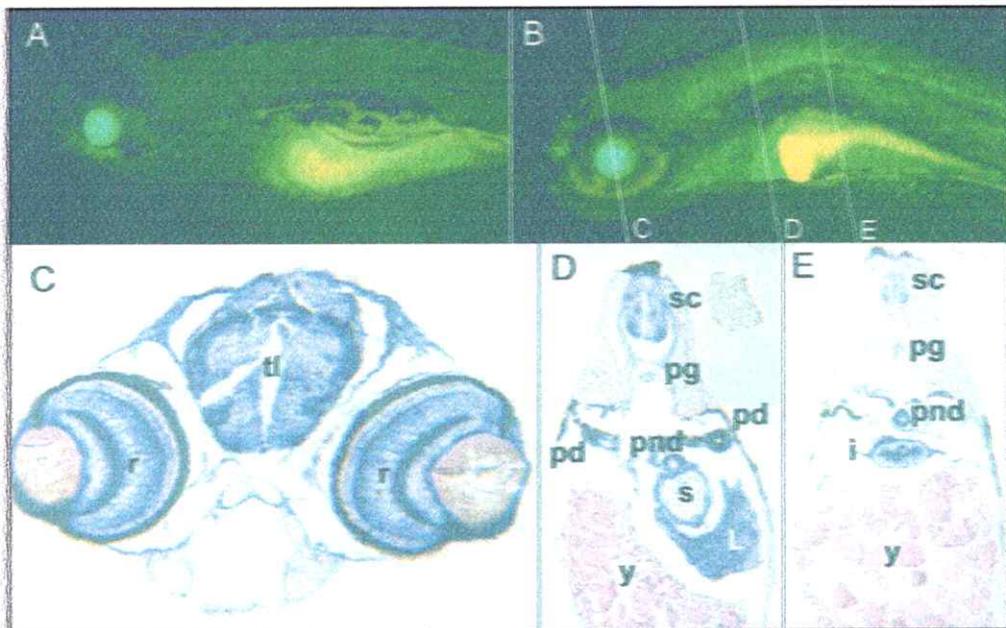


Figura 6. Larvas transgénicas *hsp70:gfp* de 6 dpf expuestas a cobre por dos horas a los 3 dpf. A), control. B), larva expuesta a cobre 300 μ M. C), D) y E), inmunohistoquímica anti-GFP en cortes histológicos. C), la cabeza presenta la proteína GFP en la retina (r) y telencéfalo (tl). D) y E), las secciones muestran la presencia de GFP en la espina dorsal (sc), glomérulo pronéfrico (pg), ducto pronéfrico (pd), ducto neumático (pnd), estómago (s), hígado (L) e intestino (i).

3.4 El cobre presente en el agua daña los neuromastos de la línea lateral del pez cebra.

3.4.1 El daño provocado por el cobre sobre las superficie de las larvas es dependiente de la concentración y su ubicación coincide con la de los neuromastos.

Durante los estudios de toxicidad del cobre en el desarrollo del pez cebra, se observó que las larvas (2 a 5 días postfertilización) no presentan ningún efecto adverso observable al ser expuestas a CuSO_4 a concentraciones de hasta $50 \mu\text{M}$ por dos horas. El valor calculado de LC_{50} para dos horas de exposición a cobre de larvas de tres días fue de $280,16 \mu\text{M}$. A pesar de no haber encontrado alguna anomalía morfológica evidente luego de esta exposición transitoria a cobre, un examen cuidadoso de las larvas incubadas con $50 \mu\text{M}$ de este metal, reveló la presencia de un moderado y localizado daño en el tejido superficial en forma de protuberancias regularmente espaciadas en los costados del cuerpo de las larvas, las cuales no se observaron en las larvas control (Figura 7A y B). Este efecto producido por el cobre mostró ser dependiente de la concentración, ya que con mayores concentraciones se observaron protuberancias más pronunciadas (e.g., $100 \mu\text{M}$ Figura 7C). La localización de estas estructuras (tipo debris celular) coincide con la ubicación de los neuromastos de la línea lateral en una larva de esta edad (comparar con Figura 7D).

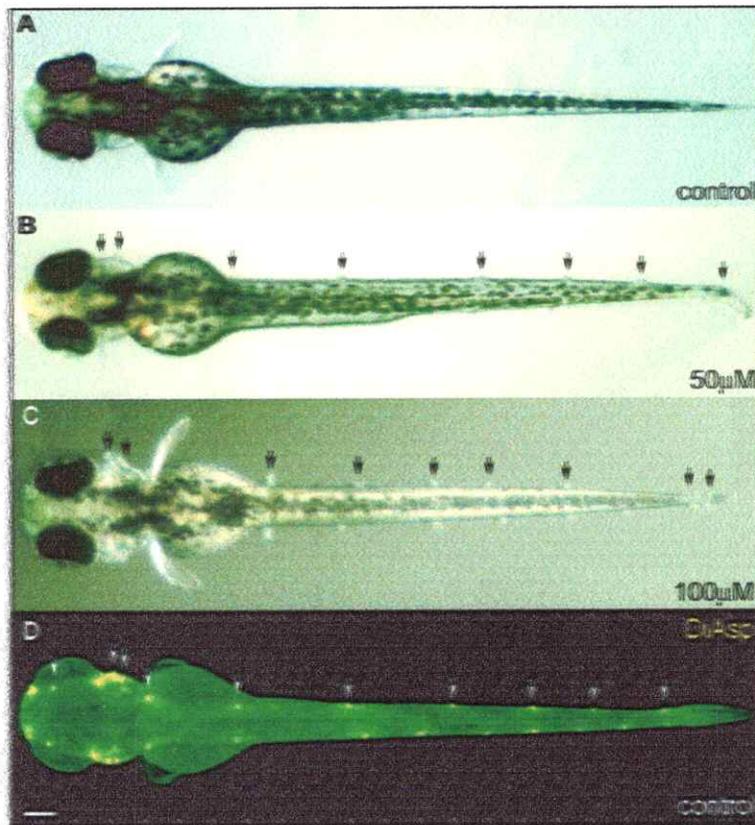


Figura 7. El cobre presente en el agua daña los neuromastos de la línea lateral. Vistas dorsales de larvas de 78 hpf. A), control sin cobre agregado al medio. B), larva incubada por dos horas con CuSO_4 50 μM . C), larva incubada por dos horas con CuSO_4 100 μM . Las flechas indican neuromastos dañados. D), las flechas muestran la distribución de los neuromastos en una larva control teñida con DiAsp. La barra en D = 35 μm .

3.4.2 Pérdida de funcionalidad y muerte celular luego de tratamientos con cobre.

Para definir más precisamente el efecto del cobre sobre los neuromastos, se examinó la funcionalidad de las células ciliadas utilizando las tinciones vitales DiAsp y FM1-43, luego de diferentes tratamientos con cobre, dando ambos compuestos resultados idénticos. Existen claras evidencias de que el compuesto FM1-43 ingresa sólo a las células ciliadas funcionales a través de los canales de mecanotransducción, por lo que es utilizado como un marcador *in vivo* de la actividad de estas células (Corey y cols., 2004). En condiciones normales la tinción vital DiAsp marca los neuromastos fluorescentemente (Figura 8A, flechas), sin embargo la exposición de larvas a CuSO_4 disuelto en el agua a partir de una concentración de 1 μM durante dos horas mostró ser suficiente para prevenir

la tinción con este marcador (Figura 8B). Larvas tratadas con cobre 50 μM fueron marcadas ocasional e inespecíficamente con DiAsp lo cual coincide con el daño estructural evidente en el tejido después de este tratamiento (Figura 8C). Cuando las larvas fueron expuestas por dos horas a CuSO_4 0.5 μM no se observó ningún efecto negativo en el marcaje con DiAsp o FM1-43 (datos no mostrados).

Para determinar si ocurre muerte celular en los neuromastos debido a los tratamientos con cobre, se realizaron incubaciones con Naranja de Acridina, el cual permite la visualización de células muertas en peces vivos (Williams y Holder, 2000). Las larvas control presentaron una baja cantidad de células marcadas en unos pocos neuromastos (Figura 8D), debido al recambio constante de células que ocurre en estos órganos (Williams y Holder, 2000). No se observaron diferencias entre larvas tratadas con CuSO_4 1 μM y larvas control, sin embargo se observó un evidente incremento de la marca en larvas tratadas con CuSO_4 50 μM . Para determinar si el efecto descrito es mas severo con tiempos de incubación mas largos, se expuso larvas de 3 días a cobre 1 μM durante 5 días. No se detectó tinción con DiAsp ni tampoco un aumento en la marca con Naranja de Acridina durante este periodo, indicando que con esta concentración, exposiciones prolongadas no provocan un incremento de la muerte celular ni ocurre la reaparición de células ciliadas funcionales (datos no mostrados).

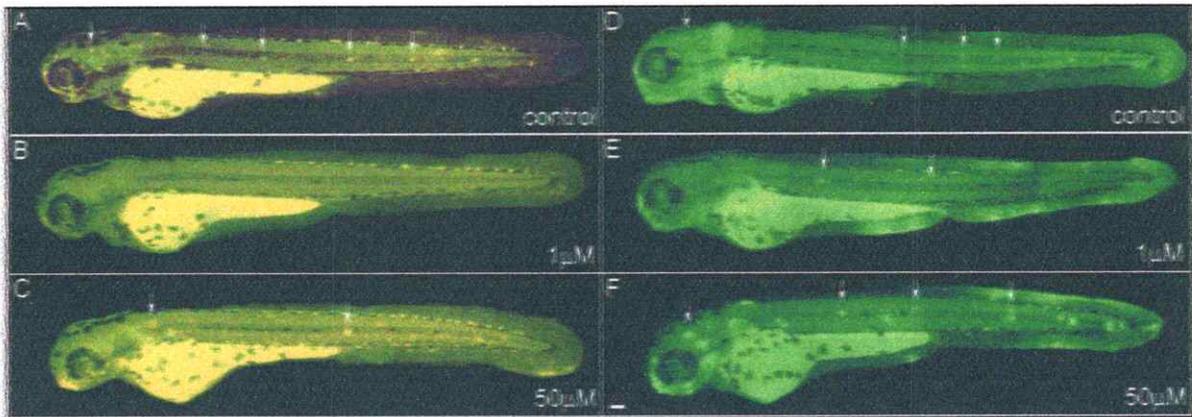


Figura 8. Funcionalidad y muerte celular en los neuromastos luego de tratamientos con cobre. Vistas laterales de larvas de 78 hpf después de exponerlas a cobre durante dos horas. A), B) y C), larvas teñidas con DiAsp. A), control sin cobre adicionado al medio. Las flechas muestran neuromastos funcionales. B), la incubación con CuSO_4 $1 \mu\text{M}$ provoca que las células ciliadas no se marquen. C), con $50 \mu\text{M}$ tampoco se observa tinción en los neuromastos, sin embargo la presencia ocasional de marca inespecífica sugiere un daño estructural (flechas). D), E) y F) larvas teñidas con Naranja de Acridina (AO). D) larva control. Algunos neuromastos presentan tinción moderada. E), larvas tratadas con CuSO_4 $1 \mu\text{M}$. No se observan diferencias con los controles. F), larvas tratadas con CuSO_4 $50 \mu\text{M}$. Las flechas señalan la fuerte marca de AO en los neuromastos, indicando la presencia de células muertas. La barra en F = $35 \mu\text{m}$.

3.4.3 Microscopía de campo claro y cuantificación de la muerte celular en neuromastos de larvas tratadas con cobre.

Para examinar más detalladamente el efecto del cobre en los neuromastos, se observaron estos órganos bajo un microscopio de contraste de fase en larvas control y luego de incubaciones con cobre 1 ó $50 \mu\text{M}$ (Figura 9A-I). Los neuromastos fueron observados sin teñir o teñidos con DiAsp o Naranja de Acridina. En las larvas control, los neuromastos mostraron el típico patrón de roseta, en el cual las células están organizadas de manera concéntrica (Figura 9A), las células centrales incorporaron DiAsp (Figura 9B), y, en la mayoría de los casos, no se observó tinción con Naranja de Acridina (Figura 9C). Los neuromastos de peces tratados con cobre $1 \mu\text{M}$ no mostraron diferencias morfológicas, ni un incremento en la muerte celular comparado con los controles (Figura 9D y F), sin embargo, como fue descrito anteriormente, no fueron capaces de incorporar DiAsp (Figura 9E). Después de una exposición a cobre $50 \mu\text{M}$ los neuromastos mostraron una

gran desorganización estructural (Figura 9G), no se tiñeron de manera específica con DiAsp (Figura 9H), y los núcleos de las células remanentes fueron marcadas intensamente con Naranja de Acridina (Figura 9I). Con el propósito de cuantificar la muerte celular en los neuromastos provocada por los tratamientos con cobre, se contó el número de células marcadas con Naranja de Acridina en dos neuromastos específicos, el "O" de la línea lateral anterior (ALL) y el "P1" de la línea lateral posterior (PLL). Para conocer cuantas células ciliadas tiene cada uno de estos neuromastos en el estadio que se realizaron los tratamientos con cobre (76hpf), se llevaron a cabo tinciones con DiAsp y luego se cuantificó el número de células marcadas. El neuromasto O mostró tener, en promedio, 7.0 ± 2.21 células ciliadas, mientras que en el neuromasto P1 se contaron 6.6 ± 1.73 células ciliadas en este estadio, valores que no poseen diferencias significativas ($p > 0.05$). En cuanto a la muerte celular, se encontró un incremento significativo ($P < 0.05$) en la marca de Naranja de Acridina a partir de $10 \mu\text{M}$ de cobre (Figura 9J) y no se encontraron diferencias para cada concentración entre estos neuromastos ($P > 0.05$). Estos resultados indican que la viabilidad de las células ciliadas se pierde progresivamente al exponer larvas a concentraciones mayores que $1 \mu\text{M}$ y que la muerte celular es inducida significativamente al incrementar la concentración de cobre del medio.

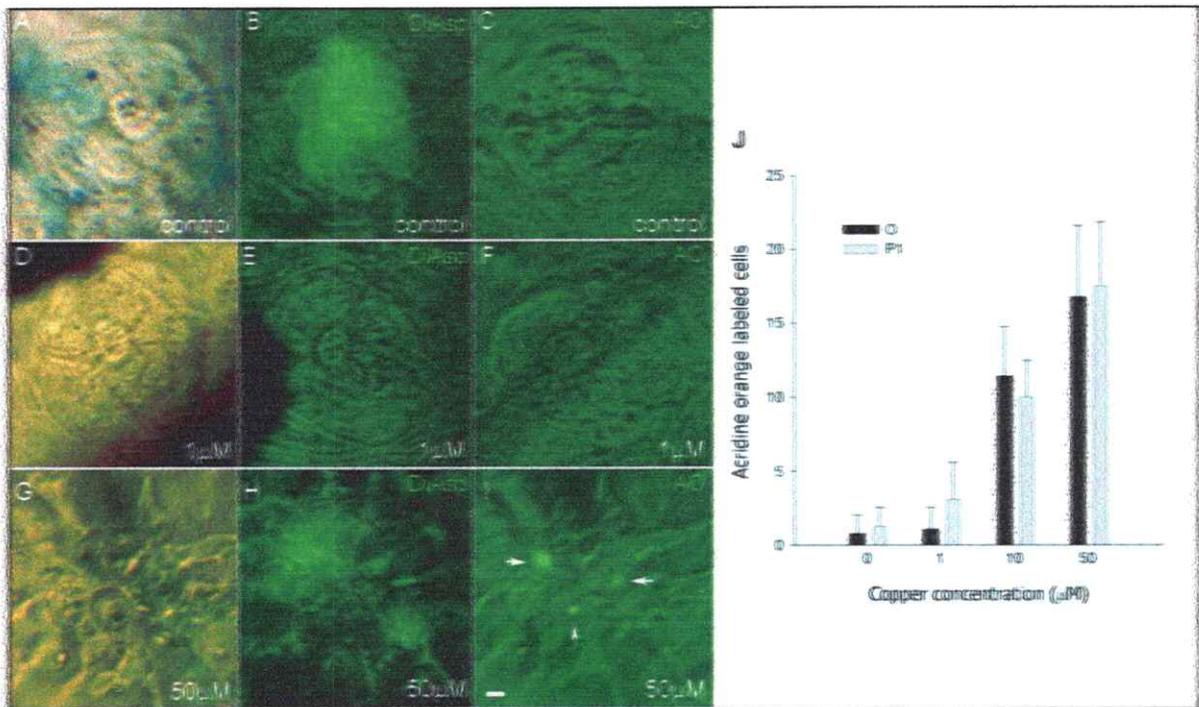


Figura 9. Microscopía de campo claro y cuantificación de la muerte celular en neuromastos de larvas tratadas con cobre. A), D) y G), imagen sin fluorescencia. B), E) y H), tinción DiAsp. C), F) e I), tinción con Naranja de Acridina. A), B) y C), control sin cobre. Estructura de roseta típica del neuromasto (A), tinción DiAsp positiva (B) y negativa para Naranja de Acridina (C). D), E) y F), cobre 1 μ M. Estructura normal del neuromasto (D), marca negativa para DiAsp (E) y Naranja de Acridina (F). G), H) e I), cobre 50 μ M. Se observa gran daño en los neuromastos (G), lo cual es confirmado por la marca inespecífica de DiAsp, asociada al debris celular (H) y la tinción específica de los núcleos con Naranja de Acridina (flechas en I). La barra en I = 3 μ m. J) Cuantificación de células marcadas con Naranja de Acridina en los neuromastos O y P1 luego de los tratamientos con cobre.

3.4.4 Análisis de marcadores de neuromastos en larvas expuestas a cobre a través de microscopía convencional y confocal.

Ya que en las larvas tratadas con cobre las células ciliadas de los neuromastos no incorporaron DiAsp ni FM1-43, se estudió la posible pérdida de estas células producto de estos tratamientos. Se realizó inmunodetección usando un anticuerpo contra tubulina acetilada, proteína que se encuentra presente en las células ciliadas del neuromasto especialmente en los kinocilios de estas células (Figura 10, flecha negra en A y flecha blanca en D). Se trataron larvas de 76 hpf con cobre durante dos horas y luego fueron preparadas para realizar inmunohistoquímica usando anticuerpos secundarios

fluorescentes o acoplados a peroxidasa. En el primer caso, para contrastar la inmunodetección, se marcaron los núcleos con ioduro de propidio (PI) y se realizaron reconstrucciones tridimensionales usando microscopia confocal. Las larvas control mostraron la estructura normal del neuromasto con las células ciliadas al centro con sus respectivos kinocilios agrupados entre si (Figura 10A y D). La tinción de los núcleo con PI, mostró claramente la típica disposición de las células en forma de roseta (Figura 10D). Las células de los neuromastos de las larvas tratadas con CuSO_4 1 μM no mostraron presencia de tubulina acetilada, sin embargo se encontró una tinción remanente alrededor de donde las células ciliadas deberían encontrarse (Figura 10B y E). El nervio de la línea lateral posterior, que también es marcado con este anticuerpo, no se vio afectado, al igual que el patrón de roseta de las células del neuromasto (Figura 10E). Los neuromastos tratados con cobre 50 μM mostraron una completa ausencia de tubulina acetilada y el patrón de roseta de las células mostró estar completamente desorganizado. El nervio de la línea lateral no mostró alteraciones (Figura 10C y F).

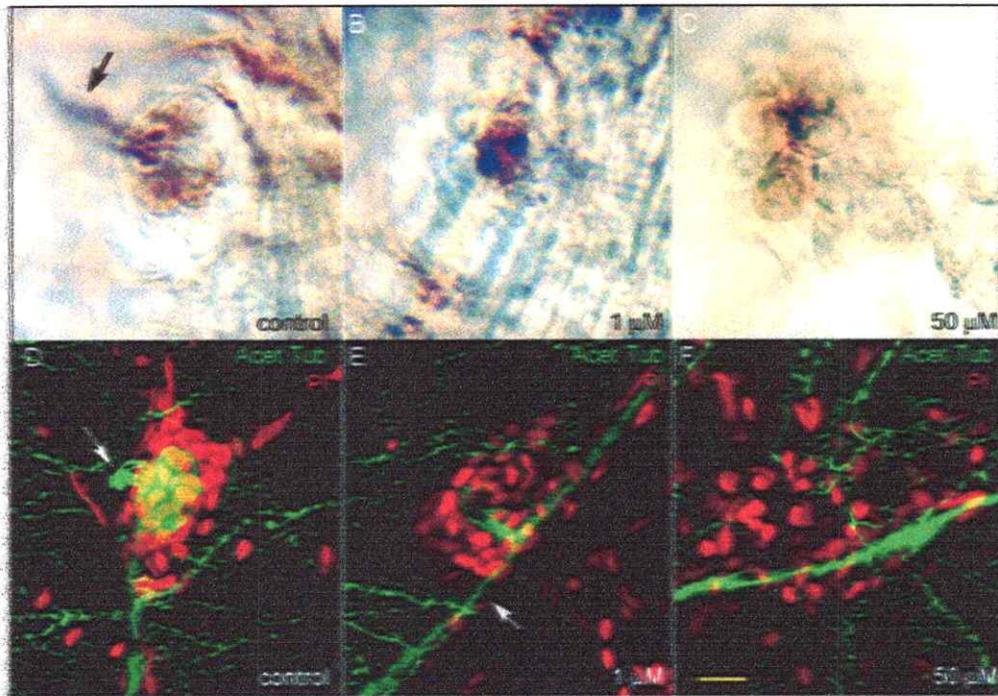


Figura 10. Inmunodetección de tubulina acetilada en larvas expuestas a cobre. A)-C), inmunohistoquímica contra tubulina acetilada (Acet Tub) detectado con un anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa. D)-F) igual que en A)-C) pero se utilizó un anticuerpo secundario unido a fluoresceína el cual se detectó a través de microscopía confocal. Los núcleos fueron teñidos con Ioduro de Propidio (PI). A) y D), control sin cobre adicionado al medio; las flechas señalan el kinocilio. B) y E), cobre 1 μM ; la flecha en E indica el nervio de la línea lateral, el cual no es afectado por el cobre, sin embargo no se observan células ciliadas. C) y F), cobre 50 μM . Se observa, además de la ausencia de células ciliadas, la pérdida del patrón de roseta y una gran dispersión de los núcleos. La barra amarilla en F representa 10 μm para D), E) y F), y 12,5 μm para A), B) y C).

3.4.5 En el neuromasto los tipos celulares dañados varían según la concentración de cobre usada.

Para complementar los resultados obtenidos se utilizaron líneas transgénicas de pez cebra que expresan la proteína fluorescente verde (GFP) en distintos tipos celulares del neuromasto. Estos peces transgénicos fueron elaborados a través de la técnica de "enhancer trapping" (Parinov y cols, 2004), por lo que hasta la fecha no se conocen los genes que dirigen la expresión de GFP. La línea transgénica ET4 posee GFP en las células ciliadas (tanto del oído como de la línea lateral) y la línea ET20 contiene GFP en las células interneuromásticas, ubicadas superficialmente entre los neuromastos y en las

células del manto, las cuales se encuentran por encima de las células ciliadas dejando espacio para que los cilios se proyecten hacia el medio externo. La Figura 11 muestra un esquema y fotografías que señalan los tipos celulares del neuromasto. Las células del manto tienen una forma similar a un volcán como se aprecia en el costado superior izquierdo (en verde) y se ubican en la parte más externa y periférica del neuromasto albergando a las células ciliadas (células azules en el esquema). Las células ciliadas se ubican en la parte central del neuromasto (células verde en el esquema) y están rodeadas por las células accesorias (manto y soporte). En larvas ET4 de 76 hpf todas las células que expresan GFP poseen tubulina acetilada (los puntos amarillos de la fotografía en el costado derecho superior muestra la base de los kinocilios), lo que indica que las células fluorescentes son efectivamente células ciliadas diferenciadas.

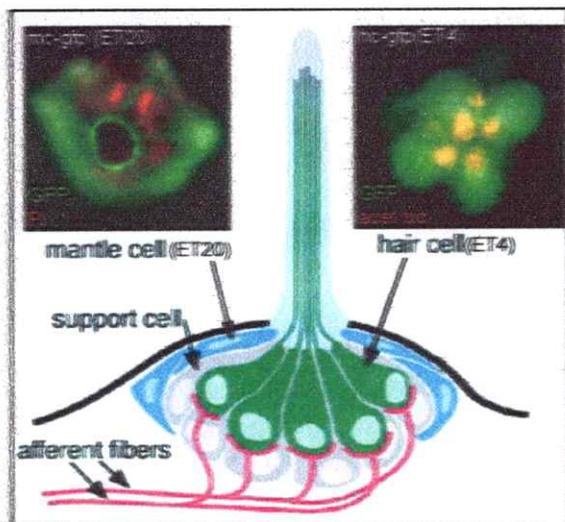


Figura 11. Tipos celulares del neuromasto. Al centro, esquema de un neuromasto señalando sus distintos tipos celulares: células ciliadas (hair cells, en verde), células del manto (mantle cells, en azul) y células de soporte (support cells, en gris). Esquina superior izquierda, la línea transgénica ET20 expresa GFP en las células del manto. En verde GFP y en rojo Ioduro de Propidio (PI). Esquina superior derecha, la línea transgénica ET4 posee GFP en las células ciliadas. En verde GFP y en rojo tubulina acetilada.

Al exponer larvas de ambas líneas transgénicas a las concentraciones de cobre estudiadas anteriormente, se observó la desaparición de células fluorescentes en los neuromastos de ambas líneas, pero a distintas concentraciones. Las larvas ET4 sin tratar con cobre mostraron células ciliadas fluorescentes en todos los neuromastos (Figura 12A, en el recuadro se muestra un acercamiento de un neuromasto donde se aprecian estas células). Sin embargo, al incubar larvas ET4 de 76 hpf con cobre 1 μ M durante dos horas, se produjo la pérdida de las células ciliadas fluorescentes en todos los neuromastos (Figura 12B). Como era de esperarse, tampoco se observó presencia de células ciliadas en los neuromastos de larvas ET4 expuestas a cobre 10 μ M (no mostrado) ó 50 μ M (Figura 12C). Las larvas ET20 expuestas a cobre 1 μ M no mostraron ninguna diferencia con el control (Figura 12D y E): ni las células del manto (Figura 12D y E, recuadro) ni las interneuromásticas (Figura 12D flecha blanca en el recuadro) se mostraron afectadas al tratar con esta concentración. Sin embargo al exponerlas a cobre 50 μ M durante dos horas se observó una absoluta ausencia de células fluorescentes en los neuromastos, lo que indicó la pérdida de las células del manto al realizar este tratamiento (Figura 12F y recuadro inferior en F). Las células interneuromásticas (flecha blanca en Figura 12F y recuadro inferior) no se vieron afectadas por ninguno de los tratamientos con cobre. Además se vio que con una concentración intermedia de cobre (10 μ M), se pierde una gran cantidad de células del manto, quedando en el neuromasto un remanente desorganizado de estas células. En el oído, las células que expresan GFP en ambas líneas transgénicas (flecha roja en la Figura 12C y F) no se vieron afectadas por ninguno de los tratamientos descritos. Estos datos juntos con los descritos en la Figura 9 permiten concluir que, en el neuromasto, las células accesorias son más resistentes que las células sensoriales al daño producido por el cobre ya que para eliminar a las primeras se requiere un incremento de la muerte celular, lo cual es inducido con aumentando concentración de este metal en el medio.

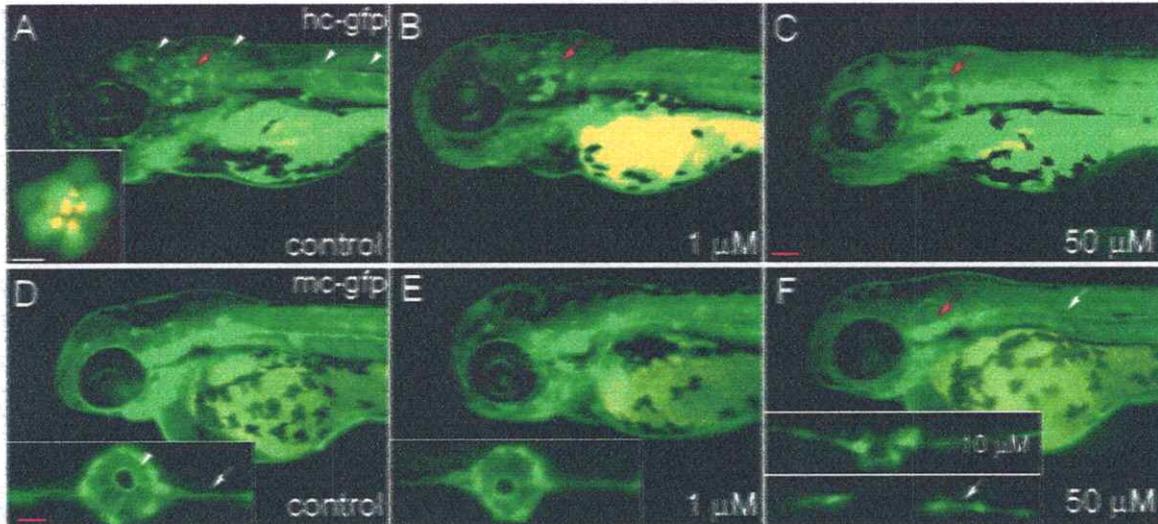


Figura 12. Efecto del cobre en los distintos tipos celulares del neuromasto. Vista lateral de larvas de 78 hpf luego de dos horas de exposición a cobre. A), B) y C), larvas transgénicas ET4 expresando GFP en las células ciliadas. D), E) y F), larvas transgénicas ET20 expresando GFP en las células del manto. A) y D), control sin cobre adicionado al medio. B) y E), cobre 1 μM . C) y F), cobre 50 μM . Barra en C = 35 μm . La barra del recuadro inferior izquierdo en D = 6 μm para todos los recuadros de la figura.

3.5 Protección de las células ciliadas de los efectos del cobre mediante cambios de temperatura y obstrucción de canales iónicos.

Para investigar el mecanismo de ingreso del cobre en las células ciliadas se intentó inhibir este proceso disminuyendo la temperatura del medio en que se encuentran las larvas. Es sabido que la disminución de la temperatura es perjudicial para el proceso de endocitosis (Schaeffer y Raviola, 1978; Meyers y cols., 2003). Además, las células ciliadas de los neuromastos muestran una activa endocitosis, proceso que ha sido propuesto como mecanismo para el ingreso de tinciones vitales como DiAsp, FM1-43 o DASPEI (Seiler y Nicolson, 1999). Se incubaron larvas en medio normal o suplementado con cobre a 4°C ó 25°C y luego se monitoreó la funcionalidad de las células ciliadas (utilizando DiAsp y FM1-43) para determinar si la baja temperatura aminora los efectos del cobre. Anteriormente se determinó que el tiempo mínimo de exposición a cobre requerido para eliminar las células ciliadas es de 35 minutos (datos no mostrados), por lo que se utilizaron estas condiciones para los ensayos de protección. Los tratamientos con CuSO_4 1 μM

produjeron, como anteriormente se mostró, la pérdida de la funcionalidad en las larvas incubadas a 25°C (Figura 13A); sin embargo, las larvas incubadas a 4°C no perdieron la capacidad de incorporar la tinción vital indicando un efecto protector (Figura 13B). Posiblemente la baja temperatura protege parcialmente los neuromastos del daño inducido por el cobre como resultado de una disminución de la endocitosis. A pesar de que una baja temperatura es capaz de inhibir la endocitosis, esta condición puede tener también un efecto en los canales iónicos de mecanotransducción presentes en las células ciliadas (Meyers y cols., 2003). También se ha propuesto que estas tinciones vitales ingresan a través de estos canales (Corey y cols., 2004, Meyers y cols., 2003). Para dilucidar si los canales de mecanotransducción están implicados en la entrada del cobre a las células ciliadas, se utilizó el inhibidor de canales iónicos amilorida (1 mM) (Seiler y Nicolson, 1999) y un tratamiento con CaCl 0.1M (Nishikawa y Sasaki, 1996), métodos conocidos por inhibir la función de estos canales. Ambos tratamientos tuvieron como resultado la protección de las células ciliadas de una manera similar al tratamiento con frío. Estos resultados sugieren que hay, por lo menos, una relación entre el mecanismo de entrada de estas tinciones vitales y el mecanismo de acción del cobre sobre las células del neuromasto.

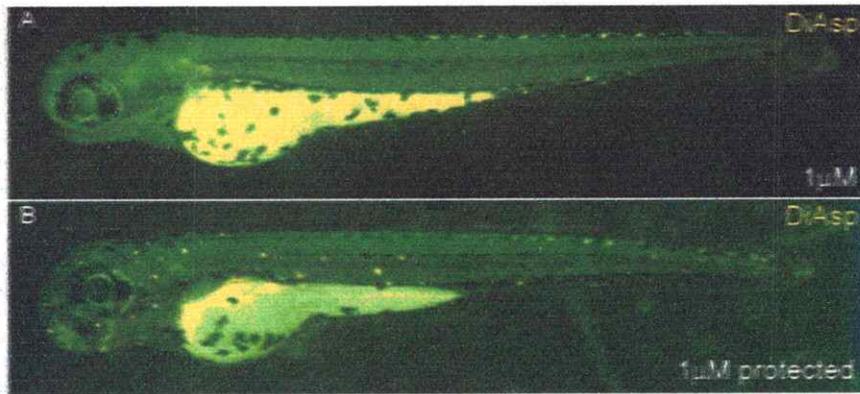


Figura 13. Los efectos dañinos del cobre en los neuromastos son inhibidos con distintos tratamientos. A), larva de 3 dpf expuesta a cobre 1 μ M por 35 minutos y luego incubada con DiAsp, no se observa marca en los neuromastos. B), larva en las mismas condiciones que en A, pero incubada con cobre a 4°C, se observa tinción DiAsp en los neuromastos.

3.6 Relación entre la actividad de las células ciliadas y su sensibilidad al cobre.

Existen sólidas evidencias de que la tinción vital FM1-43 ingresa a las células ciliadas a través del canal de mecanotransducción TRPA1 (Corey y cols., 2004), el cual es un canal iónico con alta permeabilidad para calcio que se abre mecánicamente producto del movimiento de los cilios. La presencia de este canal en las células ciliadas permite que el estímulo mecánico recibido por los cilios se transforme finalmente en una señal eléctrica. Por lo tanto, el trazador FM1-43 sólo ingresa a las células ciliadas que poseen la capacidad para realizar mecanotransducción, es decir, a las células ciliadas funcionales. Utilizando esta tinción vital y la línea transgénica ET4 se estudió *in vivo* y en tiempo real, a través de "time lapse", la relación entre la funcionalidad de estas células y su sensibilidad al cobre. Se encontró que a las 48 hpf los neuromastos, al estar en proceso de maduración, presentan células ciliadas funcionales y no funcionales. Esto se pudo establecer ya que al incubar larvas transgénicas ET4 con el marcador FM1-43 sólo algunas células resultaron marcadas (Figura 14A y F). Al incubar estas larvas con cobre 1 μ M, sólo se eliminaron las células FM1-43 positivas (célula amarilla en 14A) después de 40 minutos de incubación con el metal (Figura 14A-D). Sin embargo, al utilizar cobre 10

μM se eliminaron todas las células ciliadas visibles (funcionales y no funcionales, amarillas y verdes, respectivamente, 14F) al cabo de unos pocos minutos (Figura 14F-J). Estos resultados, junto con los de la sección anterior, indican que el efecto del cobre en las células ciliadas de la línea lateral está íntimamente ligado a su funcionalidad, sin embargo esto es cierto solo al utilizar concentraciones pequeñas ya que al aumentar la cantidad de este metal se ven afectadas las células funcionales y no funcionales. Es posible que con concentraciones mayores el cobre produzca un efecto tóxico a través de un mecanismo independiente de la actividad de las células ciliadas.

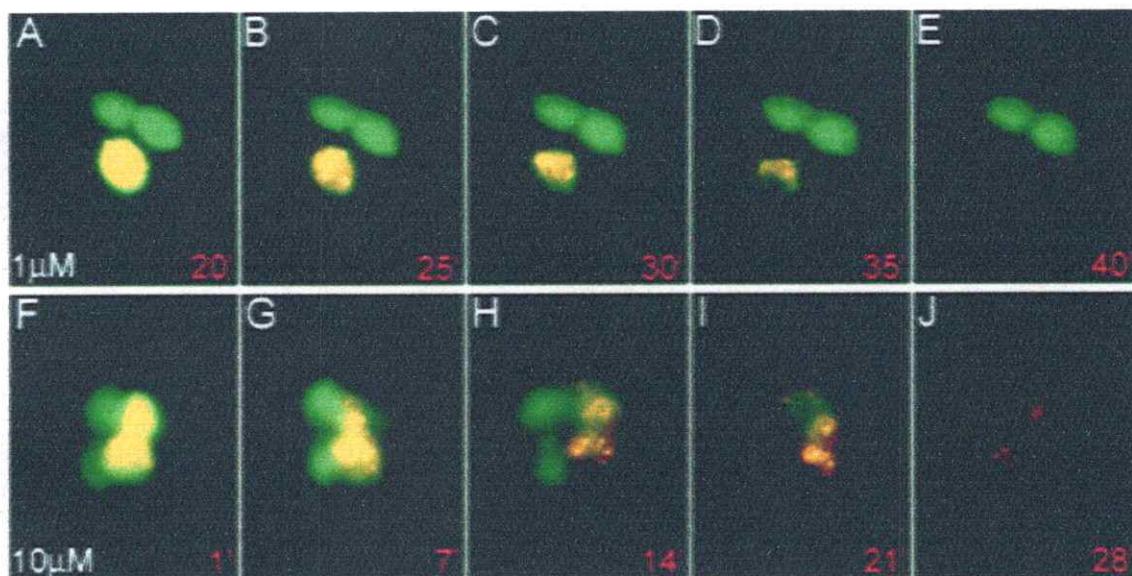


Figura 14. Relación entre la actividad de las células ciliadas y su sensibilidad al cobre. A)-J), neuromastos de larvas transgénicas ET4 de 48 hpf expresando GFP en las células ciliadas y teñidas además con FM1-43 para detectar las células funcionales (funcionales y no funcionales, amarillas y verdes, respectivamente). Se incubaron larvas en estas condiciones con cobre y con el metal presente en el medio se realizó la filmación de un neuromasto. De A) a F) se muestra un resumen de los eventos desde los 20 hasta los 40 minutos de incubación con cobre 1 μM . F)-J), resumen de los eventos desde el inicio hasta los 28 minutos de incubación con cobre 10 μM .

3.7 Sensibilidad de los neuromastos al cobre en comparación con otros metales.

Se encontró que el daño producido en los neuromastos fue idéntico al usar CuSO_4 u otra sal de cobre, CuCl_2 . Para determinar si los efectos observados eran específicos del cobre, se verificó la viabilidad de las células ciliadas (mediante la incorporación de DiAsp) y la inducción de muerte celular (tinción con Naranja de Acridina) luego de incubar con otros metales durante 2 horas comenzando a las 76 hpf (tabla 1). El zinc (ZnSO_4) produjo efectos semejantes a los provocados por cobre, sin embargo la concentración mínima requerida para inhibir la incorporación de DiAsp fue de $50 \mu\text{M}$, mientras que la tinción con Naranja de Acridina ocurrió a partir de $250 \mu\text{M}$. El hierro (FeCl_3) también previno la tinción de DiAsp a una concentración de $50 \mu\text{M}$ pero no indujo muerte celular a $250 \mu\text{M}$; sin embargo, esta concentración resultó mortal para las larvas. La plata (AgNO_3) inhibió la incorporación de DiAsp a $1 \mu\text{M}$, sin embargo no se observó tinción con Naranja de Acridina con concentraciones mayores. Incubaciones con hasta $50 \mu\text{M}$ de manganeso (MnCl_2), cobalto (CoCl_2), cadmio (CdCl_2) y estaño (SnCl_2) no causaron pérdida de funcionalidad de las células ciliadas por lo que no se probaron concentraciones más altas.

Metal	Concentration (μM)	Tinción DiAsp	Tinción Naranja de Acridina
Cu^{++}	1	-	-
	50	-	+
	250	-	++
Zn^{++}	1	+	-
	50	-	-
	250	-	+
Fe^{+++}	1	+	-
	50	-	-
	250	-	-
Ag^+	1	-	-
	50	-	-
	250	-	-
Mn^{++}	1	+	ND
	50	+	ND
	250	ND	ND
Co^{++}	1	+	ND
	50	+	ND
	250	ND	ND
Cd^{++}	1	+	ND
	50	+	ND
	250	ND	ND
Sn^{++}	1	+	ND
	50	+	ND
	250	ND	ND

Tabla 1. Sensibilidad de los neuromastos al cobre en comparación con otros metales. Se incubaron larvas de 76 hpf durante 2 horas con variados metales y posteriormente se analizó la incorporación de las tinciones vitales DiAsp y Naranja de Acridina. En el caso de DiAsp, los signos (-) y (+) indican ausencia o presencia de marca respectivamente. Para Naranja de Acridina, el signo (-) señala similitud a el control y (+) indica mayor tinción respecto al control. ND, no determinado. Las sales usadas fueron CuSO_4 , ZnSO_4 , FeCl_3 , AgNO_3 , SnCl_2 , MnCl_2 , CoCl_2 , y CdCl_2 .

3.8 Uso de la toxicidad del cobre para estudiar la regeneración de células ciliadas.

La siguiente serie de experimentos plantean el uso del daño producido por el cobre sobre los neuromastos como una herramienta para estudiar la regeneración de células ciliadas.

3.8.1 La regeneración de los neuromastos depende de la concentración de cobre presente en el medio.

Para determinar si el efecto del cobre sobre los neuromastos es permanente o reversible, se monitoreó la incorporación de DiAsp después de remover el metal del medio de incubación. Las larvas se trataron durante dos horas con distintas concentraciones de CuSO_4 y se contó la cantidad de neuromastos marcados con DiAsp diariamente hasta 5

días después de la incubación (Figura 15). Un neuromasto fue considerado como regenerado al detectar al menos una célula teñida con DiAsp en el neuromasto. Al analizar los datos, se encontraron diferencias entre la recuperación de los neuromastos de la línea lateral anterior (ALL), ubicados en la cabeza, y los de la posterior (PLL), distribuidos en el tronco y la cola. Todos los neuromastos de la ALL lograron regenerar (Figura 15A y C), incluso al usar una concentración de 400 μM , la concentración más alta estudiada (datos no mostrados). Se encontró que después de exponer larvas a CuSO_4 1 ó 10 μM , los neuromastos de la PLL lograron recuperarse, siendo el tiempo de recuperación proporcional a la concentración de cobre utilizado (Figura 15B). Sin embargo, al usar cobre 50 μM , o concentraciones mayores, los neuromastos de la PLL no lograron reaparecer (a excepción de los neuromastos terminales, que residen en la punta de la cola). A los 5 días postincubación, la línea lateral secundaria, la cual en el momento en que se hicieron las incubaciones aún no presenta neuromastos, se desarrolló normalmente en todas las larvas sin importar la concentración de cobre utilizada (Figura 15D y no mostrado). Esto indica que la salud general y la capacidad de generar neuromastos a partir de fuentes alternativas no se pierde en las larvas tratadas.

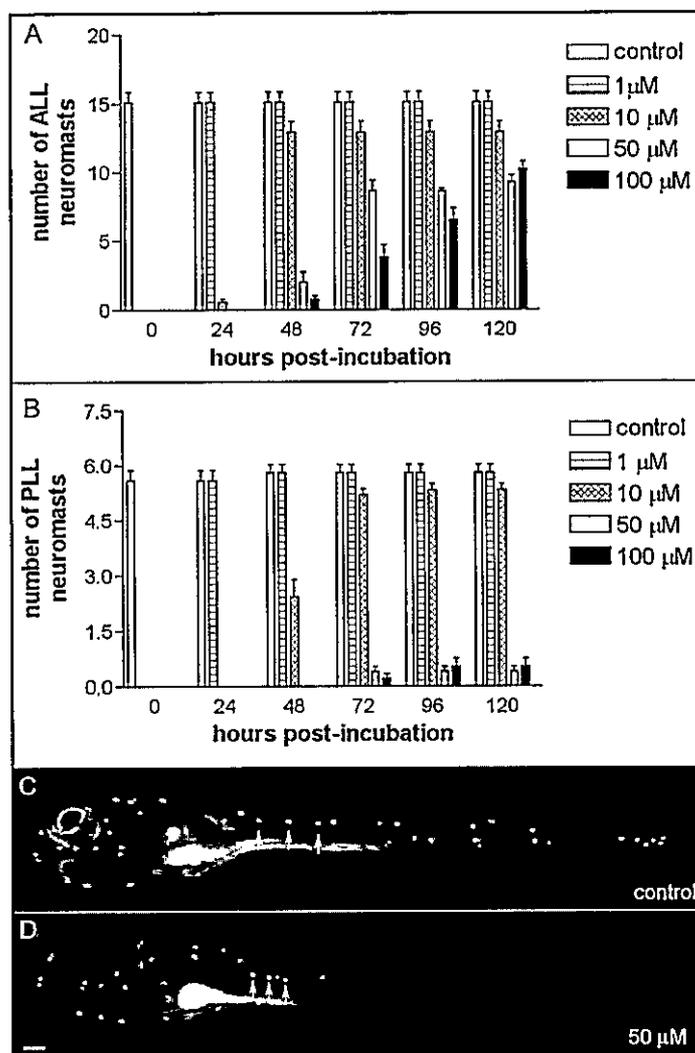


Figura 15. Regeneración de neuromastos funcionales luego de incubaciones con cobre. Larvas de 76 hpf fueron expuestas a distintas concentraciones de cobre por dos horas. Luego se monitorió diariamente la funcionalidad de los neuromastos usando la tinción vital DiAsp hasta 5 días después de la incubación con cobre. Se contaron los neuromastos con marca DiAsp en la línea lateral anterior (ALL, A) y en la línea lateral posterior (PLL, B). C, larva control incubada con DiAsp a los 8 dpf. Las flechas indican lo neuromastos de la línea lateral posterior secundaria. D, larva tratada con cobre 50 μM por dos horas a las 76 hpf y teñidas con DiAsp 5 días después de la incubación. Los neuromastos de la ALL logran reaparecer, pero no así los de la PLL. Las flechas muestran la presencia de los neuromastos de la línea lateral secundaria. La barra en D representa 35 μm .

Se analizó también la reaparición de células ciliadas luego de incubar larvas con cobre en un neuromasto de la ALL (neuromasto O, ver Figura 17A y B) y en uno de la PLL (neuromasto P1, ver Figura 17A). Se incubaron larvas transgénicas ET4 de 76 hpf durante 2 horas con cobre 1 ó 10 μM y luego se contó el número de células ciliadas fluorescentes en ambos neuromastos a distintos tiempos después de la incubación y se graficó como

porcentaje de células ciliadas en cuanto al control (Figura 16). Se encontró un comportamiento similar en la reparación de células ciliadas de ambos neuromastos. En las larvas incubadas con cobre 1 μM reaparecieron células ciliadas a las pocas horas tras la incubación y el número de ellas se igualó al de los controles alrededor de 24 horas luego de la incubación (Figura 16, cuadrados). Al utilizar cobre 10 μM la reaparición de células ciliadas ocurrió mas tardíamente que con 1 μM y además mostró ser más lenta, ya que tomó mucho mas tiempo en igualarse en número a los controles (Figura 16, rombos). Cabe destacar que la aparición de células ciliadas fluorescentes en el transgénico ET4 ocurre con bastante anticipación a su capacidad de ser marcadas con las tinciones vitales, lo que concuerda con la demora que ocurre entre la diferenciación de estas células y el inicio de su capacidad mecanotransductora, lo que es visible también en los neuromastos cuando aparecen las primeras células funcionales (ver sección anterior).

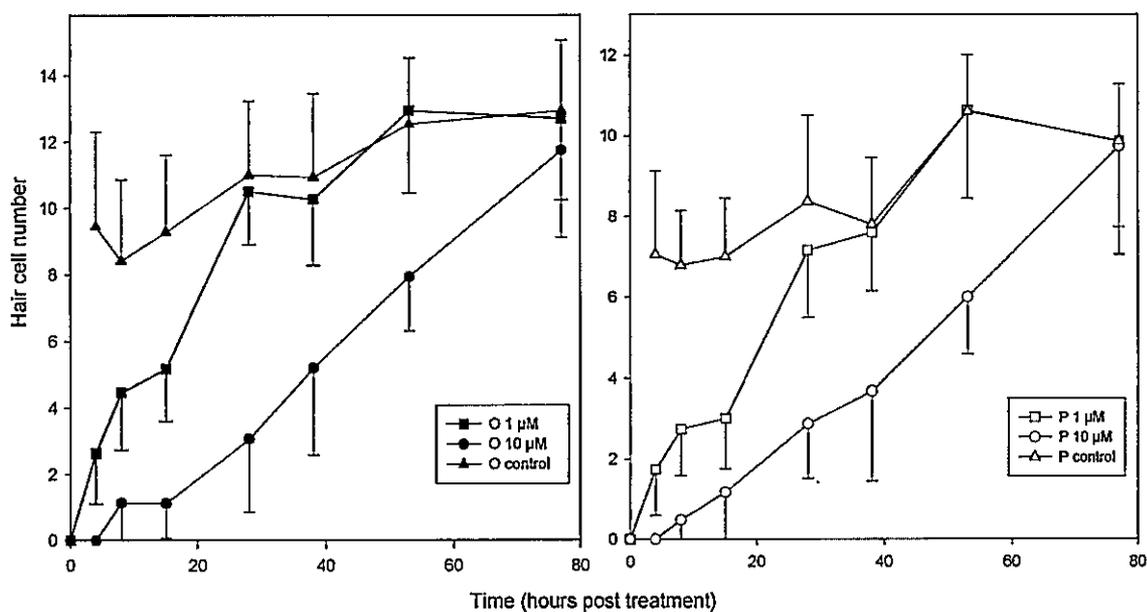


Figura 16. Reparación de células ciliadas luego de tratamientos con cobre. Se incubaron larvas transgénicas ET4 durante dos horas con cobre 1, 10 μM o en medio sin cobre adicionado y luego se contó el número de células ciliadas presentes en los neuromastos O y P1. Se graficó para cada neuromasto el porcentaje de células ciliadas en cuanto al control.

3.8.2 Proliferación celular luego de los tratamientos con cobre.

Para investigar si la reaparición de células ciliadas funcionales en larvas tratadas con cobre se debía a la generación de células nuevas, se examinó la proliferación celular en los neuromastos después de los tratamientos con cobre. Para esto se analizó la presencia del marcador mitótico PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) en larvas control y en larvas tratadas con cobre (Figura 17). Se encontró presencia de células proliferativas en los neuromastos de la línea lateral anterior (ALL), posterior (PLL) y posterior secundaria (2PLL) de las larvas control (Figura 17A) y de las tratadas con cobre 1 y 10 μM (datos no mostrados). Sin embargo, las larvas tratadas con 50 μM mostraron presencia de PCNA sólo en la ALL y la 2PLL (Figura 17B). Las células PCNA positivas pueden ser normalmente encontradas en la periferia de los neuromasto (Figura 17A, recuadro). Para saber si el número de células proliferativas cambia después de los tratamientos con cobre, se contó el número de células PCNA positivas en los neuromastos O y P1 15 horas luego de la exposición a cobre. Esto nos permitió analizar la proliferación en un tiempo intermedio entre el tratamiento con cobre y la recuperación de células ciliadas viables (Figura 17). Cuando larvas fueron incubadas con cobre 1 μM se encontraron significativamente más células proliferando en comparación a los controles en ambos neuromastos (O y P1) (Figura 17C, $p < 0.001$). Sin embargo, al utilizar concentraciones de cobre mayores, los neuromastos O y P1 mostraron un comportamiento diferente. Mientras el neuromasto O mostró células proliferativas a todas las concentraciones estudiadas, el neuromasto P1 mostró ausencia de estas células en larvas incubadas con cobre 50 μM . Estos resultados, junto con los experimentos de tinción con Naranja de Acridina y los ensayos de regeneración de las células ciliadas, sugieren que en los neuromastos de la PLL, bajas concentraciones de cobre inducen muerte celular, la cual es seguida de proliferación y finalmente la reaparición de células ciliadas funcionales. Además, altas concentraciones de cobre (e.g., CuSO_4 50 μM) afectan irreversiblemente la capacidad del

neuromasto de regenerar células ciliadas en la PLL. Sin embargo en la ALL el cobre induce muerte celular de manera similar, pero la proliferación y la reaparición de células ciliadas puede ocurrir aún a concentraciones de cobre que suprimen este proceso en la PLL.

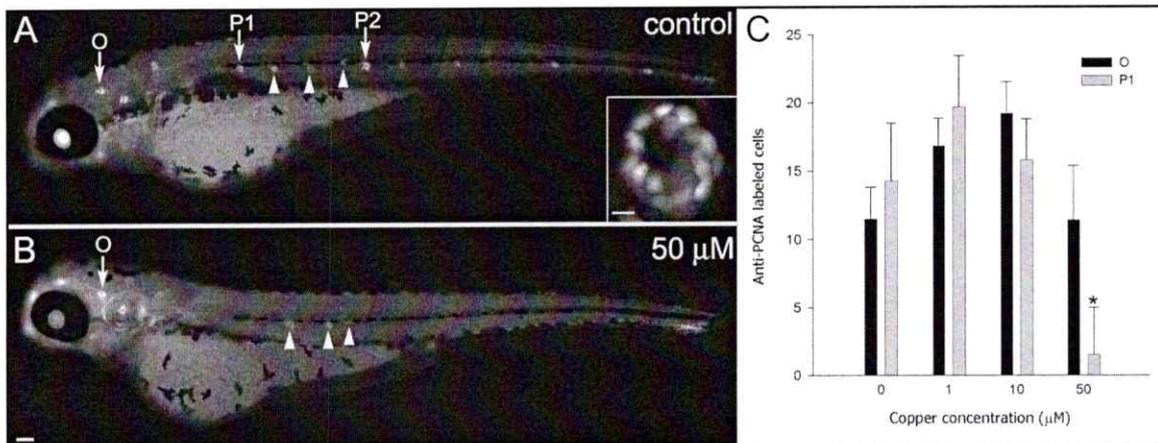


Figura 17. Proliferación en neuromastos luego de tratamientos con cobre. Inmunohistoquímicas contra PCNA realizadas 15 horas luego de la exposición a cobre (en larvas de 93 hpf). A), Larva control que muestra presencia de PCNA en todos los neuromastos: PLL (e.g., P1 y P2), ALL (e.g., O) y 2PLL (cabezas de flecha). El recuadro en A es un acercamiento de un neuromasto que muestra la ubicación periférica de las células PCNA positivas. B), Larva tratada con CuSO_4 50 μM . Se observa presencia de células marcadas en la ALL (e.g., O) y 2PLL (cabezas de flecha), pero la ausencia de marca en la PLL. La barra indica 35 μm en B y 6 μm en el recuadro de A. C), Cuantificación de las células marcadas con el anticuerpo anti-PCNA en los neuromastos O y P1 de larvas expuestas a diferentes concentraciones de cobre. El número de células marcadas en el neuromasto P1 a 50 μM fue significativamente diferente comparado con el número de células de todas las otras concentraciones (asterisco, $p < 0.001$).

3.8.3 La regeneración de células ciliadas a partir de precursores mitóticos o no mitóticos depende de la profundidad del daño en el neuromasto.

Debido a que se encontró que al tratar larvas con mayores concentraciones de cobre las células ciliadas tardan más en reaparecer, se investigó si estas células nuevas provienen de una división celular al tratar con distintas concentraciones de cobre. Larvas transgénicas ET4 de 76 hpf fueron tratadas con CuSO_4 1 ó 10 μM durante dos horas, fueron lavadas con medio E3 y luego se incubaron con Bromodeoxiuridina (BrdU) hasta que aparecieran aproximadamente 3 células ciliadas. Los tiempos necesarios para llegar a este número se obtuvieron de los datos de la sección 3.9 (6 horas para 1 μM y 23 horas

para 10 μM). Alcanzado este número se realizaron inmunodetecciones de BrdU y GFP las que luego se analizaron en un microscopio de epifluorescencia (Figura 20A-F). Se cuantificó en el neuromasto O y P1 de larvas tratadas con cobre 1 y 10 μM , el número de células GFP positivas y se contó cuantas de estas células poseían además marca de BrdU. El resultado de esta cuantificación se graficó como proporción de células ciliadas con marca BrdU según el total de células GFP positivas, esto es: proporción = n° células BrdU+GFP / n° células GFP (Figura 18G). Se encontró que las larvas incubadas con cobre 1 μM poseían una proporción muy baja de nuevas células ciliadas con marca BrdU (0.03 para el neuromasto O y 0.1 para el P1). En cambio en las larvas incubadas con cobre 10 μM una proporción bastante mayor de células ciliadas poseían marca de BrdU (0.8 para el O y 0.6 para el P1). Estos porcentajes son significativamente diferentes ($p < 0.05$), sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre los neuromastos O y P1 para el mismo tratamiento de cobre ($p > 0.05$). Este resultado indica que al incubar con 1 μM las células ciliadas nuevas además de aparecer mas rápidamente que al incubar con concentraciones mayores, no provienen de una división mitótica. En cambio, al incubar con 10 μM de cobre se induce un daño mayor en el neuromasto, lo que probablemente elimina a los precursores postmitóticos cercanos a diferenciarse. De esta manera, para la generación de nuevas células se requeriría la división de los progenitores más basales lo que explicaría la reaparición más tardía de células ciliadas.

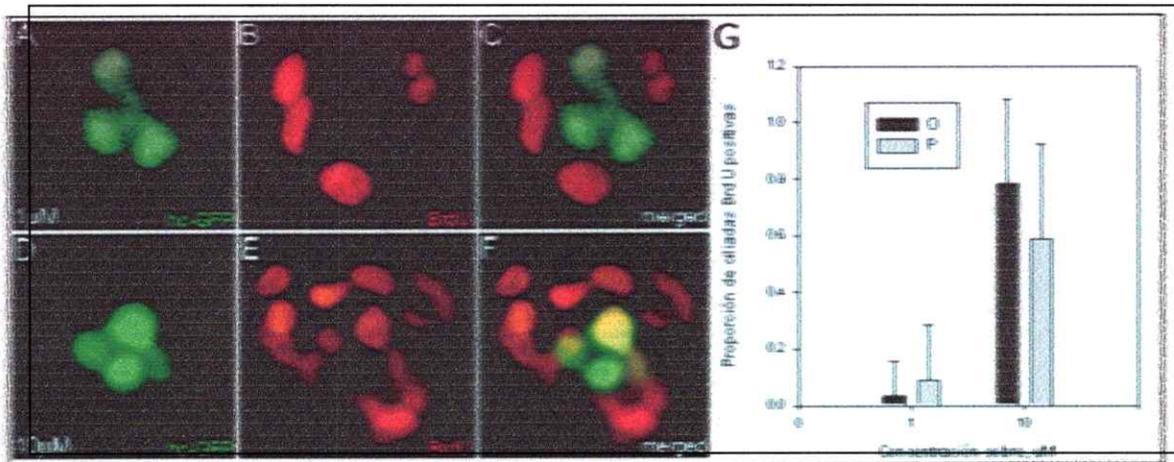


Figura 18. Regeneración de células ciliadas a partir de precursores mitóticos y no mitóticos. A-F, inmunohistoquímica anti-GFP (verde) y anti-BrdU en larvas ET4, luego de exposiciones a cobre y la posterior reaparición de células ciliadas. A-C, neuromasto de larva incubada con 1 μM de cobre. D-F, neuromasto de larva incubada con 10 μM de cobre. G), cuantificación del porcentaje de células que expresan ambos marcadores en los neuromastos O y P1, luego de incubar con 1 y 10 μM de cobre.

3.8.4 Presencia de células troncales en los neuromastos.

Debido a la gran capacidad regenerativa que poseen las células sensoriales de los neuromastos y a la permanente existencia de una población de células mitóticas, se buscó la presencia de marcadores de células troncales neurales. Una célula troncal neural se define como una célula que es capaz de autorenovarse, proliferar y dar origen a los tres tipos clásicos de células nerviosas (neuronas, astrocitos, y oligodendrocitos). El factor de transcripción SOX2 ha sido ampliamente usado como marcador de este tipo de células madre (Cai y cols., 2002, Ellis y cols., 2004). Se realizaron detecciones de mRNA mensajero para *sox2* de pez cebra mediante la técnica de hibridación *in situ* (Figura 19A). Larvas de 76 hpf mostraron presencia de mRNA mensajero de *sox2* en todos los neuromastos (Figura 19A, flechas). También se realizaron inmunohistoquímicas para detectar la proteína SOX2 en larvas transgénicas ET4 (Figura 19B, C y D). Estas larvas mantienen la fluorescencia de GFP después de fijadas por lo que no fue necesario detectar ni revelar la presencia de GFP. Se encontró la presencia de la proteína SOX2 en las células adyacentes a las células ciliadas, las cuales mostraron no contener esta

proteína (Figura 19D). Se realizaron, además, inmunodetecciones de SOX2 y PCNA para analizar la existencia de células que expresaran ambos marcadores. Se encontró la presencia de células expresando ambos marcadores distribuidas en la periferia de los neuromastos (Figura 19G).

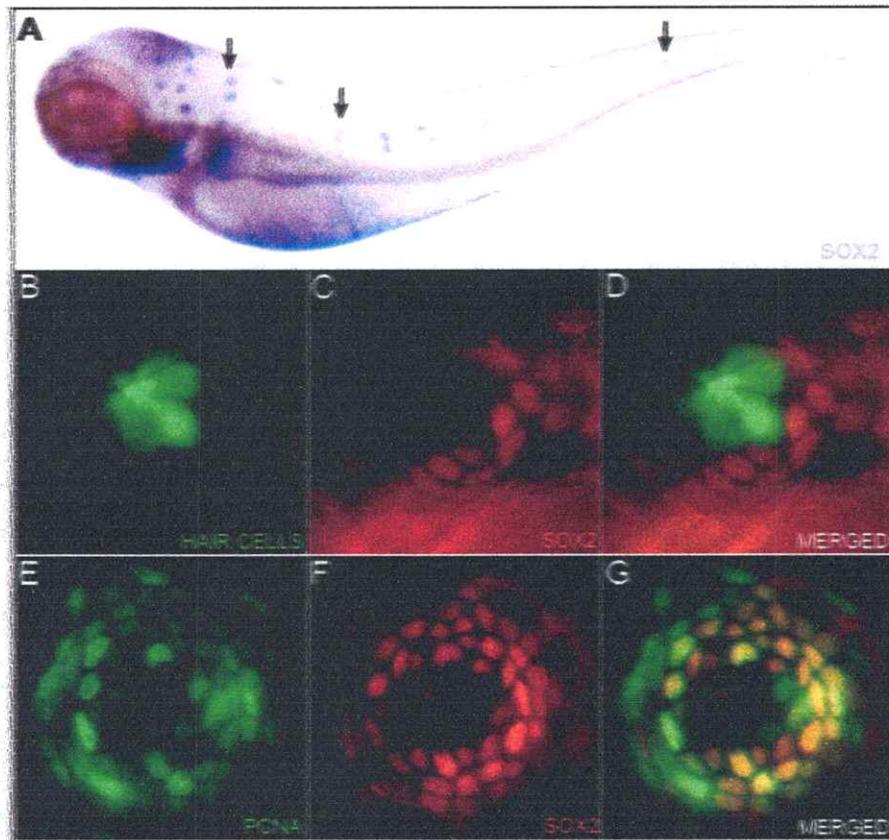


Figura 19. Expresión de *sox2* en la línea lateral. A), la hibridación *in situ* en larvas de 76 hpf, muestra la presencia de mRNA de *sox2* en los neuromastos. B), C) y D), células ciliadas fluorescentes en verde y en rojo núcleos marcados con el anticuerpo anti-SOX2. Las células SOX2 positivas rodean a las células ciliadas. E), F) y G) inmunohistoquímicas anti-SOX2 (rojo) y anti-PCNA (verde). En el neuromasto existen células que expresan ambos marcadores, las cuales se ubican periféricamente.

4. DISCUSIÓN

4.1 El gen *zctr1* codifica para un transportador funcional de cobre.

Anteriormente se había demostrado la importancia de este transportador de alta afinidad en el control homeostático intracelular del cobre en otras especies (Lee y cols., 2001, Kuo y cols., 2001). En un trabajo realizado en el mismo laboratorio donde se desarrolló esta tesis se clonó, se describió el patrón de expresión y se realizaron ensayos de pérdida de función del putativo transportador de cobre CTR1 de pez cebra. En este trabajo se demostró la esencialidad de la expresión de esta proteína para la supervivencia de estos peces. Se mostró también su alta identidad a nivel de secuencia aminoacídica con la proteína homóloga de humano y rata (Mackenzie y cols., 2004). Sin embargo, no se realizaron ensayos para comprobar si este gen codifica para un transportador funcional de cobre.

Los estudios de complementación en levaduras deficientes en transportadores de cobre indican que el gen *zctr1* revierte el fenotipo observado en la mutante MPY17 (*ctr1Δ-ctr3Δ*), ya que logra crecer en un medio donde la única opción para producir energía involucra la entrada de cobre en la célula. Además se observó que la incorporación de cobre radioactivo es significativamente mayor en levaduras mutantes MPY17 expresando el gen *zctr1* que las levaduras control. Estos datos, en suma, indican que el gen *zctr1* codifica para un transportador funcional de cobre sugiriendo que su funcionamiento podría estar involucrado en el mecanismo de ingreso de este metal en distintos tejidos y tipos celulares.

4.2 Letalidad de larvas inducida por cobre.

Muchos estudios han mostrado que los peces son más sensibles a los contaminantes durante los estadios de vida tempranos de su ciclo de vida. También se ha descrito que otros organismos acuáticos distintos a peces son más sensibles a la polución del medio donde habitan (Buikema y cols., 1982; McKim, 1985; Witeska y cols., 1995; Herkovits y

cols., 1997; Petersen y Kristensen, 1998; Smit y cols., 1998; Viljoen, 1999) y a metales pesados (Beaumont y cols., 1967; D'Agostino y Finney, 1974; Chung, 1978; Redpath, 1985). En general los huevos de peces son mas resistentes que los peces juveniles a los efectos tóxicos del cobre (Gangstad, 1986). Sin embargo, los efectos tóxicos del cobre en peces varía entre las especies y depende de las características químicas y físicas del agua (Pimentel, D. 1971). Palmer y Butler (Palmer y cols., 1998) encontraron que en el pez cebra los adultos son más sensibles al cobre que los embriones. Ellos asignaron un LC50 para 12 días de incubación de 2.2 μM (encontraron que con esta concentración de cobre los embriones no eran capaces de eclosionar y que en esta condición morían al cabo de 12 días). Basándose en curvas de letalidad calcularon un LC50 para 4 días de exposición a cobre de 1,9 μM para peces adultos de 5-9 meses de edad. En nuestros resultados, el valor de LC50 para 4 días de exposición a cobre de larvas de 72 hpf (ya eclosionadas) fue de 13.82 μM . Juntos, estos resultados muestran que los embriones y larvas son mas resistentes al cobre presente en el medio que los adultos. Nuestros resultados indican que al aumentar el tiempo de exposición a cobre ocurre un incremento de la letalidad de estos peces lo que es posible apreciar en la forma sigmoidea de las curvas de letalidad y en la forma logarítmica de la curva de LC50. Estos resultados son muy similares a lo predecible por modelos matemáticos de toxicidad en ambientes acuáticos (como el modelo de ligando biótico) y a datos de toxicidad en otros organismos marinos (Marr y cols., 1998, Di Toro y cols., 2001, Niyogi y cols., 2004, Gravenmier y cols., 2005). Esto refleja que a pesar de la esencialidad del cobre en variados procesos biológicos, es altamente tóxico cuando se encuentra presente en exceso en el medio donde se desarrollan los peces. En nuestro trabajo se comprobó que construir curvas de letalidad y de valores de LC50 en función del tiempo es de gran utilidad para diseñar adecuadamente experimentos enfocados a estudiar los efectos de un contaminante sobre un organismo.

4.3 En larvas de pez cebra expuestas a cobre se induce la activación del promotor de la proteína de estrés térmico HSP70.

Utilizando los datos de letalidad aguda y los valores calculados de LC50 se diseñaron ensayos para determinar si el cobre presente en el medio es capaz de inducir la expresión de la proteína HSP70. Previamente se había reportado que el estrés térmico y el cadmio son capaces de inducir la expresión de GFP en la misma línea transgénica utilizada en nuestro trabajo (Blechinger y cols. 2002a, Blechinger y cols., 2002b). Encontramos que el cobre induce la expresión de GFP en estos peces especialmente en el sistema nervioso central y también en el epitelio olfatorio y agallas dependiendo de la concentración del metal presente en el medio. Concentraciones altas (400 μM) produjeron además expresión mas tardía en el hígado y otros tejidos internos lo que fue analizado a través de inmunohistoquímica en cortes histológicos. Se ha descrito que el hígado, intestino y tejidos renales (pronefros) acumulan cobre en el pez sapo y trucha arcoiris al ser expuestos a cobre (Kamunde y cols., 2003, Grosell y cols., 2004), lo que podría ser un mecanismo de protección frente a la acumulación interna de cobre. Estas observaciones son similares a las realizadas al exponer estas larvas transgénicas a cadmio (Blechinger y cols., 2002a). Estos órganos están implicados también en la homeostasis de cobre en humanos donde el cobre se incorpora a través del intestino, se almacena y distribuye en el hígado y se elimina gracias a los riñones. En el pez cebra, como en todos los teleósteos, la nutrición en estadios tempranos del desarrollo depende del vitelo hasta que se desarrollan los órganos digestivos y las larvas comienzan a alimentarse, lo cual ocurre entre los 4 y 5 días. En nuestros experimentos las larvas fueron incubadas a los 3 días, momento en el que los órganos digestivos se encuentran en formación. Es interesante hacer notar que durante las incubaciones estos órganos se encontraban en desarrollo y que la línea transgénica mostró expresión de GFP luego de 3 días terminada la exposición al metal, momento en que ya se encuentran funcionales. Otra observación

interesante es que el cobre es capaz de inducir una fuerte expresión de *hsp70* en el sistema nervioso central. Es sabido que el cobre induce estrés oxidativo ya que genera radicales libres al participar en la reacción de Fenton. Las neuronas son especialmente sensibles a este tipo de estrés. Sin embargo no se analizó si además de la expresión de este gen ocurre muerte celular en los tejidos afectados, como ha sido mostrado que ocurre en el sistema nervioso central tras exposiciones a cadmio (Hen Chow y Cheng 2003).

4.4 El cobre presente en el agua daña los neuromastos de la línea lateral del pez cebra.

En este trabajo se mostró que la presencia de cobre en el agua donde las larvas de pez cebra cursan su desarrollo produce un marcado efecto en la función, supervivencia y capacidad regenerativa de las células mecanosensoriales de la línea lateral. Las concentraciones usadas en estos ensayos no provocan letalidad al ser usadas de manera transitoria, sin embargo no se buscaron potenciales efectos a largo plazo producto de estos tratamientos. Los neuromastos son las unidades sensoriales de la línea lateral y contienen por lo menos dos tipos celulares: células ciliadas mecanosensoriales que transducen los estímulos mecánicos y células accesorias que otorgan, al menos, sostén estructural al neuromasto (Ghysen y Dambly-Chaudiere, 2004). Las células ciliadas están en contacto directo con el medio externo, presentan una activa endocitosis de compuestos presentes en el agua y pueden ser fácilmente visualizadas *in vivo* debido a la incorporación de moléculas fluorescentes como DiAsp o FM1-43 (Collazo y cols., 1994, Seiler y Nicolson, 1999). Muchos autores han propuesto que la capacidad mecanotransductora de las células ciliadas de la línea lateral del pez cebra es alcanzada a los 3-4 días postfertilización y que en este momento es cuando son inervadas (Raible y Kruse, 2000), momento en que la conducta de la larva es consistente con una línea lateral funcional (Nicolson y cols., 1998).

En los experimentos descritos en este trabajo se eliminó la viabilidad de las células ciliadas al incubar larvas de pez cebra con cobre disuelto en el agua durante solo dos horas. La concentración requerida para este efecto fue de $1 \mu\text{M}$ CuSO_4 , más de dos ordenes de magnitud menor que el valor de LC_{50} para las mismas condiciones de exposición ($280,16 \mu\text{M}$). Este tratamiento elimina la tinción con DiAsp y FM1-43 y produce la pérdida de marcadores antigénicos específicos de las células ciliadas del neuromasto. Gracias al uso de larvas transgénicas que expresan GFP en las células ciliadas se pudo determinar que estas células fluorescentes son efectivamente eliminadas, encontrándose diferencias en la susceptibilidad al cobre entre las células funcionales (que realizan mecanotransducción) y no funcionales. En un embrión de 48 horas las células funcionales (las capaces de incorporar FM1-43) son eliminadas al cabo de 30 minutos y, en cambio, las células no funcionales desaparecen luego de 2 horas. Sin embargo, al utilizar Naranja de Acridina (AO) no se observaron diferencias con las larvas control, lo que se podría deber a que este método no es lo suficientemente sensible para detectar la muerte de estas células o que ya no queda rastro de estas células en el momento de la incubación con AO. Además, los ensayos en larvas expuestas a concentraciones crecientes de cobre mostraron un claro efecto dependiente de la concentración ya que las larvas tratadas con $10 \mu\text{M}$ ó $50 \mu\text{M}$ CuSO_4 presentaron un mayor número de células muertas. Con el uso de larvas transgénicas se determinó que al aumentar la concentración de cobre se dañan otros tipos celulares además de las células ciliadas. Al incubar con cobre $1 \mu\text{M}$ las células del manto no sufrieron ningún tipo de daño, sin embargo al usar $50 \mu\text{M}$, junto con un incremento en la muerte celular en los neuromastos, se observó la pérdida de estas células.

El cobre es bien conocido por ser un metal severamente citotóxico, generando estrés oxidativo y daño celular si se acumula mas allá de lo que es capaz de asimilar una célula (Gaetke y Chow, 2003). Los resultados aquí expuestos sugieren que el cobre tiene

acceso a las células ciliadas en suficiente cantidad como para producir muerte celular en minutos u horas. La toxicidad a través de estrés oxidativo ha sido observada para los aminoglicósidos, los cuales activan la muerte celular apoptótica en las células ciliadas debido a la producción de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (Forge y Li, 2000; Forge y Schacht, 2000).

La droga anti-cáncer cisplatina también ha mostrado ser extremadamente ototóxica en mamíferos debido a que en las células ciliadas induce estrés oxidativo (Clerici y cols., 1996), en parte a través del secuestro de moléculas antioxidantes de la célula (Ravi y cols., 1995). La cisplatina es también tóxica para las células ciliadas de la línea lateral (Ton y Parng, 2005). Si el cobre se acumula en la células ciliadas, los efectos podrían ser similares a los descritos.

Como es que el cobre ingresa a estas células es una interesante interrogante. Estudios previos han intentado resolver este tema para compuestos que son también específicamente tóxicos para las células ciliadas como son los aminoglicósidos, pero el mecanismo de incorporación de estas drogas permanece desconocido. Ha sido propuesto que el ingreso podría ser a través de endocitosis apical (Richardson y cols., 1997) y a través de canales de mecanotransducción (Gale y cols., 2001). Esta es una pregunta difícil de aclarar debido al estrecho vínculo entre la endocitosis y la mecanotransducción de las células ciliadas: mutaciones en el gen *myosinaVII* afectan ambos procesos y bloquean la entrada de aminoglicósidos en estas células (Ernest y cols., 2000).

En larvas de pez cebra, las células ciliadas inmaduras muestran resistencia a estos compuestos (Murakami y cols., 2003) sugiriendo una correlación entre la madurez de las células mecanoreceptoras y el ingreso de drogas. Los canales de mecanotransducción son permeables a cationes mono y divalentes. En un reciente trabajo se demostró que la mecanotransducción depende de la expresión del canal TRPA1 y que la tinción vital FM1-43, sólo se incorpora a las células activas lo que sugiere que este marcador ingresa a las

células ciliadas a través de este canal (Corey y cols., 2004), como se ha propuesto en trabajos anteriores (Meyers y cols., 2003). Los resultados de protección de los efectos del cobre mediante incubaciones a bajas temperaturas y la obstrucción de canales iónicos utilizando amilorida o altas concentraciones de calcio, mostraron un vínculo entre la entrada de las tinciones vitales (DiAsp y FM1-43) y el efecto del cobre sobre las células ciliadas. Esto fue corroborado ya que se vio que al teñir con FM1-43 larvas transgénicas que expresan GFP en las células ciliadas, solo las células funcionalmente activas, es decir las activas, mueren rápidamente.

Aunque el canal puede no ser selectivo para los cationes, el cobre es particularmente tóxico para las células ciliadas, pues otros metales, con la excepción de la plata, no mostraron los mismos efectos al ser usados a concentraciones similares. Ya que la inhibición de canales iónicos puede proteger a las células ciliadas de los efectos del cobre, se puede interpretar que la entrada de cobre en las células ciliadas ocurre a través de canales, o quizás un transportador, más que solamente vía endocitosis. Interesantemente, la cisplatina puede entrar a las células a través del transportador de cobre de alta afinidad CTR1 (Ishida y cols., 2002). En pez cebra, el transportador de cobre de alta afinidad CTR1, se expresa extensamente durante estadios tempranos de la vida de pez cebra (Mackenzie y cols., 2004), y de esta manera, zCTR1 podría estar mediando, por lo menos parcialmente, la acumulación de cobre en las células ciliadas del neuromasto. En este trabajo se mostró que este transportador es efectivamente funcional a través de la complementación de levaduras deficientes en transportadores de cobre, las cuales incrementan la incorporación de cobre externo al expresar heterológamente el gen *ctr1* de pez cebra. Además, este transportador es capaz de transportar plata (Lee y cols., 2002), una propiedad que se correlaciona con la toxicidad que ambos metales producen en las células ciliadas. Sin embargo no se detectó una mayor cantidad de RNA mensajero de este gen en los neuromastos en comparación con otros tejidos del embrión (datos no

mostrados), lo que implica que las células ciliadas no poseen una mayor cantidad de este transportador, lo cual quizás las haría más sensibles al cobre externo.

Un trabajo reciente mostró que la exposición transitoria a cobre durante el desarrollo embrionario de otro pez ("fathead minnows") puede alterar la capacidad del pez de responder a estímulos quimiosensoriales (Carreau and Pyle, 2005). La quimiosensación es adquirida a través de células especializadas presentes en el epitelio olfatorio y en la superficie del cuerpo. Es interesante hacer notar que estas células son marcadas fácilmente con tinciones vitales, sugiriendo que el mecanismo de toxicidad en ambos tipos celulares (células del neuromasto y del epitelio olfatorio) podría ser similar.

En anamniotos, las células ciliadas del oído y de la línea lateral son capaces de regenerar luego de ser dañadas por compuestos tóxicos, sobreestimulación sonora o al ser eliminadas utilizando un láser. Es importante hacer notar que existen sólidas evidencias que indican que las células ciliadas de línea lateral son equivalentes a las presentes en el oído (Pichon and Ghysen, 2004), lo que valida a este sistema como modelo de estudio de su desarrollo, toxicidad y regeneración. Estudios previos han mostrado que los antibióticos aminoglicósidos, los cuales producen la muerte de las células ciliadas en el oído interno de los vertebrados, pueden dañar y eliminar las células ciliadas de los neuromastos del pez cebra de manera dependiente de la concentración (Murakami y cols., 2003). Se ha descrito también que las células ciliadas reaparecen entre las 12 y 24 horas después de estos tratamientos (Harris y cols., 2003).

En nuestros estudios se observó que tras el daño producido en los neuromastos debido a incubaciones con cobre, las células ciliadas pueden regenerar dependiendo de la concentración del metal utilizada, es decir, del nivel de daño infringido.

Una explicación de este fenómeno es que en el neuromasto existe una población de precursores postmitóticos de las células ciliadas que no se ven afectados por el cobre y que rápidamente reemplazan a las células perdidas. Una población con estas

características debe existir ya que en los neuromastos del pez hay un continuo reemplazo de las células ciliadas (Williams y Holder, 2000) y durante el estadio larval incrementa el número de células del neuromasto. Al tratar larvas con cantidades mayores de cobre ($10 \mu\text{M}$) se induce la muerte celular y reaparecen nuevas células ciliadas luego de 2-3 días. En este caso es más probable que muera la población de células ciliadas diferenciadas y quizás, además, la población de células precursoras, lo que requeriría la proliferación de un grupo más basal de células progenitoras, las cuales podrían repoblar el neuromasto. Para comprobar esta hipótesis se diseñaron experimentos de pulso y caza utilizando el análogo de timidina BrdU. Estos experimentos mostraron que la rápida regeneración de células ciliadas en larvas tratadas con cobre $1 \mu\text{M}$ no requiere la división de progenitores, en cambio, al utilizar cobre $10 \mu\text{M}$ las nuevas células ciliadas provienen de una división mitótica. El mayor daño provocado en los neuromastos al parecer elimina los precursores postmitóticos que están cercanos a diferenciarse, por lo que la generación de nuevas células ciliadas implica la división de precursores que no fueron dañados por estar en una ubicación más basal en el neuromasto. Esto explicaría porque demora más tiempo la reaparición de células ciliadas al incubarse con cobre $10 \mu\text{M}$.

Cuando las larvas son tratadas con $50 \mu\text{M}$ CuSO_4 , el daño es visible no sólo como una explosión de las células del neuromasto, sino que también se observa un gran incremento en el número de células muertas (teñidas con Naranja de Acridina), ausencia de proliferación en los neuromastos de la línea lateral posterior (PLL), y una falla en la reaparición de las células ciliadas luego de remover el metal. Este resultado parece indicar que altas dosis de este metal son capaces de destruir las células ciliadas y todas las células que tienen la capacidad de regenerarlas. Las células precursoras presumiblemente se encuentran debajo o al lado de las células ciliadas (Balak y cols., 1990; Williams y Holder, 2000), y por esto podrían ser afectadas con altas concentraciones del metal. También es posible que las células de soporte sufran muerte

celular programada al ser destruidas las células ciliadas. En estos experimentos la línea lateral anterior (ALL) mostró una importante diferencia con la línea lateral posterior (PLL). Aunque los neuromastos en ambas áreas de la línea lateral mostraron poseer un número similar de células apoptóticas para cada condición, los niveles de proliferación mostraron un comportamiento distinto al variar las concentraciones de cobre. En la PLL, el número de células proliferativas incrementó en los peces tratados con CuSO_4 $1 \mu\text{M}$ y luego disminuyó a niveles casi indetectables al ocupar $50 \mu\text{M}$. En contraste, la ALL de peces tratados con cobre $50 \mu\text{M}$ mostró abundantes células proliferativas. Estas diferencias se correlacionan con las observaciones de la regeneración de células ciliadas en la ALL en comparación con las de la PLL. El neuromasto P1, el cual mostró muy pocas células marcadas con PCNA después de los tratamientos con cobre $50 \mu\text{M}$, no mostró regeneración de células ciliadas. En cambio, el neuromasto O mostró presencia de células PCNA positivas junto con la reaparición de células ciliadas al tratar con la misma concentración. Aunque no sabemos las razones de estas diferencias entre la ALL y PLL, es interesante hacer notar que se ha mostrado que los neuromastos de la ALL se encuentran en hendiduras o canales (Webb y Shirey, 2003), lo que posiblemente ofrecería más protección de los agentes externos. Además, es importante señalar que en todos los experimentos, incluso en los que se ocupó concentraciones altas de cobre ($100\text{-}400 \mu\text{M}$), se observó la aparición de la línea lateral secundaria después de los tratamientos. Esto indica que el primordio de la línea lateral secundaria, el cual no ha generado aún células ciliadas en el momento en que se realizaron los tratamientos (Sapède y cols., 2001), debe estar también protegido de los efectos del cobre externo.

Ya que en anamniotos las células del oído y la línea lateral son capaces de regenerar, se ha postulado que existe una población de precursores que se mantiene indiferenciada y permite un constante recambio de estas neuronas sensoriales (Balak y cols., 1990). Además, estudios en anfibios han mostrado que la regeneración de las células ciliadas

ocurre gracias a la diferenciación de precursores que yacen junto a los neuromastos, las cuales parecen ser las células de soporte (Balak y cols., 1990). En nuestro trabajo se mostró que en un neuromasto ya diferenciado existe una población de células altamente proliferativas ubicadas en la periferia de estos órganos. Al caracterizar con otros marcadores esta población se encontró que existen células que expresan el marcador de células troncales neurales *sox2* junto con marcadores de proliferación (PCNA). SOX2 ha sido usado extensamente como marcador de este tipo de células pluripotenciales, las cuales son capaces de dar origen a los distintos linajes neurales. Este hecho es coherente con la continua generación de células neurales sensoriales en los neuromastos.

Hemos visto en este trabajo una serie de características que hacen del sistema mecanosensorial de la línea lateral un excelente modelo para estudiar la regeneración de células sensoriales, como por ejemplo, la rápida muerte y reaparición de las células ciliadas y su ubicación superficial en el cuerpo de los peces. Esto último permite realizar *in vivo*, microscopía de alta calidad utilizando tinciones vitales de bajo costo en peces silvestres o transgénicos y también cuantificar y analizar estadísticamente los distintos fenómenos que ocurren en las células del neuromasto de manera fácil y rápida. Gracias a la ubicación superficial de este órgano en un organismo acuático, es también altamente controlable la homogeneidad de las condiciones experimentales a las que se someten los peces. Además el pez cebra posee muchísimas ventajas como son su transparencia, la gran cantidad de embriones que se puede obtener y almacenar a un bajo costo y la tecnología desarrollada para la detección y manipulación de la expresión génica.

Estos resultados incorporan un nuevo nivel de complejidad en el análisis de las consecuencias de moderadas cantidades de cobre en el ambiente acuático. Exposiciones transitorias a bajos niveles de cobre en el agua pueden no estar afectando la supervivencia inmediata del pez, pero órganos sensoriales como la línea lateral, muestran un daño bajo estas condiciones. El daño sobre este órgano sin duda produce un efecto en

la conducta de los peces ya que de este depende por ejemplo la detección de los movimientos de otros organismos que conviven en el mismo entorno como por ejemplo predadores o presas. Producto del uso del cobre en frenos de vehículos, pesticidas y materiales de construcción es posible encontrar en lagos, ríos y zonas costeras cercanos a zonas urbanizadas, importantes cantidades de cobre (Sansalone y cols., 1997). En el norte de California (USA) por ejemplo, desagües de la recolección de aguas lluvia han mostrado tener cobre disuelto a concentraciones que oscilan entre 0.05 y 1.65 μM (Soller y cols., 2005), cantidades de cobre que, según nuestros estudios, ya logran afectar el sistema mecanosensorial de la línea lateral.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrams J.M., White K., Fessler L.I., 1993. Steller H. Programmed cell death during *Drosophila* embryogenesis. *Development*. 117(1), 29-43.
- Airaksinen S., Rabergh C.M., Sistonen L. Nikinmaa M., 1998. Effects of heat shock and hypoxia on protein synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cells, *J. Exp. Biol.* 201, 2543-2551.
- Balak K.J., Corwin J.T., Jones J.E., 1990. Regenerated hair cells can originate from supporting cell progeny: evidence from phototoxicity and laser ablation experiments in the lateral line system. *J. Neurosci.* 10, 2502-2512.
- Beaumont A.R., Tserpes G., Budd M.D., 1967. Some effects of copper on the veliger larvae of the mussel *Mytilus edulis* and the scallop *Pecten maximus* (Mollusca, Bivalvia). *Mar. Environ. Res.*, 21, 299-309.
- Beckmann R.P., Mizzen L.E. Welch W.J., 1990. Interaction of hsp70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly, *Science* 248, 850-854.
- Blechinger S.R., Evans T.G., Tang P.T., Kuwada J.Y., Warren J.T., Jr., Krone P.H. 2002a. The heat-inducible zebrafish *hsp70* gene is expressed during normal lens development under non-stress conditions. *Mech. Dev.* 112, 213-5.
- Blechinger S.R., Warren J.T., Jr., Kuwada J.Y., Krone, P.H., 2002b. Developmental toxicology of cadmium in living embryos of a stable transgenic zebrafish line. *Environ. Health. Perspect.* 110, 1041-6.
- Buikema A.L. (Jr), Niederlehner B.R. Cairns J. (Jr), 1982. Biological Monitoring: Part IV – Toxicity Testing. *Water Res.* 16, 239-262.
- Cai J., Wu Y., Mirua T., Pierce J.L., Lucero M.T., Albertine K.H., Spangrude G.J., Rao M.S., 2002. Properties of a fetal multipotent neural stem cell (NEP cell). *Dev. Biol.* 251(2), 221-40.
- Carreau N., Pyle G., 2005. Effect of copper exposure during embryonic development on chemosensory function of juvenile fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Ecotox. Environ. Safety* 61, 1-6.
- Clerici W.J., Hensley K., DiMartino D.L., Butterfield D.A., 1996. Direct detection of ototoxicant-induced reactive oxygen species generation in cochlear explants. *Hearing Res.* 98, 116-124.
- Collazo A., Fraser S.E., Mabee P.M., 1994. A dual embryonic origin for vertebrate mechanoreceptors. *Science* 264(5157), 426-30.
- Corey D.P., Garcia-Anoveros J., Holt J.R., Kwan K.Y., Lin S.Y., Vollrath M.A., Amalfitano A., Cheung E.L., Derfler B.H., Duggan A., Geleoc G.S., Gray P.A., Hoffman M.P., Rehm H.L., Tamasauskas D., Zhang D.S., 2004. TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells. *Nature* 432, 723-730.

Cuthbert J. A., 1995. *J. Invest. Med.* 43, 323–336.

Cyr D.M., Neupert W., 1996. Roles of hsp70 in protein translocation across membranes of organelles. In: U. Feige, R.I. Morimoto, I. Yahara and B. Polla, Editors, *Stress-inducible Cellular Responses*, Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, 25–40.

Chan P.K., Cheng S.H., 2003. Cadmium-induced ectopic apoptosis in zebrafish embryos. *Arch. Toxicol.* 77, 69-79.

Chan K.M., Ku L.L., Chan P.C., Cheuk W.K., 2006. Metallothionein gene expression in zebrafish embryo-larvae and ZFL cell-line exposed to heavy metal ions. *Mar. Environ. Res.* 62 Suppl:S83-7.

Chen W.Y., John J.A., Lin C.H., Chang C.Y. 2002. Molecular cloning and developmental expression of zinc finger transcription factor MTF-1 gene in zebrafish, *Danio rerio*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291(4), 798-805.

Chen W.Y., John J.A., Lin C.H., Lin H.F., Wu S.C., Lin C.H., Chang C.Y. 2004 Expression of metallothionein gene during embryonic and early larval development in zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 69(3), 215-27.

Chiang H.L., Terlecky S.R., Plant C.P., Dice J.F., 1989. A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins, *Science* 246, 382–385.

Chung K.S., 1978. Efectos letales de cadmio, cromo, cobre y zinc en *Nerita fulgurans*. *Bol. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente, Venezuela*, 17(1-2): 31-33.

D'Agostino A., Finney C. 1974. The effect of copper and cadmium on the development of *Tigriopus japonicus*. In: F.J. Vernberg and W.B. Vernberg (eds). *Academic Press. Pollution and Physiology of Marine Organisms*, 445-463.

Dalton T.P., Solis W.A., Nebert D.W., Carvan M.J. 3rd., 2000. Characterization of the MTF-1 transcription factor from zebrafish and trout cells. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 126(3), 325-35.

Dave G., Xiu R.Q., 1991. Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21, 126-34.

De S.K., McMaster M.T., Andrews G.K., 1990. Endotoxin induction of murine metallothionein gene expression. *J. Biol. Chem.* 265, 15267–15274.

Di Toro D.M., Allen H.E., Bergman H.L., Meyer J.S., Paquin P.R., Santore R.C., 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environ Toxicol Chem.* 20(10), 2383-96.

Durnam D.M., Palmiter R.D., 1981. Transcriptional regulation of the mouse metallothionein-I gene by heavy metals. *J. Biol. Chem.* 256, 5712–5716.

Ellis P., Fagan B.M., Magness S.T., Hutton S., Taranova O., Hayashi S., McMahon A., Rao M., Pevny L., 2004. SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells

derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev. Neurosci.* 26(2-4), 148-65.

Enrnest S., Rauch G.J., Haffter P., Geisler R., Petit C., Nicolson T., 2000. Mariner is defective in myosin VIIA: a zebrafish model for human hereditary deafness. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2189-2196.

Fenske C., Daeschlein G., Gunther B., Knauer A., Rudolph P., Schwahn C., Adrian V., von Woedtke T., Rossberg H., Julich W.D., Kramer A., 2006. Comparison of different biological methods for the assessment of ecotoxicological risks. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 209(3), 275-84.

Forge A., Li L., 2000. Apoptotic death of hair cells in mammalian vestibular sensory epithelia. *Hearing Res.* 139, 97-115.

Forge A., Schacht J., 2000. Aminoglycoside antibiotics. *Audiol. Neurootol.* 5, 3-22.

Gale J.E., Marcotti W., Kennedy H.J., Kros C.J., Richardson G.P., 2001. FM1-43 dye behaves as a permeant blocker of the hair-cell mechanotransducer channel. *J. Neurosci.* 21, 7013-7025.

Gaetke L.M., Chow C.K., 2003. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology.* 189(1-2), 147-63. Review.

Gangstad E.O., 1986. Freshwater vegetation management. Fresno, CA: Thomson Publications.

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

Gravenmier J.J., Johnston D.W., Santore R.C., Arnold W.R., 2005. Acute toxicity of copper to the threespine stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Environ. Toxicol.* 20(2), 150-9.

Griesinger, C.B., Richards, C.D., Ashmore, J.F., 2002. Fm1-43 reveals membrane recycling in adult inner hair cells of the mammalian cochlea. *J. Neurosci.* 22, 3939-3952.

Grosell M., McDonald M.D., Walsh P.J., Wood, C.M., 2004. Effects of prolonged copper exposure in the marine gulf toadfish (*Opsanus beta*) II: copper accumulation, drinking rate and Na⁺/K⁺-ATPase activity in osmoregulatory tissues. *Aquat. Toxicol.* 68, 263-75.

Grosvik B.E., Goksoyr A., 1996. Biomarker protein expression in primary cultures of salmon (*Salmo salar* L.) hepatocytes exposed to environmental pollutants, *Biomarkers* 1, 45-53.

Halloran M.C., Sato-Maeda M., Warren JT, Su F, Lele Z, Krone PH, Kuwada JY, Shoji W., 2000. Laser-induced gene expression in specific cells of transgenic zebrafish. *Development.* 127(9), 1953-60.

Harris, J.A., Cheng, A.G., Cunningham, L., MacDonald, G., Raible, D.W., Rubel, E.W., 2003. Neomycin-induced hair cell death and rapid regeneration in the lateral line of zebrafish (*Danio rerio*). *JARO* 4, 219-234.

Hen Chow, E.S., Cheng, S.H., 2003. Cadmium affects muscle type development and axon growth in zebrafish embryonic somitogenesis. *Toxicol. Sci.* 73, 149-59.

Herkovitz, J., Cardellini, P., Pavaniti, C., Perez-Coll, C.S., 1997. Susceptibility of early life stages of *Xenopus laevis* to cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 16 (2), 312-316.

Imbra, R.J. and Karin, M., 1987. Metallothionein gene expression is regulated by serum factors and activators of protein kinase C. *Mol. Cell Biol.* 7, 1358-1363.

Jaattela M., 1999. Heat shock proteins as cellular lifeguards, *Ann. Med.* 31, 261-271.

Jezierska B., Slominska I., 1997. The effect of copper on common carp (*Cyprinus carpio*) during embryonic and postembryonic development, *Pol. Arch. Hydrobiol.* 44, 261-272.

Kamunde, C. N., Pyle, G. G., McDonald, D. G., and Wood, C. M., 2003. Influence of dietary sodium on waterborne copper toxicity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 342-50.

Karin, M., Imbra, R.J., Heguy, A. and Wong, G., 1985. Interleukin 1 regulates human metallothionein gene expression. *Mol. Cell Biol.* 5, 2866-2869.

Karin, M., Herschman, H.R., 1979. Dexamethasone stimulation of metallothionein synthesis in HeLa cell cultures. *Science* 204,176-177.

Klaassen, C.D., Liu, J., Choudhuri, S., 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 267-294.

Korz S., Emelyanov A., Korzh V., 2001. Developmental analysis of ceruloplasmin gene and liver formation in zebrafish. *Mech. Dev.* 103(1-2), 137-9.

Kuo, Y.M., Zhou, B., Cosco, D., Gitschier, J., 2001. The copper transporter CTR1 provides an essential function in mammalian embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6836- 6841.

Lee J., Pena M.M., Nose Y., Thiele D.J., 2002, Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1. *J Biol Chem.* 277(6), 4380-7.

Lee, J., Prohaska, J., Thiele, D., 2001. Essential role for mammalian copper transporter Ctr1 in copper homeostasis and embryonic development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6842- 6847.

Li W.H., Chan P.C., Chan K.M., 2004. Metal uptake in zebrafish embryo-larvae exposed to metal-contaminated sediments. *Mar. Environ. Res.* 58(2-5), 829-32.

Lim C.M., Cater M.A., Mercer J.F., La Fontaine S., 2006. Copper-dependent interaction of glutaredoxin with the N termini of the copper-ATPases (ATP7A and ATP7B) defective in Menkes and Wilson diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 348(2), 428-36.

Linder, M. C., 1991. *Biochemistry of Copper* (Plenum, New York). 25.

Llanos R.M., Mercer J.F., 2002. The molecular basis of copper homeostasis and copper-related disorders, *DNA Cell Biol.* 21, 259–270.

Mackenzie, N.C., Brito, M., Reyes, A.E., Allende, M.L., 2004. Cloning, expression pattern and essentiality of the high-affinity copper transporter 1 (*ctr1*) gene in zebrafish. *Gene* 328, 113–120.

Marr, J.C.A., J.A. Hansen, J.S. Meyer, D. Cacela, T. Podrabsky, J. Lipton, and H.L. Bergman., 1998. Toxicity of cobalt and copper to rainbow trout: Application of a mechanistic model for predicting survival. *Aquatic Toxicology* 43, 225-238.

Marvin ME, Williams PH, Cashmore AM., 2003. The *Candida albicans* CTR1 gene encodes a functional copper transporter. *Microbiology.* 149(Pt 6), 1461-74.

Mckim, J.M., 1985. Early life stage toxicity tests. In: *Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Eds, Rand, G.M. and Petrocelli, S.R. Hemisphere Publishers Corporation, New York. 58-95.

Mendelsohn B.A., Yin C., Johnson S.L., Wilm T.P., Solnica-Krezel L., Gitlin J.D., 2006. *Atp7a* determines a hierarchy of copper metabolism essential for notochord development. *Cell. Metab.* 4(2), 155-62.

Meyers, J.R., MacDonald, R.B., Duggan, A., Lenzi, D., Standaert, D.G., Corwin, J.T., Corey, D.P., 2003. Lighting up the senses: FM1-43 loading of sensory cells through nonselective ion channels. *J. Neurosci.* 23, 4054–4065.

Murakami, S.L., Cunningham, L.L., Werner, L.A., Bauer, E., Pujol, R., Raible, D.W., Rubel, E.W., 2003. Developmental differences in susceptibility to neomycin-induced hair cell death in the lateral line neuromasts of zebrafish (*Danio rerio*). *Hearing Res.* 186, 47–56.

Nakashima, T., Teranishi, M., Hibi, T., Kobayashi, M., Umemura, M., 2000. Vestibular and cochlear toxicity of aminoglycosides – a review. *Acta Otolaryngol.* 120, 904–911.

Nishikawa, S., Sasaki, F., 1996. Internalization of styryl dye FM1-43 in the hair cells of lateral line organs in *Xenopus* larvae. *J. Histochem. Cytochem.* 44, 733–741.

Niyogi S, Wood CM., 2004. Biotic ligand model, a flexible tool for developing site-specific water quality guidelines for metals. *Environ. Sci. Technol.* 38(23), 6177-92. Review.

Palmer, F. B., Butler, C. A., Timperley, M. H., Evans, Clive W., 1998. Toxicity to embryo and adult zebrafish of copper complexes with two malonic acids as models for dissolved organic matter. *Environ. Toxicol. Chem.* 17(8), 1538-1545.

Palmiter, R.D., 1998. The elusive function of metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 8428–8430.

Parsell D.A., Lindquist S., 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins, *Annu. Rev. Genet.* 27, 437–496.

Peña MM, Lee J, Thiele DJ., 1999. A delicate balance: homeostatic control of copper uptake and distribution. *J Nutr.* 129(7), 1251-60. Review.

Peñas M.M., Azparren G., Dominguez A., Sommer H., Ramirez L., Pisabarro A.G., 2005. Identification and functional characterisation of *ctr1*, a *Pleurotus ostreatus* gene coding for a copper transporter. *Mol. Genet. Genomics.* 274(4), 402-9.

Petersen, G.I., Kristensen, P., 1998. Bioaccumulation of lipophilic substances in fish early life stages. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 17 (7), 1385-1395.

Pimentel, D., 1971. Ecological effects of pesticides on nontarget species. Executive Office of the President's Office of Science and Technology. Washington, DC: U. S. Government Printing Office.

Prohaska, J.R., Bailey, W.R., Gross, A.M., Korte, J.J., 1990. *J. Nutr. Biochem.* 1, 149-154.

Puig, S., Lee, J., Lau, M., Thiele, D., 2002. Biochemical and genetical analyses of yeast and human high affinity copper transporters suggest a conserved mechanism for copper uptake. *J. Biol. Chem.*, Vol. 277, Issue 29, 26021-26030.

Raible, D.W., Kruse, G.J., 2000. Organization of the lateral line system in embryonic zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 421, 189-198.

Ravi, R., Somani, S.M., Rybak, L.P., 1995. Mechanism of cisplatin ototoxicity: antioxidant system. *Pharmacol. Toxicol.* 76, 386-394.

Redpath, J.K. 1985. Growth inhibition and recovery in mussels (*Mytilus edulis*) exposed to low copper concentrations. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 158, 233-247.

Richardson, G.P., Forge, A., Kros, C.J., Fleming, J., Brown, S.D., Steel, K.P., 1997. Myosin VIIA is required for aminoglycoside accumulation in cochlear hair cells. *J. Neurosci.* 17, 9506-9519.

Ribeyre, F., Amiard-Triquet, C., Boudou, A., Amiard, J. C., 1995. Experimental study of interactions between five trace elements--Cu, Ag, Se, Zn, and Hg--toward their bioaccumulation by fish (*Brachydanio rerio*) from the direct route. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 32, 1-11.

Rougier, F., Menudier, A., Bosgiraud, C., Nicolas, J.A., 1996. Copper and zinc exposure of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan): effects in experimental *Listeria* infection. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 34, 134-40.

Sanders B.M., Nguyen J., Martin L.S., Howe S.R., Coventry S., 1995. Induction and subcellular localization of two major stress proteins in response to copper in the fathead minnow *Pimephales promelas*, *Comp. Biochem. Physiol.* 112, 335-343.

Scudder B.C., Carter J.L., Leland H.V., 1988. Effect of copper on development of the fathead minnow, *Pimephales promelas* Rafinesque, *Aquatic. Toxicol.* 12, 107-124

Sapède, D., Gompel, N., Dambly-Chaudie`re, C., Ghysen, A., 2001. Cell migration in the post-embryonic development of the fish lateral line. *Development* 129, 605-615.

Schaeffer S.F, Raviola E., 1978. Membrane recycling in the cone cell endings of the turtle retina. *J. Cell Biol.* 79(3), 802-25.

Schweitzer, V.G., 1993. Cisplatin-induced ototoxicity: the effect of pigmentation and inhibitory agents. *Laryngoscope* 103 (Suppl.), 59.

Seiler, C., Nicolson, T., 1999. Defective calmodulin-dependent rapid apical endocytosis in zebrafish sensory hair cell mutants. *J. Neurobiol.* 41, 424-434.

Sharp, P.A., 2003. Ctr1 and its role in body copper homeostasis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 288- 291.

Smith L., Du Preez H.H., STEY, G.J., 1998. Influence of natural silt on the survival of *Oreochromis mossambicus* yolk sac larvae. *Koedoe.* 41(1), 57-62.

Soller J., Stephenson J., Olivieri K., Downing J., Olivieri A.W., 2005. Evaluation of seasonal scale first flush pollutant loading and implications for urban runoff management. *J. Environ. Manage.* 76(4), 309-18.

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

Viljoen A., 1999. Effects of zinc and copper on the post ovulatory reproductive potential of the sharptooth catfish *Clarias gariepinus*. M.Sc-thesis, Rand Afrikaans University, South Africa.

Wagner M., Hermanns I., Bittinger F., Kirkpatrick C.J., 1999. Induction of stress proteins in human endothelial cells by heavy metal ions and heat shock, *Am. J. Physiol.* 277, L1026-L1033.

Whitley D., Goldberg S.P., Jordan W.D., 1999. Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones, *J. Vasc. Surg.* 29, 748-751.

Williams, J.A., Holder, N., 2000. Cell turnover in neuromasts of zebrafish larvae. *Hearing Res.* 143, 171-181.

Winge DR. 1998. Copper-regulatory domain involved in gene expression. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 58, 165-95. Review.

Witeska M., Jezierska B., Chaber J., 1995. The influence of cadmium on common carp embryos and larvae. *Aquaculture.* 129, 129-132.

Yan C.H., Chan K.M., 2004. Cloning of zebrafish metallothionein gene and characterization of its gene promoter region in HepG2 cell line. *Biochim. Biophys. Acta.* 1679(1), 47-58.

Zhou B., Gitschier J., 1997. hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94(14), 7481-6.

Zhou H, Thiele DJ., 2001. Identification of a novel high affinity copper transport complex in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 276(23), 20529-35.