

UCH-FC
DOC-BHON
V732
C.A

Est. de Grado 2/6/11

Regeneración de los axones de la línea lateral del pez cebra

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De



Doctor en Ciencias con Mención en Biología Molecular, Celular y Neurociencias

Facultad De Ciencias

Por

Rosario Margarita Villegas Silva

Junio 2011

Director de Tesis Dr: Miguel Allende Connelly

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

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

ROSARIO MARGARITA VILLEGAS SILVA

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 20 de Abril del 2011.

Director de Tesis:

Dr. Miguel Allende

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Miguel Concha

Dr. Christian González

Dra. Jimena Sierralta

Dra. Kathleen Whitlock

Handwritten signatures in blue ink. The signatures are written over the dotted lines of the names listed on the left. The signatures are: Miguel Concha, Christian González, Jimena Sierralta, and Kathleen Whitlock.



A mi familia con amor...



Nací el 20 de agosto de 1980 en Viña del Mar, me esperaban mis padres Nancy y René y mi hermana mayor Carolina. Luego de un par de años nos mudamos a Santiago y llegaron mis hermanas menores Rocío y Francisca. Estudie en el Colegio Teresiano Enrique de Ossó, durante la educación pre-básica, básica y media. Después de unas vueltas llegue a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile donde curse el pregrado en Biología. Al finalizar entre al doctorado en Biología Molecular ,Celular y Neurociencias y realicé mi tesis doctoral en el laboratorio del doctor Miguel Allende.

Agradezco a todos los que me acompañaron durante esta etapa. En especial...

A los que fueron mas que profes en el camino: Julio Alcayaga, Miguel Allende y Juan Fernández.

A mi tutor Miguel, quien es un gran científico, jefe y persona.

Al zebralab querido que fue mi familia por 5 años.

Al doctor Alvaro Sagasti y su lab en UCLA por recibirme como una más del team y permitirme realizar milquinientos experimentos.

A mis zebralolas adoradas: Tami, Merri, Javi y Pame

A los eternos del lab que hacen que todo se mueva: Catalina, Floro y Juanito.

A los grandes científicos y amigos que conocí en el camino: Natalia Mena, Fernando Ortiz y Leonardo Valdivia.

A mis amigos de la vida: Claudia, Fernanda, Verónica y Sergio.

A mi compañero durante gran parte de esta etapa, Fernando, con quien compartí hermosos momentos.

A mi familia: Rene, Nancy Morta, Chio y Fran, por todo el amor y apoyo que han hecho mi vida hermosa y a quienes dedico este trabajo.

Gracias!

Índice de contenido



Resumen	1
Abstract	3
1. INTRODUCCION.....	5
1.1 Tipos de degeneración axonal.....	6
1.2 Degeneración Walleriana (WD)	8
1.2.1 Degeneración tipo WD	10
1.2.2 El gen y proteína <i>WldS</i>	12
1.2.3 Células de Schwann en la WD.....	14
1.2.4 Participación de los macrófagos en la WD	15
1.3 Regeneración axonal post daño	17
1.4 Ventajas del pez cebra	22
1.4.1 Sistema mecanosensorial de la línea lateral	24
1.5 Planteamiento del problema	29
1.6 Hipótesis	31
1.7 Objetivo general.....	31
1.8 Objetivos Específicos	31
2. MATERIALES Y METODOS	32
2.1 Material biológico.....	32
2.2 Reactivos.....	33
2.3 Morfolinos antisentido	33
2.4 Microinyección de embriones	34
2.5 Transformación de bacterias competentes	34



2.6 Axotomía con un microscopio de 2 fotones y captura de imágenes de confocal <i>time-lapse in vivo</i>	35
2.7 Adición de inhibidor AG1478 y cobre	35
2.8 Análisis morfológico y cuantificación de los datos	35
2.9 Estadística y análisis	36
3. RESULTADOS	37
3.1 Objetivo 1a. Establecer un protocolo de axotomía del nervio de la LLP reproducible, para caracterizar los procesos de degeneración y regeneración del nervio de la línea lateral post corte	37
3.2 Objetivo 1.b. Determinar el destino de los neuromastos y, en particular, de las células ciliadas, luego de su denervación	49
3.3 Objetivo 1.c. Estudiar el patrón de reinervación luego de dañar el nervio	52
3.4 Objetivo 2.a. Estudiar el patrón de reinervación al cortar el nervio y eliminar las células ciliadas	55
3.5 Objetivo 3. Evaluar la función de factores candidatos a participar en la regeneración axonal post corte	59
4. DISCUSIÓN	62
4.1 Ventajas del estudio de la degeneración y regeneración axonal en la LLP	65
4.2 Cuantificación y comparación de la fase de fragmentación de la WD... ..	66
4.3 Eliminación de los fragmentos por macrófagos	68
4.4 Participación de las células de Schwann en la regeneración	69
4.5 Participación de las células ciliadas en la reinervación	70
4.6 Comparación de la regeneración entre neuronas de la LLP y del ganglio de la raíz dorsal.....	72
4.7 Sobreexpresión de <i>Wld^S</i> en los axones de la LLP.....	73
4.8 Relevancia clínica de este estudio	73
4.8.1 Sordera	73

4.8.2 Enfermedades neurodegenerativas	74
4.8.3. Regeneración axonal posterior al trauma.....	75
5. CONCLUSIONES.....	76
BIBLIOGRAFÍA.....	77



Indice de figuras



Figura 1. Distintos tipos de degeneración axonal.....	7
Figura 2. Degeneración axonal aguda AAD.....	9
Figura 3. Degeneración Walleriana en axones silvestres y protección de la ésta en axones <i>Wld^S</i>	11
Figura 4. Protección axonal mediada por <i>Wld^S</i> , dominios de <i>Wld^S</i> , y moléculas Nmnat.....	13
Figura 5. Inmunomodulación hipotética del proceso de degeneración y regeneración post lesión axonal en un nervio periférico.....	16
Figura 6. Comparación de la WD en el SNP y el SNC.....	17
Figura 7. Regeneración axonal en los nervios de la DRG.....	22
Figura 8. Células de Schwann en la regeneración.....	23
Figura 9. Línea lateral del pez cebra a los 3 dpf.....	26
Figura 10. Pez cebra transgénico HGn39D expresa GFP en las neuronas aferentes de la LLP.....	27
Figura 11. Desarrollo de la línea lateral posterior en el pez cebra.....	28
Figura 12. AAD y Degeneración Walleriana.....	39
Figura 13. WD es simultánea en el nervio de la LLP.....	40
Figura 14. Cuantificación y comparación de las fases de la WD.....	41
Figura 15. Leucocitos en la fase en la WD.....	43
Figura 16. Cuantificación y comparación del contacto de leucocitos en presencia y ausencia de glía.....	44
Figura 17. Esquema del proceso de cuantificación de los fragmentos y del área de la zona distal a la axotomía.....	45



Figura 18. Cuantificación y comparación del número de fragmentos axonales durante la WD, con distintos tratamientos.....	49
Figura 19. Diferenciación de células ciliadas en ausencia de inervación.....	50
Figura 20. Regeneración de células ciliadas en ausencia de inervación.....	51
Figura 21. Cuantificación de células ciliadas durante la WD.....	52
Figura 22. Regeneración axonal post lesión.....	54
Figura 23. Regeneración axonal en ausencia de células de Schwann	55
Figura 24. Regeneración axonal en ausencia de células ciliadas.....	56
Figura 25. Comparación de la velocidad de regeneración axonal con distintos tratamientos	58
Figura 26. Cuantificación y comparación del número de axones fuera del área del miosepto con 3 diferentes tratamientos	59
Figura 27. Morfantes BDNF post axotomía	61

Índice de tablas



Tabla 1. Nuevas axotomías láser y paradigmas de regeneración	19
Tabla 2. Lista de los morfollnos utilizados en los ensayos de regeneración post corte <i>in vivo</i>	34
Tabla 3. Cuantificación de los leucocitos que hacen contacto con el nervio de la LLP, en larvas controles y en ausencia de glía.....	44
Tabla 4. Cuantificación fragmentos axonales durante la WD.....	46
Tabla 5. Resultados análisis ANOVA de dos vías	47
Tabla 6. Resultados ajuste de curva gaussiana.....	48

Lista de abreviaturas



AAD	Degeneración axonal aguda
AMP	Adenosín monofosfato
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
cAMP	AMP
CNTF	Factor neurotrófico ciliar
dpf	Días post fertilización
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
GDC	Desintegración granular del citoesqueleto
GDNF	Factor neurotrófico derivado de glia
GRD	Ganglio de la raíz dorsal
hpf	Horas post-fertilización
KO	<i>Knock out</i>
LIF	Factor inhibidor de la leucemia
LL	Línea lateral
LLA	Línea lateral anterior
LLP	Línea lateral anterior
MAG	Glicoproteína asociada a la mielina
mRNA	RNA mensajero
NAD+	Nicotinamida adenina dinucleótido
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NGR-p75	Complejo receptor de Nogo
Nmnat1	Nicotinamida mononucleótido adeniltransferasa 1
NT3	Neurotrofina 3
p75 NTR	Receptor neurotrófico
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasas
PKA	Proteína quinasa A

RNA	Ácido ribonucleico
ROCK	Quinasa asociada a Rho
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Sistema nervioso periférico
Ube4b	Factor de conjugación a la Ubiquitina e4b
Ufd	Vía de degradación-fusión de la Ubiquitina
VSCC	Canales de calcio voltaje-sensibles
WD	Degeneración Walleriana
Wld ^S	Degeneración Walleriana lenta
Wt	<i>Wild type</i>



RESUMEN



La degeneración axonal es un fenómeno observado tanto en nervios lesionados, como en diversas enfermedades neurodegenerativas. Esta degeneración es distinta a la del cuerpo celular y, frecuentemente, precede o está asociada a la aparición de los síntomas de la enfermedad. Un proceso complementario a este fenómeno es la regeneración axonal. En invertebrados –y algunos vertebrados- se ha descrito el proceso de regeneración axonal inmediatamente después de la degeneración de los nervios de diversas neuronas del sistema nervioso periférico (SNP). Sin embargo, poco se conoce acerca de fenómenos regenerativos en el sistema nervioso central, y por lo tanto describir los factores que favorecen la regeneración axonal en el SNP puede entregar herramientas para estudiar este proceso a nivel central.

Existe una gran cantidad de estudios en modelos de degeneración y regeneración *in vitro*. Dado que el objetivo de éstos es determinar mecanismos que puedan aplicarse en terapias contra enfermedades neurodegenerativas, se hace crítico describir estos eventos *in vivo*.

La línea lateral posterior (LLP) del pez cebra es un sistema mecanosensorial ideal para estos fines. La LLP se desarrolla en la superficie del pez y en un período corto de tiempo, de ésta manera el estudio de este sistema ofrece una excelente oportunidad para realizar un análisis detallado de la degeneración, y la posterior regeneración axonal *in vivo*. Debido a la similitud funcional y estructural entre las células ciliadas del oído interno de vertebrados y las de la LLP, se ha propuesto que el desarrollo de

ambos tipos celulares se basa en mecanismos similares. La diferencia más importante entre las células ciliadas de mamíferos y peces, es la capacidad de regeneración de éstas en teleósteos, como el pez cebra. Esta incapacidad de regeneración en mamíferos es una de las principales causas de sordera. Varios estudios han tratado de diferenciar o implantar células ciliadas en animales sordos, pero éstas no pueden sentir estímulos si no están inervadas. Así, la relación entre la célula ciliada y su neurona sensorial es esencial para el correcto funcionamiento del sistema, y por lo tanto es necesario estudiar el posible mecanismo de regeneración del nervio y la reinervación de su célula blanco.

En esta tesis se implementó una metodología de visualización *in vivo* de los procesos de degeneración y regeneración de los axones del nervio de la LLP del pez cebra, mediante el uso de axotomía láser 2 fotones y microscopía confocal *time lapse*. Se caracterizaron los procesos de degeneración y regeneración axonal del sistema nervioso periférico del modelo vertebrado pez cebra. Además, se analizó y se ajustó a un modelo el fenómeno de degeneración axonal posterior al daño. Finalmente, se determinó que la participación de las células de Schwann es esencial para el proceso de guía axonal durante la regeneración, mientras que la actividad de los macrófagos – fagocitando los fragmentos axonales- es requerida una vez ocurrida la degeneración.

ABSTRACT

Axonal degeneration is a phenomenon observed both in injured nerves, as in several neurodegenerative diseases. This degeneration is distinct from that occurring in the cell body and often precedes or is associated with the onset of symptoms of the disease, a fact that becomes important in the clinical application of their study. A complementary process is axonal regeneration. In invertebrates, -and some vertebrates- the process of axonal regeneration immediately after the degeneration of nerves has been described in different neurons of the peripheral nervous system. For this reason, it is relevant to describe those factors that favor peripheral nervous system axonal regeneration, to subsequently confirm these findings in the central nervous system. There are several studies of degeneration and regeneration *in vitro*. However, since their aim is to identify mechanisms that can be applied in treatment of neurodegenerative diseases, it is critical to describe these events *in vivo*. The posterior lateral line of zebrafish is a mechanosensory system ideal for this purpose. As the posterior lateral line develops on the surface of the fish and in a short period of time, the study of this system offers an excellent opportunity for a detailed analysis of degeneration and subsequent axonal regeneration *in vivo*. Due to the functional and structural similarity between the hair cells of the inner ear of vertebrates and those of posterior lateral line it has been suggested that the development of both cell types is based on similar mechanisms. The most important difference between hair cells of mammals and fishes is the regenerative capacity of these in teleosts. This failure of regeneration in mammals is a major cause of deafness. Several studies have attempted

to differentiate or implant hair cells in deaf animals, but they cannot sense stimuli if they are not innervated. In this way, it becomes essential to study the relationship between the hair cell and sensory neuron, the possible mechanism of nerve regeneration and re-innervation of the target cell. In this work I implemented a methodology for *in vivo* visualization of the processes of degeneration and regeneration of posterior lateral line axons of zebrafish, using 2-photon laser axotomy and time-lapse confocal microscopy. I characterized axonal degeneration and regeneration of posterior lateral line axons in zebrafish. In addition, I analyzed and created a model of the phenomenon of post-injury axonal degeneration. We determined the essential participation in axonal guidance of Schwann cells during regeneration and macrophages in the phagocytosis of the fragments after axonal degeneration.

1. INTRODUCCIÓN

La degeneración axonal corresponde a los cambios producidos en los axones debido a un corte o lesión que los desconecta del soma neuronal. Este es un proceso controlado y altamente complejo. Los mecanismos tempranos de degeneración son específicos para cada tipo celular, sin embargo, los procesos más tardíos tienen en común el desensamblaje de microtúbulos, la inflamación y fragmentación axonal, y finalmente la eliminación de los segmentos remanentes por fagocitos reclutados localmente. La estricta regulación de la degeneración axonal implica un complejo proceso activo, a diferencia de el proceso de muerte celular pasivo. Este fenómeno biológico influye de manera importante en el desarrollo del sistema nervioso, está involucrado en enfermedades neurodegenerativas, en lesiones mecánicas y metabólicas de los nervios (Raff y col. 2002, Saxena y Caroni 2007, Coleman y Freeman, 2010).

El evento crucial en la degeneración del segmento distal del axón lesionado es la desintegración granular del citoesqueleto y del axoplasma. La lesión estructural del axón se correlaciona con la pérdida de la capacidad para generar y conducir el potencial de acción (Oblinger y Lasek, 1988). Esta desintegración es gatillada por un aumento en la concentración de calcio axoplásmico (Schlaepfer, 1977). Se ha descrito que el aumento del calcio libre intra-axonal se relaciona con la patogenia del daño axonal en trauma (George y col. 1995, Siman y col. 1999) e isquemia (Stys y col. 1991, Fern y col. 1995). Estos estudios sugieren la participación de los canales de calcio voltaje-sensibles y del canal intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en su fisiopatología.

En el segmento distal de la lesión, la pérdida del contacto de las células de Schwann con los axones produce una disminución de los niveles de mRNA de proteínas componentes de la mielina, producidos por la glía. Las células de Schwann se desdiferencian y proliferan.

1.1 Tipos de degeneración axonal

Desde el punto de vista de las enfermedades neurodegenerativas, la forma mas relevante de degeneración axonal ocurre por un proceso conocido como *dying back*, en el cual el axón de una neurona “enferma” degenera progresivamente, demorando semanas o meses, comenzando desde la zona distal y continuando hacia la proximal con respecto al soma (figura 1B; Cavanagh y col.1964, Schaumburg y col. 1974).

Esta es la patología más común observada en las enfermedades que afectan nervios periféricos causadas por daños tóxicos, metabólicos e infecciosos. Son ejemplos de éstas las polineuropatías asociadas a diabetes, alcoholismo y SIDA (Sima y col. 1983, Walsh y col.1970, de la Monte y col.1988). Últimamente se ha propuesto que este tipo de degeneración axonal es la causa principal o contribuye de forma importante a la progresión de enfermedades neurodegenerativas del sistema nervioso central (SNC), tales como Alzheimer y Parkinson (Raff y col. 2002, Conforti y col. 2007, Coleman y Freeman, 2010). En diversas condiciones neurodegenerativas, la degeneración axonal y la del cuerpo celular (muerte celular neuronal y apoptosis) son eventos simultáneos y la relación causal entre estos eventos y los síntomas de la enfermedad no están del todo claros (Raff y col. 2002, Conforti y col. 2007).

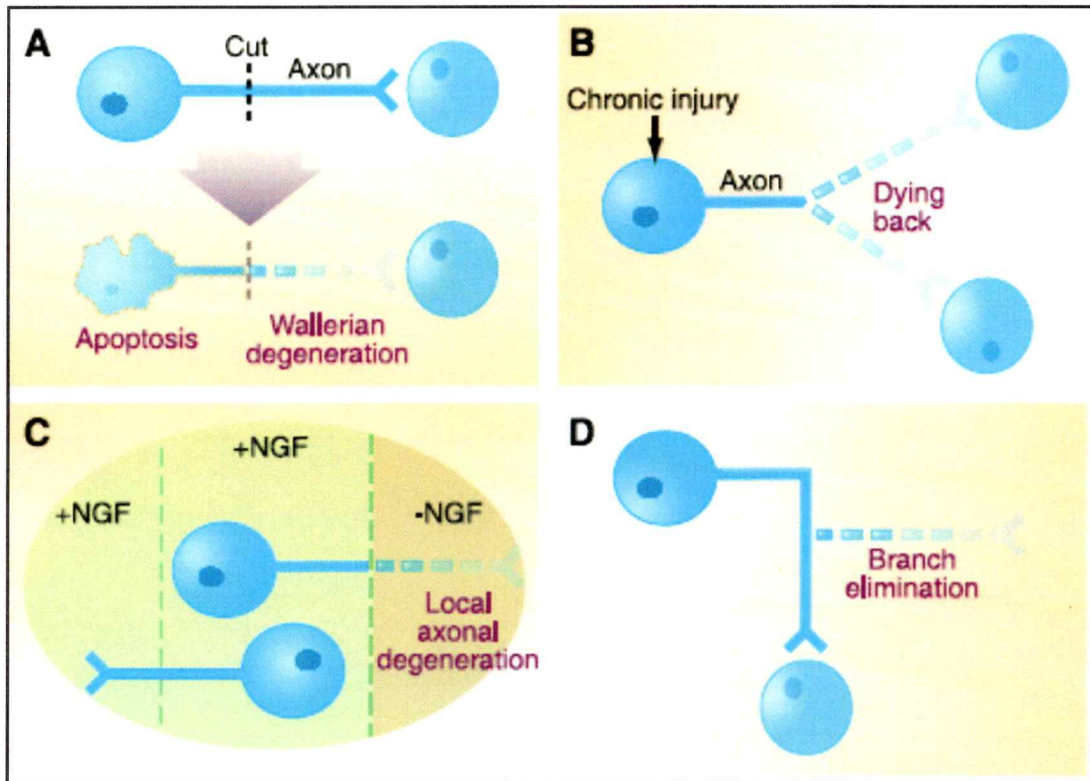


Figura 1. Distintos tipos de degeneración axonal. (A) Cuando un axón se corta, el segmento distal experimenta degeneración walleriana. Cuando el axón de una neurona en desarrollo se corta, el cuerpo celular con frecuencia experimenta apoptosis. (B) En la degeneración tipo *dying back* el árbol axonal de una neurona no saludable degenera poco a poco, empezando desde distal y progresando hacia proximal. (C) Cuando la parte distal del axón de una neurona simpática es privado localmente de NGF en una placa de cultivo de tres cámaras, ese segmento de axón específico degenera, mientras que el resto del axón y la célula sobreviven. (D) Durante el desarrollo normal, las ramas axonales incorrectas son frecuentemente eliminadas por *pruning*.

Sin embargo, la evidencia genética indica que la degeneración axonal y la muerte celular de la neurona son eventos distintos. Por ejemplo, se ha descrito que en ratones que sufren neuropatía motora progresiva, los animales mutantes desarrollan una patología en la cual los axones de las neuronas motoras degeneran por *die back*, mientras que los somas neuronales sufren apoptosis (Sagot y col. 1995). Es interesante mencionar que cuando la muerte celular es inhibida genéticamente sobreexpresando el gen anti-apoptótico *bcl-2* en las neuronas motoras, la

degeneración de los axones, el comienzo y progresión de la enfermedad, así como el estadio de muerte no muestran cambios (Sagot y col.1995). Esto sugiere que es la degeneración axonal, y no la muerte neuronal, lo que debilita y mata al animal.

También se conoce la degeneración axonal fisiológica o no patológica, la cual ocurre durante el desarrollo del sistema nervioso. Durante este período, las neuronas pierden algunas de sus ramificaciones en un proceso conocido como poda o *pruning* (figura 1D). Muchas neuronas extienden sus neuritas de manera redundante y excesiva, y algunas de estas ramificaciones son removidas selectivamente. Este proceso determina la organización final y la compleja conectividad del circuito (O'Leary y col. 1993). La ausencia de señales tróficas desde el *target* podría causar la degeneración de las neuritas como ocurre con el axón de una neurona simpática en cultivo, deprivada localmente del factor de crecimiento nervioso, NGF (figura 1C, Campenot y col. 1982, Raff y col. 2002). El *pruning* ha sido descrito durante el desarrollo del sistema nervioso tanto en vertebrados como en invertebrados (O'Leary y Koester 1993, Lee y col. 1999, Kage y col. 2005, Luo y O'Leary 2005). A partir de este tipo de degeneración -durante el desarrollo- surge la pregunta sobre cómo degenera sólo una parte de la neurona sin afectar al resto de ésta.

1.2 Degeneración Walleriana (WD)

Un ejemplo clásico de degeneración axonal es la degeneración Walleriana (Waller 1850) la cual ocurre cuando un axón es cortado. El segmento del axón que está desconectado del soma, se desintegra de manera característica y ordenada. En vertebrados, esta parte del axón puede conducir potenciales de acción por hasta 2 días

si es eléctricamente estimulado, pero luego degenera rápidamente: el retículo endoplasmático se desintegra, los neurofilamentos se degradan, las mitocondrias se hinchan y el axón se separa en fragmentos que son luego fagocitados (figura 1A; Raff y col. 2002). La WD ocurre en el sistema nervioso central y periférico frente a un trauma, accidente vascular, infección o debido a una respuesta inmune local que daña a los axones. (Raff y col. 2002, Coleman y Freeman 2010). Previo a la WD, y causada también por una lesión o corte en el axón, se ha descrito la degeneración axonal aguda (*Acute Axonal degeneration*; AAD; Kerschensteiner y col. 2005), la cual ocurre durante los primeros 30 minutos post-daño y produce la degeneración de ambos extremos adyacentes al corte (figura 2) en aproximadamente 300 μm de longitud distal y proximal al punto de corte. La AAD más que una retracción del axón cortado, podría representar el mecanismo de pérdida de los extremos dañados (Kerschensteiner y col. 2005).

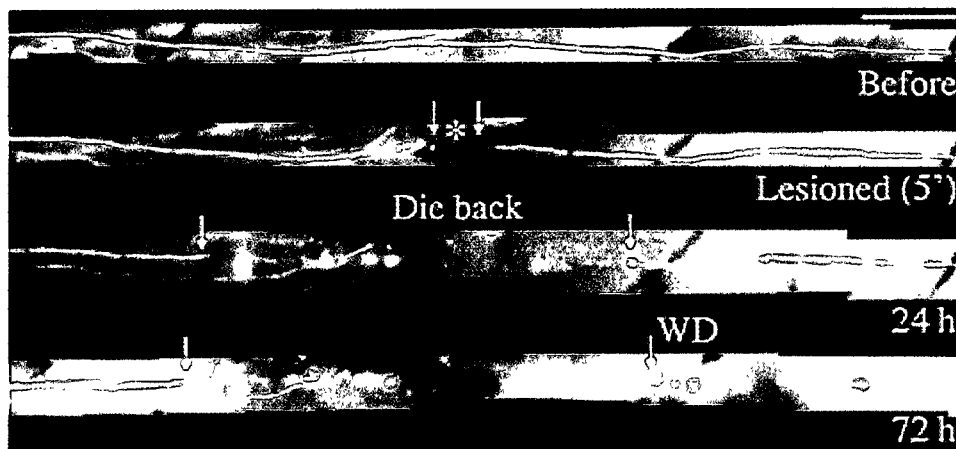


Figura 2. Degeneración axonal aguda (AAD). Cambios en un axón de la raíz del ganglio dorsal *in vivo* durante las primeras 72 horas luego de la lesión, incluyendo *die back* y WD. El asterisco muestra el sitio de lesión. Las flechas blancas los extremos axonales. Proximal esta hacia la izquierda. Escala 250 μm (Kerschensteiner y col. 2005)

En 1989 el grupo de Lunn identificó una cepa de ratones mutantes, *Wld^S* (*Wallerian degeneration Slow*) que presentaban una tasa de degeneración axonal reducida luego de un daño (figura 3; Lunn y col. 1989). En estos animales, los axones sobrevivían y mantenían sus funciones por más de 3 semanas, en lugar de unos días como se observó en los axones silvestres cortados. La capacidad de sobrevivencia adquirida de los axones dañados en los mutantes *Wld^S*, reveló que los axones degeneran activamente gatillando un programa de degeneración, y no de manera pasiva debido a la falta de apoyo trófico del cuerpo neuronal. Se demostró más tarde que el efecto protector de *Wld^S* también se extiende a los axones y las sinapsis del SNC (Ludwin y Bisby 1992, Gillingwater y col. 2006).

El uso del ratón *Wld^S* como herramienta genética para estudiar las bases de las vías de destrucción celular ha mostrado que los mecanismos neurodegenerativos presentan un alto grado de compartimentalización. A pesar de su robusto efecto sobre la degeneración axonal, *Wld^S* no muestra ningún efecto en la apoptosis del soma celular, como se observa en cultivos de neuronas simpáticas deprivadas de NGF, y en motoneuronas axotomizadas (Adalbert y col. 2006, Deckwerth y Johnson 1994). En este contexto, ningún cambio fenotípico en otro tipo celular ha sido descrito a la fecha en animales *Wld^S*. Por otro lado, la sobre-expresión de genes anti-apoptóticos como *bcl-2*, no altera la WD (Burne y col. 1996), similar a lo descrito para el tipo de degeneración *dying back*.

1.2.1 Degeneración tipo WD

Una pregunta central es si la WD es relevante desde el punto de vista de las enfermedades neurodegenerativas y de lesiones en los nervios. En base a

características morfológicas y mecanismos semejantes, se ha descrito que la degeneración tipo *dying back* es similar a la WD (*Wallerian-like degeneration*; Cavanagh y col. 1979; Griffin y col. 1996). Estudios en el SNC extienden este mecanismo a modelos de Parkinson, glaucoma, esclerosis múltiple y distrofia axonal grácil (Beirowski y col. 2008, Hasbani y O'Malley 2006, Howell y col. 2007, Kaneko y col. 2006, Mi y col. 2005, Sajadi y col. 2004).

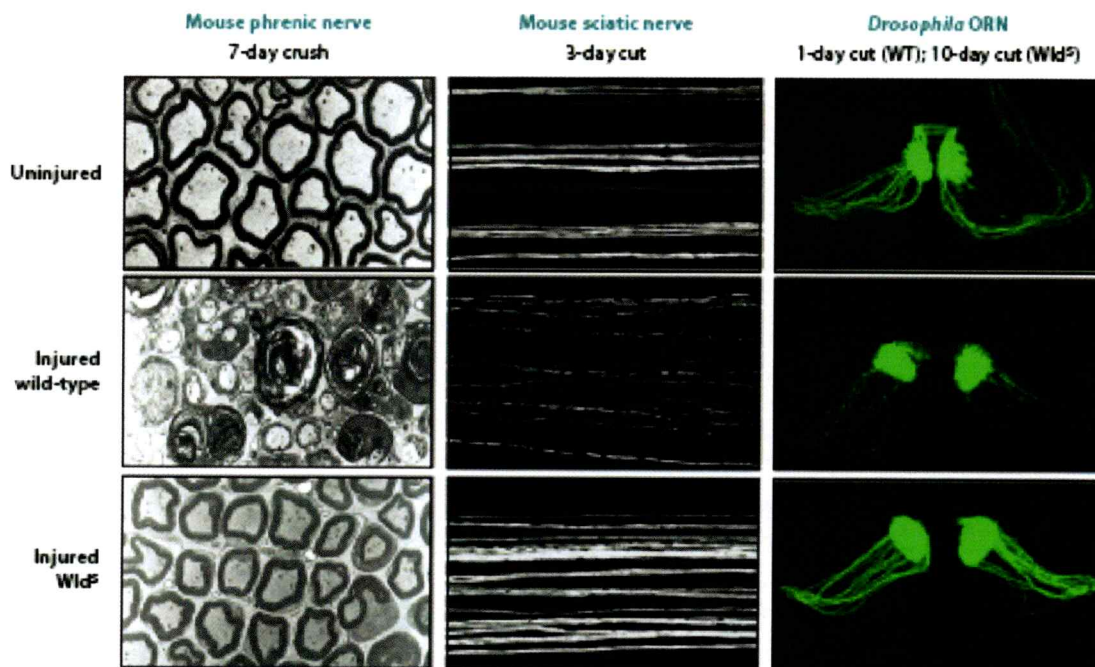


Figura 3. Degeneración Walleriana en axones silvestres y protección de ésta en axones *Wld^S*. Los axones lesionados (fila central) muestran desintegración del citoesqueleto, observado por microscopía electrónica (columna izquierda) y fragmentación observado por microscopía de fluorescencia (columna central y derecha). La integridad el citoesqueleto, las mitocondrias sin hinchazón y la continuidad del axón son preservadas en cada ejemplo (fila de abajo). Se observa la consistencia de WD y del rol protector de *Wld^S* entre ratón y *Drosophila*. ORN, neuronas receptoras olfatorias . Columna izquierda Brown y col. 1994; columna central de Conforti y col. 2007. Figura total de Coleman y Freeman 2010.

Además, el bloqueo de la síntesis proteica y la neurotoxina vincristina en cultivo primario, gatillan un tipo de degeneración similar a la WD (Gilley y Coleman 2010, Wang y col. 2000).

Por otra parte, el “corte” de un axón no es común en clínica. Las lesiones a la médula espinal y al cerebro, generalmente aplastan y estiran los axones, respectivamente, lo cual tiene como resultado la interrupción del axón horas o días después. Entonces, si bien la transección axonal es poco frecuente, la disrupción del transporte axonal es bastante común, y también aisla a los axones del soma. Estudios en el ratón *Wld^S* han determinado que el mecanismo de degeneración luego de una lesión que interrumpe el tráfico axonal son similares (Coleman y Freeman, 2010).

1.2.2 El gen y proteína *Wld^S*

El gen *Wld^S* fue mapeado al cromosoma 4 del ratón (Lyon y col. 1993), en el cual un rearrreglo genómico creó la fusión de 2 genes endógenos. Los mRNAs codifican para una proteína de fusión que esta ausente en ratones *wt* (figura 4; Coleman y col. 1998, Conforti y col. 2000). El cDNA murino de *Wld^S* retrasa la degeneración axonal en rata, mosca, pez cebra y modelos de cultivos celular (Adalbert y col. 2005, Araki y col. 2004, Hoopfer y col. 2006, Macdonald y col. 2006, Martin y col. 2010, Wang y col. 2001).

Los 285 aminoácidos del dominio C terminal contienen la secuencia completa de la proteína de la nicotinamida mononucleótido adenililtransferasa 1 (*Nmnat1*), proteína clave en la vía de rescate del NAD^+ en mamíferos. *Nmnat1* existe predominantemente en el núcleo celular (Magni y col. 2004), al igual que *Wld^S* (Marck y col. 2001).

Los 70 aminoácidos del N terminal de *Wld^S* derivan del N terminal de una Ubiquitin

ligasa tipo E4 (Ube4b o Ufd2a), que puede agregar múltiples cadenas de ubiquitina a sustratos de la vía Ufd (*Ubiquitin degradation fusion*; Hatakeyama y col. 2001, Koegl y col. 1999). Solo el 6% de la secuencia de Ube4b está presente en *Wld^S*, lo cual excluye la caja U catalítica. Por esto, lo más probable es que *Wld^S* carezca de actividad ligasa, pero mantenga la actividad de unión (Laser y col. 2006, Morreale y col. 2009). Por último, entre las secuencias de Ube4b y Nmnat1 existe una secuencia única de 18 aminoácidos generada del 5' UTR de Nmnat1 (Samsam y col. 2003). La expresión de *Wld^S* no afecta la expresión endógena de Nmnat1 y Ube4b, por lo tanto se trata de una ganancia de función.

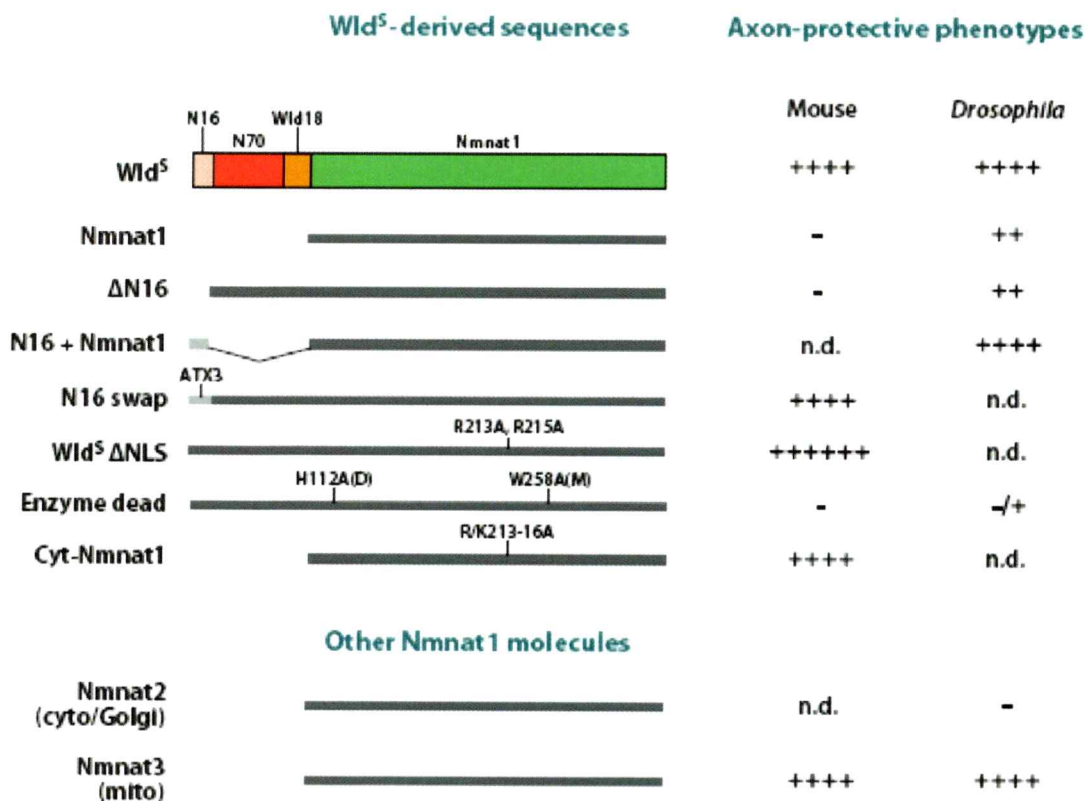


Figura 4. Protección axonal mediada por *Wld^S*, dominios de *Wld^S*, y moléculas Nmnat. El panel superior muestra constructos derivados de *Wld^S* donde dominios específicos de la proteína fueron mutados o suprimidos. El panel inferior muestra otras moléculas Nmnat presentes en ratón (Nmnat 2 y Nmnat 3). La protección de éstas tanto en ratón, como en *Drosophila* se muestra a la derecha. + significa mayor protección y - ausencia de ésta. n.d implica no determinada (Coleman y Freeman, 2010).

1.2.3 Células de Schwann en la WD

Desde las primeras observaciones de August Waller en 1850, se conoce la participación esencial de las células de Schwann en la WD, tanto en la ruptura de la vaina de mielina, como en la eliminación de los restos de ésta (figura 5 y 6). Además, las células gliales disminuyen la síntesis de lípidos mielínicos durante las primeras 12 horas post axotomía (White y col. 1989) y detienen la producción de proteínas mielínicas antes de las 48 horas (Trapp y col. 1988). La separación inicial de la vaina de mielina del axón se produce en las incisuras de Schmidt-Lanterman (Williams y Hall 1971, Ghabriel y Allt 1979). Luego esta vaina se transforma en segmentos separados completamente del soma, y se acorta para formar ovoides de mielina (Stoll y col. 1989).

Durante los primeros días post-lesión, las células de Schwann están involucradas activamente en el procesamiento de los restos de mielina. Estas células eliminan la mielina por 3 vías distintas: degradando su propia mielina, fagocitando los restos mielínicos extracelulares y presentando mielina a los macrófagos. Las células de Schwann digieren mielina en sus vacuolas intracelulares usando enzimas hidrolíticas (Holtzman y Novikoff 1965, Han y col. 1989, Hirata y col. 1999). Las células de Schwann también “bombean” restos de mielina al extracelular para que sean fagocitados por los macrófagos (Liu y col. 1995, Hirata y col. 1999). En los primeros días post daño, las células gliales eliminan mielina en ausencia de macrófagos, promoviendo la rapidez del proceso en el SNP (Perry y col. 1995). Simultáneamente, estas células liberan diversas quimio y citoquinas, algunas de las cuales son las

responsables de reclutar macrófagos al sitio del nervio en degeneración (Shamash y col. 2002, Banner y Patterson 1994).

1.2.4 Participación de los macrófagos en la WD

Diversos estudios han demostrado que los macrófagos son reclutados desde la circulación al nervio ciático en degeneración, 3 días post axotomía (figura 5; Perry y col. 1987, Stoll y col. 1989). El número *peak* de estas células se alcanza entre los 14 a 21 días post lesión en el SNP (Monaco y col. 1992, Avellino y col. 1995). Tanto las células de Schwann, como las fibras nerviosas en degeneración producen moléculas quimioattractantes que reúnen macrófagos hacia el nervio. Además, los factores presentes en el suero cumplen este rol (revisado en Cámara-Lemarroy y col. 2010).

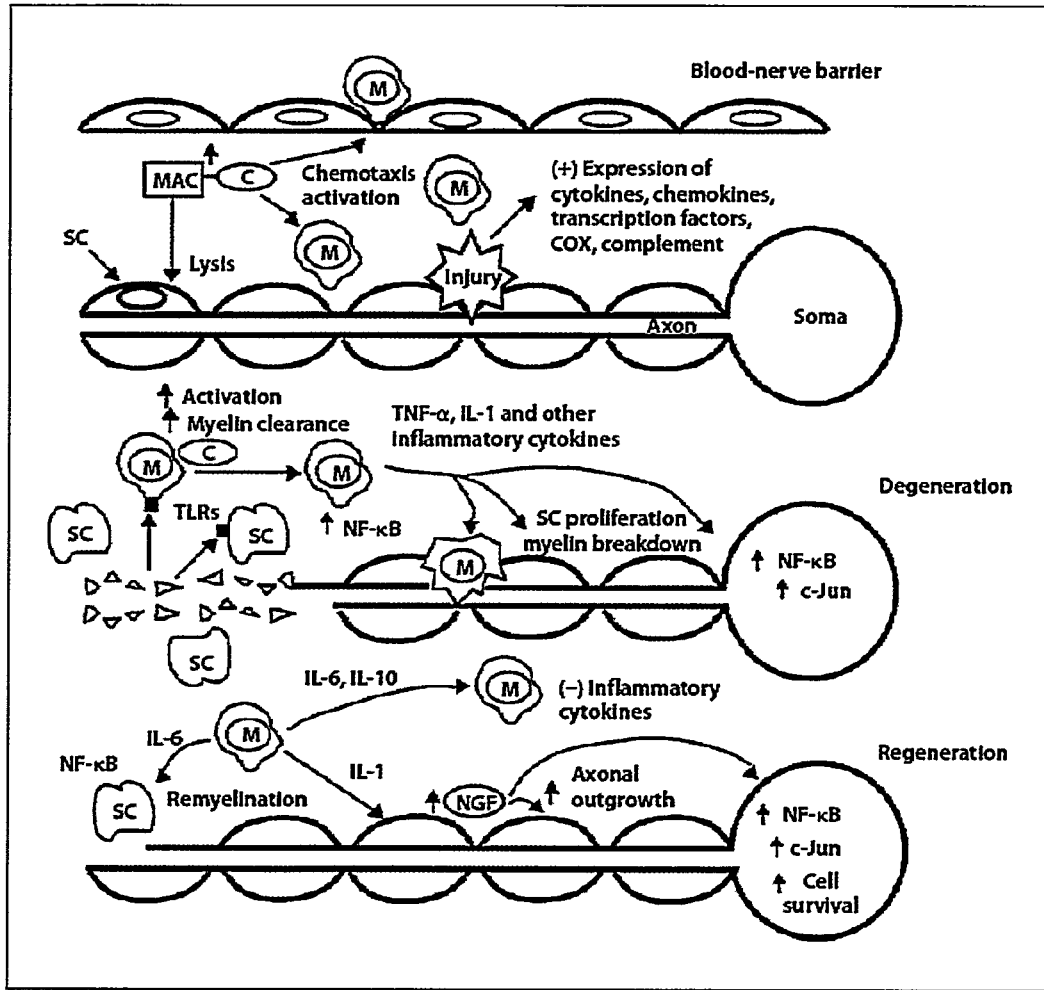
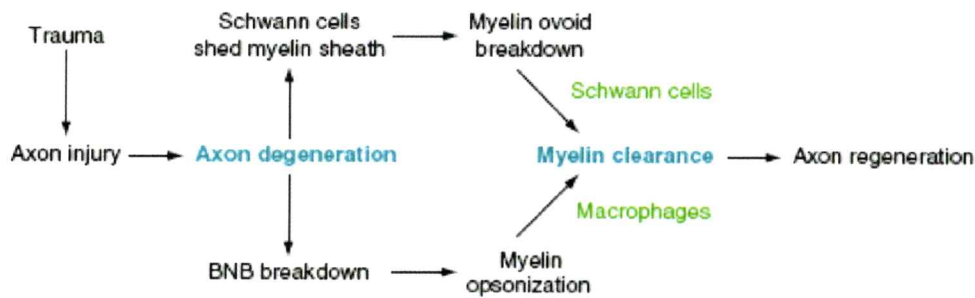


Figura 5. Inmunomodulación hipotética del proceso de degeneración y regeneración post lesión axonal en un nervio periférico. M = Macrófagos; C = Complemento; (+) = aumento; (-) = disminución. Tomado de Cámara-Lemarrroy y col., 2010.

a PNS Wallerian degeneration



b CNS Wallerian degeneration

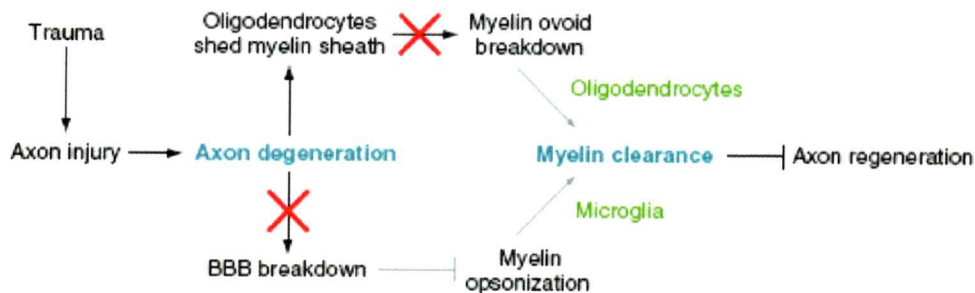


Figura 6. Comparación de la WD en el SNP y el SNC. (a) Resumen esquemático de los cambios histológicos que ocurren durante la WD en el SNP, y que conducen a la eliminación de la mielina. La degeneración axonal gatilla 2 respuestas paralelas que resultan en la rápida limpieza de los restos mielínicos. Las células gliales desintegran la mielina en pequeños ovoides. Las opsoninas derivadas del suero estimulan la fagocitosis por parte de los macrófagos. La rápida eliminación de la mielina permite la regeneración axonal en el SNP. (b) Durante la WD en el SNC ninguno de estos procesos existe. Los oligodendrocitos no eliminan los restos de ovoides mielínicos. la baja permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BBB) impide la entrada de las opsoninas y macrófagos. La persistencia de los restos mielínicos y sus inhibidores, impide la regeneración en el SNC. BNB, barrera tejido-capilar. Modificado de Vargas y Barres, 2007.

En el SNP, los macrófagos median la fase final de la eliminación de los restos mielínicos del fragmento distal desconectado. Posterior a la lesión, estas células se adhieren al tubo de lámina basal, luego entran a éste (Griffin y col. 1992, Li y col. 1995) y fagocitan los restos opsonizados (Bruck y Friede 1990, Friede y Bruck 1993).

Los mecanismos de eliminación de los restos axonales y mielínicos son similares en los distintos tipos de degeneración (Vargas y Barres 2007). Sin embargo, se han descrito ciertas diferencias como por ejemplo, durante el desarrollo del sistema nervioso en *Drosophila* los macrófagos no sólo fagocitan los restos axonales luego del *pruning*, sino que también “cortan” proyecciones intactas que muestran signos de desestabilización (Williams y col. 2005).

1.3 Regeneración axonal post daño

La capacidad de regeneración limitada de las neuronas del sistema nervioso adulto ha sido objeto de intenso estudio. Sin embargo, aún no se conocen con claridad los mecanismos que dan cuenta de éste fenómeno. Diversos estudios en modelos vertebrados han establecido que tanto las propiedades intrínsecas de los axones dañados, como características extrínsecas del ambiente que los rodea participan en la correcta regeneración axonal (Wang y col. 2010).

En los últimos años se ha establecido el estudio de la regeneración axonal en modelos genéticos, como *Caenorabditis elegans*, *Drosophila* y *Danio rerio* (Wang y col. 2010).

En el 2004, el grupo de Yanik desarrolló una cirugía láser para realizar axotomías en neuronas marcadas de *C. elegans* transgénicos *in vivo*. Este estudio demostró que los axones de las neuronas GABAérgicas motoras, mecanosenosensoriales, y quimiosensoriales, eran capaces de regenerar luego del daño con láser (Gabel y col. 2008, Wu y col. 2007, Gosh-roy y col. 2010). De manera similar, se han desarrollado técnicas de axotomías láser en *Drosophila* (Stone 2010) y pez cebra (Pardo-Martin y col. 2010; O'Brien, Sagasti 2009, tabla 1). Es importante mencionar que las

respuestas celulares y la señalización durante la regeneración gatilladas por la axotomía láser muestran un alto grado de similitud con las características fundamentales inducidas por cirugías mecánicas (Wang y col. 2010).

Tabla 1. Nuevas axotomías láser y paradigmas de regeneración.
Revisado en Wang y Jin, 2010.

Table 1		
New laser axotomy and regeneration paradigms in <i>C. elegans</i> , <i>Drosophila</i> and zebrafish.		
Genetic organism	Neuronal process	Regrowth ability
<i>C. elegans</i>	Commissures of GABAergic motor neurons	54% of severed commissures reaches their dorsal distal end within 12-24 hours [2,4,12 ^a]
<i>C. elegans</i>	Commissures of cholinergic motor neurons	Regrow ~50-60 μ m at 24 hours towards the dorsal cord [3]
<i>C. elegans</i>	Axons of ALM, PLM, and AVM mechanosensory neurons	Regrow ~60-100 μ m at 24 hours (~1/4 to 1/3 of original axonal length) [2,4,13 ^a ,28 ^a]
<i>C. elegans</i>	Axon of HSN motor neuron	Some extent of regrowth [3]
<i>C. elegans</i>	Sensory dendrite of AWB chemosensory neuron	Only show slow partial regrowth at 24 hours [4]
<i>Drosophila</i>	Class I dendritic arborization (da) neurons ^a	A dendrite is converted into a regenerating axon [9]
Zebrafish	Axons of trigeminal sensory neurons	Regrow robustly but the ability to innervate original skin territory depends on developmental stages [7]

^a Note: An axon or dendrite is severed at a distance from its soma by a two-photon laser, except in Class I da neurons the axon is completely removed by a UV laser.

Como se mencionó, una característica importante de la regeneración axonal es la activación de la capacidad intrínseca de crecimiento luego de una lesión. Esto ha sido ampliamente estudiado en las neuronas sensoriales primarias del ganglio de la raíz dorsal (DRG; Chen y col. 2007). Las neuronas DRG son neuronas pseudounipolares con un axón emergiendo del cuerpo celular el cual se divide en dos proyecciones axonales: la proyección periférica inerva órganos receptores sensitivos en los tejidos periféricos, mientras que la proyección central entra en la médula espinal y asciende por la columna dorsal terminando en el cerebro. Las dos ramas axonales del mismo cuerpo de la célula son fundamentalmente diferentes en sus respuestas a las lesiones. La rama periférica regenera espontáneamente después de la lesión, lo que resulta en la recuperación funcional, pero la rama central no posee esta capacidad. Esta diferencia en el potencial regenerativo se debe principalmente a su medio ambiente (Chen y col. 2007). Sin embargo, cuando la lesión se produce en la rama central después de la lesión en la rama periférica, la primera puede regenerar más allá del

lugar de la lesión en el entorno inhibitorio de la médula espinal, un fenómeno conocido como condicionamiento por lesión periférica (Neumann y Wolf 1999, Richardson e Issa 1984).

Las señales inducidas por el daño axonal producen una serie de cambios a nivel del citoesqueleto, transporte retrógrado de factores de reparación y cambios en la expresión génica. Estudios tanto *in vitro* (Ziv y col. 1995, Appenzeller y col.1972, Carlsen 1982) como *in vivo* (Gosh-Roy y col. 2010) han mostrado que una de las primeras señales post-corte es el aumento de la concentración de calcio y cAMP.

La activación de la capacidad intrínseca de crecimiento aumenta la capacidad de regeneración, pero una regeneración exitosa depende de un ambiente permisivo y de señales de guía axonal para alcanzar los *target* correctos.

En el pez cebra, el SNC es permisivo para la regeneración, donde algunas neuronas son capaces de crecer, lo que refleja su capacidad de crecimiento intrínseco intacta (Becker y col. 1997, Becker y col. 1998, Zottoli y col. 1994).

Los principales obstáculos para la regeneración axonal en el SNC son las moléculas inhibitorias asociadas a la mielina y las cicatrices gliales inducidas por la axotomía. Los astrocitos, que forman cicatrices gliales en el SNC después de la lesión, están ausentes en el SNP. Las moléculas inhibitorias asociadas a mielina en el SNC como MAG, la glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (OMG), y los receptores de estas proteínas, Ngr y p75, se expresan en el SNP (Filbin 2003). Sin embargo, en contraste con el SNC, después de la lesión, las células de Schwann y los macrófagos en el SNP eliminan rápidamente los residuos de mielina (figura 6; Schafer y col. 1996). Además, las células de Schwann se desdiferencian disminuyendo la expresión de las proteínas inhibitorias.

Además de eliminar las moléculas inhibitorias, es necesaria la presencia de factores neurotróficos para la correcta regeneración axonal. Los factores neurotróficos desempeñan un papel crítico en la supervivencia neuronal tras una lesión nerviosa (Koliatsos y col. 1993, Miyata y col. 1986, Wiese y col. 1999, Yan y col. 1992). Se ha descrito, *in vitro*, que los factores neurotróficos como el factor de crecimiento nervioso (NGF), la neurotrofina 3 (NT-3), y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) inducen el crecimiento del axón a través de la vías señalización conservadas (Yoshimura y col. 2005, Zhou y col. 2004, Zhou y col. 2006). Estos factores tróficos inducen una activación estrictamente regulada y localizada de PI3K en el cono de crecimiento (figura 7; Chen y col. 2007).

Un papel esencial de las neurotrofinas en la regeneración se ha deducido de sus patrones de expresión diferencial después de la lesión del nervio. Tras una lesión nerviosa periférica, el nivel de mRNA de p75 es sobreexpresado en las células de Schwann distal a la axotomía (Heumann y col. 1987). Del mismo modo, en lesiones del nervio ciático, el nivel de mRNA de BDNF aumenta en el fragmento distal tres días después de la lesión y se prolonga durante varias semanas (Funakoshi y col. 1993, Meyer y col. 1992). Por el contrario, el mRNA de NT-3 disminuye en esa misma área (Funakoshi y col. 1993, Meyer y col. 1992). Estos resultados indican que el BDNF es un modulador positivo y NT3 es un modulador negativo de la mielinización de nervios periféricos.

La expresión de estos factores neurotróficos es baja en condiciones normales. Sin embargo, está documentado que luego de una lesión esta expresión aumenta, e incluso se expresa en otros tipos celulares (May y col, 2005).

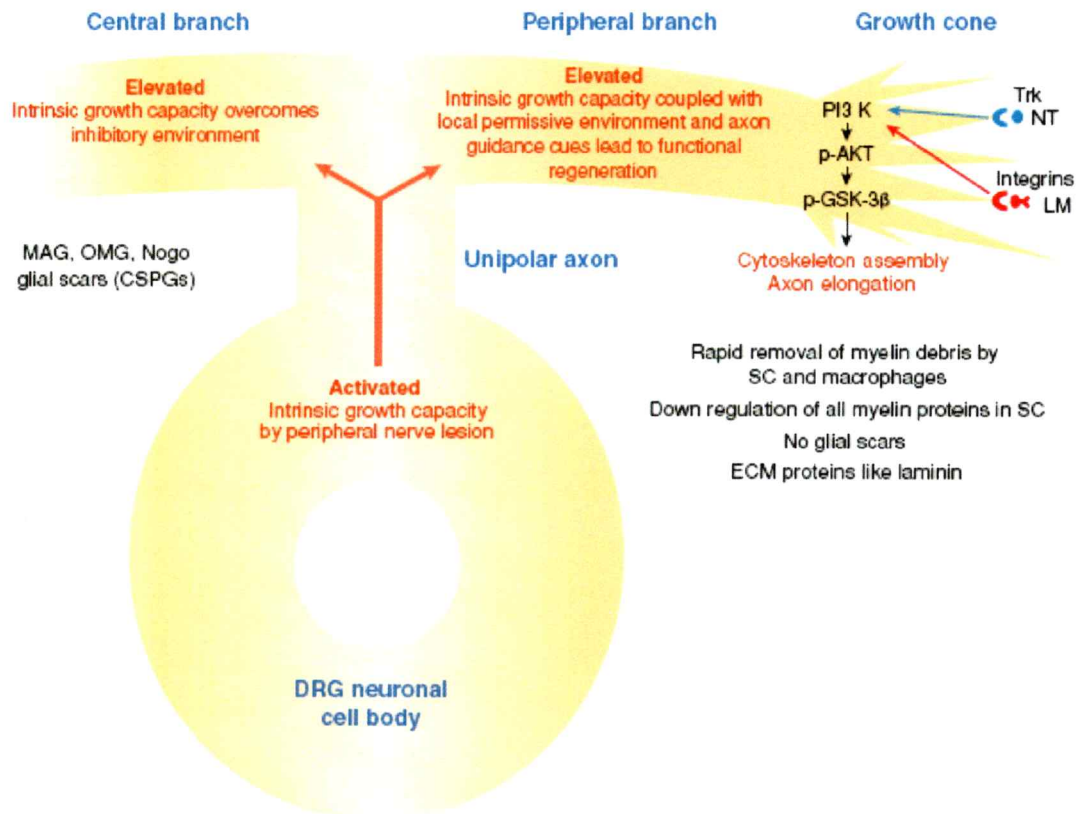


Figura 7. Regeneración axonal en los nervios de la DRG. Después de una lesión de la rama periférica, los restos de mielina son eliminados rápidamente por las células de Schwann y los macrófagos. Las células de Schwann se desdiferencian y reducen la expresión de todas las proteínas mielínicas generando así, un ambiente permisivo. Las proteínas de la matrix extracelular, como la laminina (LM) se unen a los receptores de la integrina en el cono de crecimiento y activan PI3K a nivel local con la consiguiente acumulación de Akt activa en los sitios de contacto axón-laminina. Akt activo fosforila e inactiva a GSK-3 β . La inactivación de GSK-3 β regula las proteínas de unión del citoesqueleto, promoviendo el ensamblaje del citoesqueleto. Las lesiones de nervios periféricos también aumentan la capacidad intrínseca de crecimiento neuronal. Neurotrofinas, también participan en la regeneración axonal a través de sus receptores tropomiosina quinasa (Trk) mediante una vía de señalización intracelular similar a la de la laminina. Tomado de Chen y col., 2007.

Se ha descrito que las células de Schwann, los macrófagos y los fibroblastos del fragmento distal al corte expresan un amplio rango de factores neurotróficos, creando un ambiente favorable para la regeneración axonal (figura 8; revisado en Vargas y Barres, 2007). La glia es también una guía estructural y provee los sustratos que

promueven el crecimiento de la regeneración axonal. Luego de un daño axonal estas células se desdiferencian y proliferan, formando una línea de células conocida como “bandas de Bungner”. Los axones en regeneración crecen en estrecha asociación con las células de Schwann, siendo así capaces de recorrer el camino original exacto (Nguyen y col. 2002).

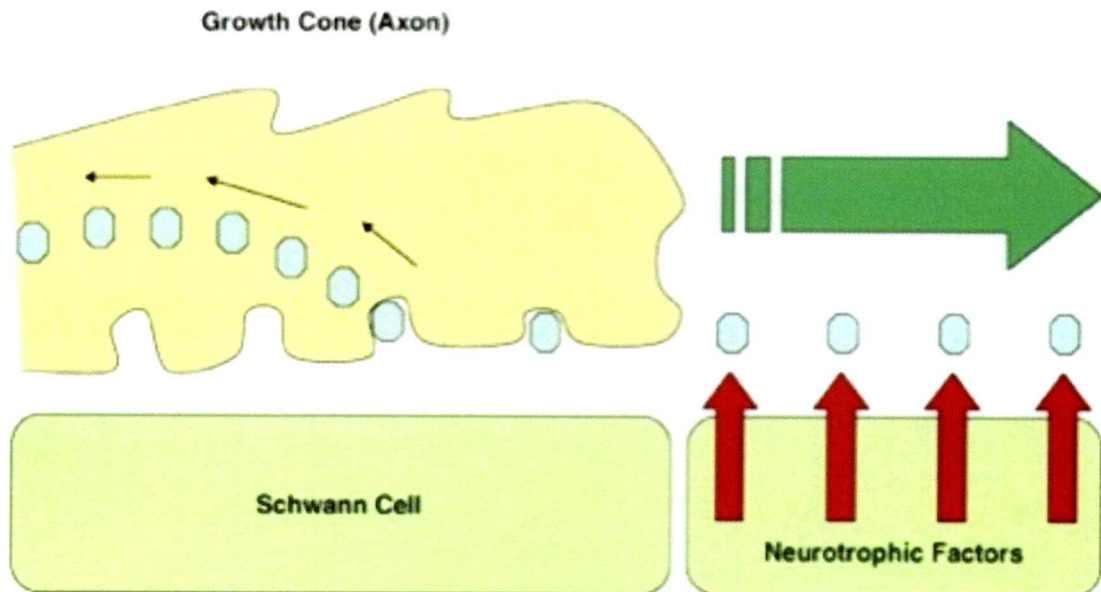


Figura 8. Células de Schwann en la regeneración. Las células de Schwann forman una estructura mecánica para que los axones crezcan a la largo y secretan factores neurotróficos expresados en la superficie celular. Estos son captados por el cono en crecimiento, son incorporados al axón y son transportados retrógradamente al soma celular. Así, apoyan la sobrevivencia neuronal y mejoran la regeneración axonal. Tomado de May y col., 2005

1.4 Ventajas del pez cebra

Entre las ventajas que presenta este organismo se cuentan la fertilización externa de sus huevos, por lo que todas las etapas del desarrollo pueden ser estudiadas; la transparencia de las células en el estado embrionario y larvario, facilitando así la visualización de estructuras internas; una gran cantidad de embriones por cruza; un tiempo de generación relativamente corto (aproximadamente 3 meses), fácil

mantenimiento y generación de líneas transgénicas y mutantes, gen-específicos. Su mantención es de bajo costo, lo que permite contar con un gran número de líneas transgénicas, de mutantes y especies silvestres. A su vez, es posible la inhibición específica de la actividad génica mediante el uso de oligonucleótidos antisentido denominados morfolinos.

Es por estas características que el pez cebra se ha propuesto para el estudio de numerosos fenómenos biológicos, entre ellos envejecimiento y neurodegeneración (Tomasiewicz y col., 2002, Kishi y col. 2003, Keller y Murtha 2004, Gerhard 2007).

1.4.1 Sistema mecanosensorial de la línea lateral

El pez cebra presenta, al igual que otros peces y anfibios, un sistema mecanosensorial llamado línea lateral (LL). Este sistema sensorial responde a estímulos mecánicos producidos por el medio externo y está involucrado en una variedad de comportamientos que van desde la sincronización de los movimientos, la orientación en relación a las corrientes de agua, la detección de la presa, la prevención de los depredadores, el nado en cardumen y el cortejo sexual (Ghysen y Dambly-Chaudière 2007).

La LL está compuesta por un grupo de órganos sensoriales individuales denominados neuromastos, que se encuentran espaciados en la superficie del cuerpo en patrones especie-específicos (figura 9). Cada neuromasto está compuesto por un núcleo de 15 a 20 células ciliadas rodeado por dos tipos de células accesorias: células de soporte y células del manto. Las células de soporte sostienen y rodean a las células ciliadas, ésta a su vez se encuentran rodeadas por las células del manto, las que delimitan al neuromasto. Estos órganos son inervados por aferencias de neuronas sensoriales

cuyos somas se ubican en el ganglio de la línea lateral, las cuales extienden sus axones al cerebro posterior (figura 10, Ghysen y Dambly-Chaudière 2004, Goodrich y col. 2005). Aproximadamente, 20 neuronas aferentes bipolares reciben la entrada sináptica de las células ciliadas de cada rama principal de la línea lateral. Estas neuronas presentan su soma en el ganglio de la LL (ganglio cefálico ubicado entre el ojo y el oído del pez), y proyectan las ramas centrales hacia el cerebro posterior de manera somatotópica (Metcalfé y col. 1985, Gompel y col. 2001, Fame y col. 2006). Las neuronas eferentes que inervan las células ciliadas de la LL tienen sus cuerpos celulares en tres núcleos distintos en el sistema nervioso central, lejos de los ganglios aferentes (Metcalfé y col. 1985, Fain y col. 2003).

Los neuromastos al estar expuestos en la superficie del cuerpo, son fácilmente visibles con microscopía de Nomarski y con tinciones fluorescentes como el marcador vital 2-Di-4-Asp (Collazo y col. 1994), el marcador FM1-43 (Nishikawa y Sasaki, 1996) y el marcador Yo-Pro-1 (Santos y col. 2006); los que se acumulan específicamente en las células ciliadas funcionales. Además, actualmente existe una gran variedad de líneas transgénicas de pez cebra, las cuales expresan GFP en los diferentes tipos celulares de la línea lateral (figura 9). En el pez cebra, el patrón embrionario de la línea lateral es relativamente simple y su desarrollo comprende procesos de migración celular y axonal, proliferación, neurogénesis y diferenciación celular. Los neuromastos ubicados sobre la cabeza forman la línea lateral anterior (LLA), mientras que los neuromastos ubicados sobre el tronco y la cola, incluyendo la aleta caudal, forman la línea lateral posterior (LLP; figura 9, Ghysen y Dambly-Chaudière 2004).

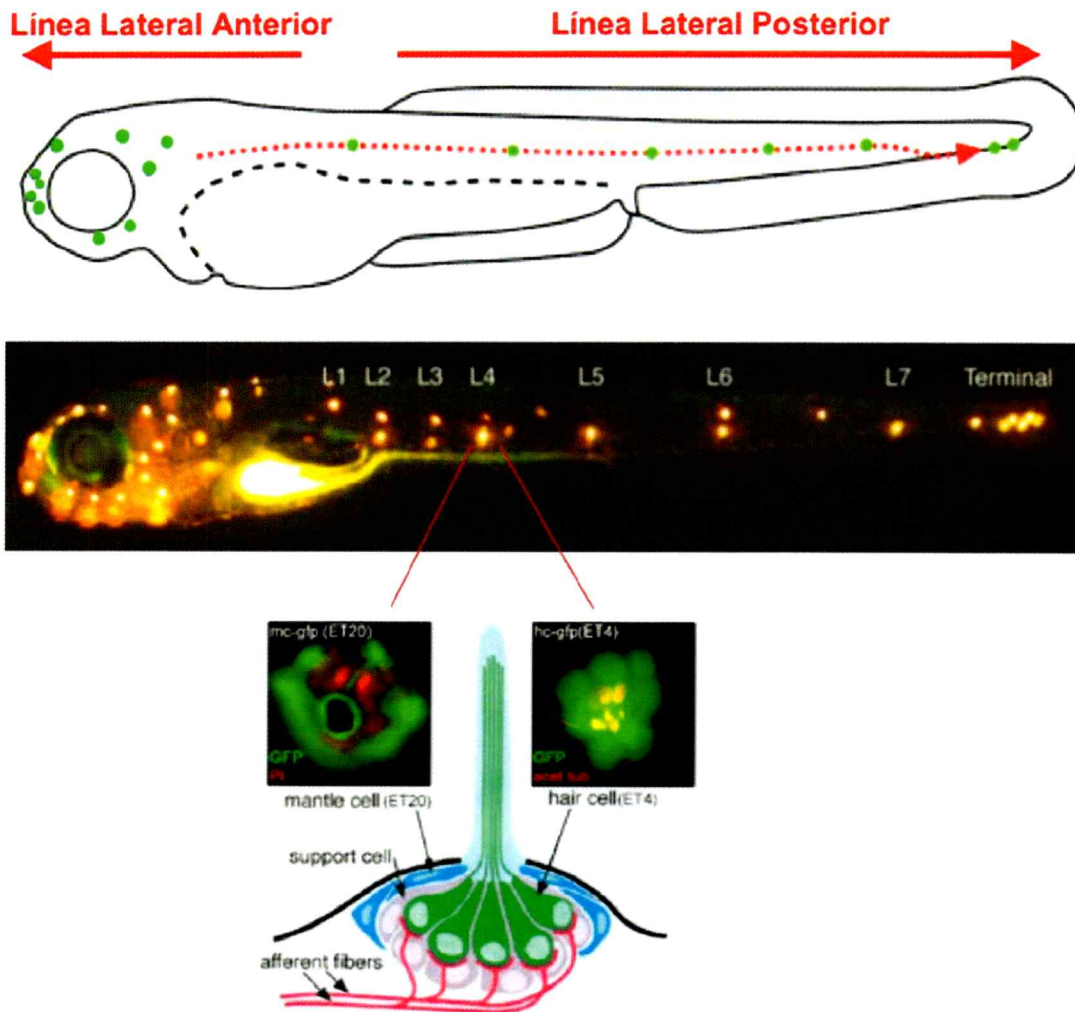


Figura 9. Línea lateral del pez cebra a los 3 dpf. Figura superior: diagrama de la línea lateral del pez cebra. Figura media: visualización *in vivo*, de los neuromastos de la línea lateral del pez cebra mediante tinción Daspei. Figura inferior: Esquema de un neuromasto maduro. Se observa las células ciliadas mecanosensoriales (color verde), células de soporte (color gris) y las células del manto (color azul). Además, se muestra la expresión de GFP en las células del manto de la línea transgénica sqET20 y la expresión de GFP en las células ciliadas de la línea transgénica sqET4.

La LLP primaria del pez cebra se compone de 7 a 8 neuromastos y su desarrollo comienza a las 18-20 horas post-fertilización (hpf) con la formación de una placoda de aproximadamente 120 células que se encuentran bajo la epidermis y justo posterior a la vesícula ótica. Una vez formada la placoda de la LLP, ésta se divide en un pequeño compartimiento anterior de alrededor de 20 células, las que luego se

diferencian a neuronas sensoriales formando el ganglio de la LLP; y en un compartimiento mayor de aproximadamente 100 células, las que formaran el primordio de la LLP (figura 11, Ghysen y Dambly-Chaudière 2007). A las 20-21 hpf comienza la migración del primordio a lo largo del miosepto horizontal desde la cabeza hacia la cola a una velocidad aproximada de 150 $\mu\text{m}/\text{h}$ (1.7 somitos/hora; figura 11d). Las células del primordio tienen un tamaño aproximado de 7 μm de diámetro y pueden ser distinguidas fácilmente por su tamaño y forma. A medida que el primordio migra, éste es acompañado por los axones que se extienden desde del ganglio (Metcalfé 1985, Gilmour y col. 2004).

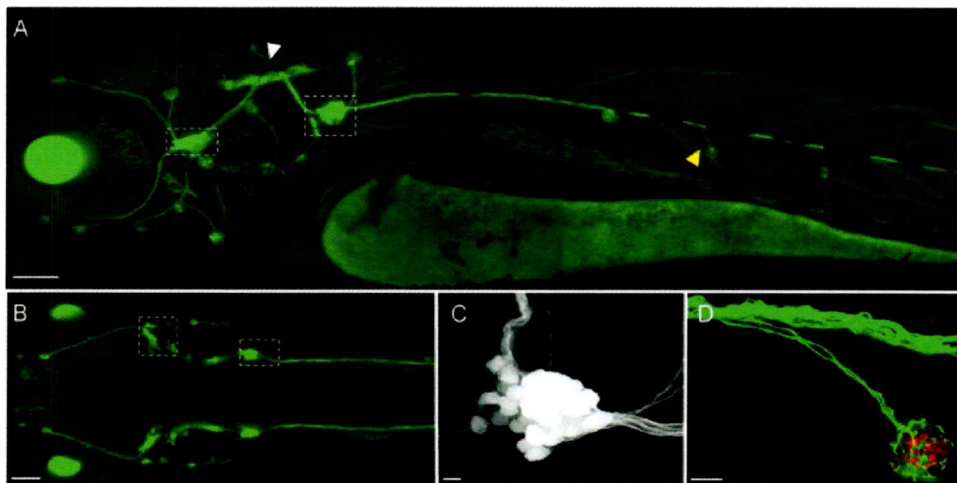


Figura 10. Pez cebra transgénico HGn39D expresa GFP en las neuronas aferentes de la LLP (A-C). Larva de 4dpf. Vista lateral (A) y dorsal (B). Las flechas indican la proyección central y periférica, en blanco y amarillo, respectivamente. Los cuadros punteados muestran los ganglios de la línea lateral en A y B. (C) Ganglio de la LLP, unos 25 cuerpos celulares se pueden contar.(D)Transgénico inmunomarcando las células ciliadas con el anticuerpo anti-HCS1. Tomado de Faucherre y col. 2009.

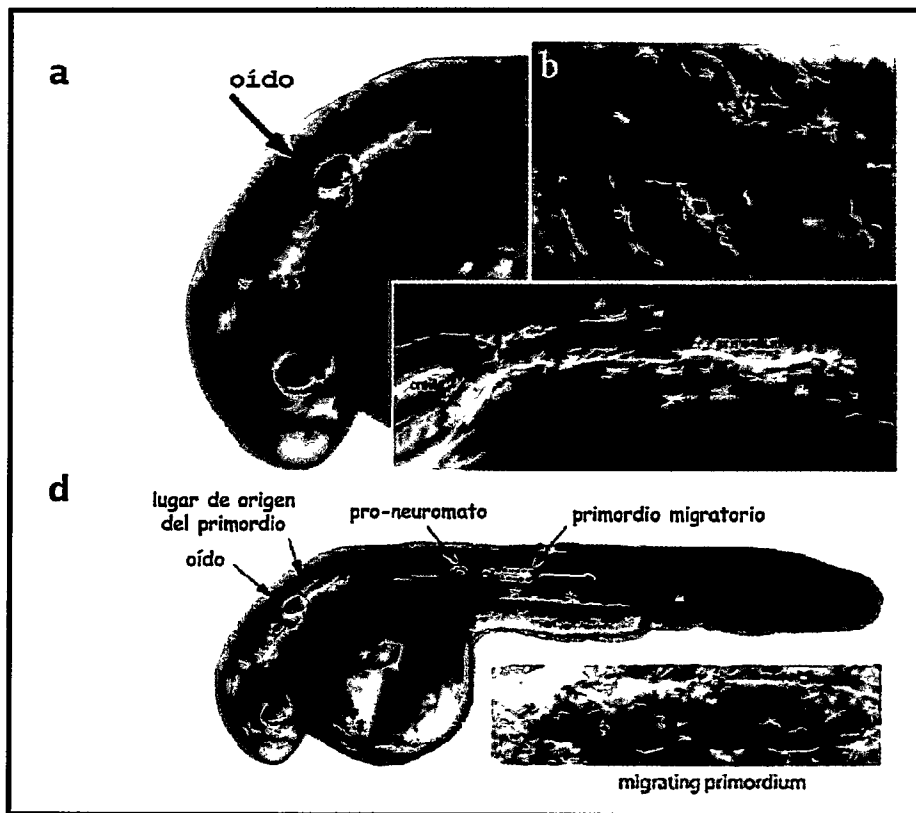


Figura 11. Desarrollo de la línea lateral posterior en el pez cebra. a) Vista lateral de la cabeza de un embrión de 24 horas post-fertilización (hpf). b) Origen del primordio migratorio, las flechas indican el punto donde se separan las células que darán origen al ganglio de la LLP de las células migratorias que formaran el primordio de la LLP. c) Comienzo de la migración del primordio y formación del ganglio de la LLP. d) Migración del primordio a través del miosepto horizontal y depósito de los pro-neuromastos. Microscopía Nomarski.

Las células gliales en cambio, migran a lo largo de los axones (Gilmour y col. 2002) mielinizando los axones del nervio de la LLP (Brösamle y Halpern 2002).

Recientemente, se ha demostrado que la señalización mediada por GDNF (*Glial cell line-derived neurotrophic factor*) juega un papel clave en la afinidad de los conos de crecimiento neuronales por el primordio, durante el desarrollo embrionario y la regeneración post corte del nervio de la LLP (Schuster y col. 2010).

Dado que la LLP se desarrolla en la superficie del pez, en un corto período de tiempo (en 3 dpf ya es funcional), el estudio de este sistema ofrece una excelente oportunidad

para realizar un análisis detallado de la degeneración, y la posterior regeneración axonal *in vivo*.

Además, otra de las ventajas del estudio de la degeneración axonal en la LLP es que se puede observar con marcadores simples la presencia y funcionalidad de las células *target*, las células ciliadas.

Es importante mencionar que debido a la similitud funcional y estructural entre las células ciliadas del oído interno de vertebrados y las de la LLP, se ha propuesto que el desarrollo de ambos tipos celulares se basa en mecanismos similares (Pichon y col. 2004). La diferencia más importante entre las células ciliadas de mamíferos y peces, es la capacidad de regeneración de éstas en teleósteos, como el pez cebra. La ausencia de regeneración de las células sensoriales y las neuronas auditivas en mamíferos es una de las principales causas de sordera. Varios estudios han tratado de diferenciar o implantar células ciliadas en animales sordos, pero éstas no pueden sentir estímulos si no están inervadas. Por esta razón es esencial estudiar la relación entre la célula ciliada y su neurona sensorial, el posible mecanismo de regeneración del nervio y la reinervación de su célula *target*.

1.5 Planteamiento del problema.

Un modelo ampliamente utilizado para el estudio de la WD es la sección del nervio ciático en roedores, para luego seguir el proceso de degeneración por la observación directa o mediante la fijación de los tejidos a distintos tiempos. El uso de este modelo ha proporcionado información abundante y de calidad acerca de los fenómenos asociados con la degeneración, por ejemplo, el papel de la proteína *Wld^S*, entre otros. Sin embargo, el modelo de ratón presenta varios inconvenientes, incluida la cirugía

invasiva, la dificultad de mantener los animales después de la ésta, el crecimiento relativamente lento, entre otros.

Por otra parte, existe un gran conjunto de evidencias acerca de los mecanismos de degeneración y regeneración en modelos *in vitro*. Sin embargo, los resultados obtenidos en modelos *in vitro* no son fáciles de aplicar en sistemas vivos. De esta manera, considerando la importancia de estos estudios en terapias contra enfermedades neurodegenerativas, se hace crítico describir estos eventos *in vivo*. Asimismo, debido a los numerosos factores intrínsecos y extrínsecos que participan en ambos procesos, es necesario contar con un modelo que permita ensayos genéticos, y farmacológicos a gran escala.

Como una alternativa conveniente, hemos elegido el pez cebra como modelo para el estudio de la degeneración y regeneración de un nervio periférico debido a las ventajas comparativas de esta especie. En particular, la transparencia de los tejidos durante etapas embrionarias y larvales, la existencia de los marcadores *in vivo* de neuronas sensoriales, la disponibilidad de líneas transgénicas que expresan GFP en diferentes tipos celulares, son características que pueden ser utilizados para el estudio de la degeneración y regeneración axonal.

Con el fin de validar al pez cebra como un buen modelo de estudio de degeneración y regeneración axonal *in vivo*, se caracterizarán estos fenómenos en el estadio de 3 dpf. Con estos datos podremos abordar la pregunta biológica que nos interesa, a saber: cual es la relación entre las células ciliadas y los axones que las inervan durante la regeneración de éstos post-axotomía.

1.6 Hipótesis

La regeneración axonal en el nervio de la línea lateral requiere de la interacción entre las células ciliadas de los neuromastos y los axones.

1.7 Objetivo general

Describir los procesos de degeneración y regeneración axonal luego de un daño y evaluar la participación de las células ciliadas durante estos procesos, en el sistema de la línea lateral del pez cebra.

1.8 Objetivos Específicos

Objetivo 1. Determinar el destino de las células ciliadas luego de su denervación.

Objetivo 1.a. Establecer un protocolo reproducible de axotomía del nervio de la LLP para caracterizar los procesos de degeneración y regeneración del nervio de la línea lateral post corte.

Objetivo 1.b. Determinar el destino de los neuromastos y, en particular, de las células ciliadas, luego de su denervación.

Objetivo 1.c. Estudiar el patrón de reinervación luego de dañar el nervio.

Objetivo 2. Estudiar el patrón de regeneración del nervio de la línea lateral en ausencia de las células ciliadas.

Objetivo 3. Evaluar la función de factores candidatos que podrían participar en la regeneración axonal post corte.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Material biológico

Como modelo experimental se utilizaron embriones de *Danio rerio* (pez cebra) obtenidos mediante cruces espontáneos.

Los peces usados en este estudio se mantuvieron en ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, 28°C en agua desionizada tratada con 60 mg/L de Instant Ocean a pH 6,5 en el vivero del Edificio Milenio de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Además, se utilizaron peces de la Universidad de California Los Angeles (UCLA), bajo las mismas condiciones.

Las condiciones de alimentación, cuidados y reproducción se realizaron de acuerdo a lo descrito en Westerfield M. (1994). Los embriones y larvas se mantienen en medio E3 (5mM NaCl, 0.17mM KCl, 0.33mM CaCl₂, 0.3mM MgSO₄, 0.1% azul de metileno) en placas petri a 28°C. Los estadios embrionarios y larvales se expresan en horas post fertilización (hpf) o días post fertilización (dpf), respectivamente.

En esta tesis se usaron peces silvestres de la cepa AB y 4 líneas transgénicas. Estas fueron: *cldnB:GFP* que posee las regiones reguladoras del gen *claudinB* controlando la expresión de la proteína fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein*; GFP; Haas P. y Gilmour D., 2006), *neuroD:EGFP*, que expresa la proteína fluorescente bajo el control de parte de la región regulatoria del gen *neuroD* (Obholzer, N., y col., 1999), *brn3c:GFP*, que expresa la secuencia codificante para la GFP bajo el control del promotor de *brn3* (Xiao y col., 2005) y *lysC:GFP* que expresa GFP bajo el control del promotor de lisozima C (Hall y col. 2007).

A su vez, se utilizaron bacterias *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen) y bacterias *Escherichia coli* Top10 (Invitrogen) para la transformación de los plásmidos utilizados.

2.2 Reactivos

Generales: Acido cítrico, BSA, DMSO, glicerol, Heparina, LiCl, MgCl₂, NaOH, PTU, rojo fenol, sacarosa, sulfato de amonio, Tris base, Tween-20 (Sigma). Cloroformo, Isopropanol, Metanol (Mallinckrodt). EDTA, H₂O tratada con DEPC, HCl, MAB, NaCl, SDS, TAE (Quality Biological). Etanol (The Warner-Graham Company). H₂O₂ (Fisher Scientific). Paraformaldehído (Electron Microscopy Science). PBS (Cellgro).

Biología Molecular: Agarosa (SeaKem), BCIP, buffer Transcripción 5X, DIG RNA labeling mix (UTP), DNAsa libre de RNAsas, NBT, RNA polimerasas SP6, T3 y T7, RNasein, UTP-digoxigenina (Roche). Buffer Taq polimerasa, buffer Taq polimerasa High Fidelity, buffer T4 DNA ligasa, buffer Transcriptasa Reversa, marcador de peso molecular de DNA 1kb, proteinasa K, SSC 20X, T4 DNA ligasa, Taq polimerasa, Taq polimerasa High Fidelity, Transcriptasa reversa SUPERSRIPT II, Trizol (Invitrogen). Formamida (Fluka). Pronasa, tRNA (Sigma).

2.3 Morfolinos antisentido

Se utilizaron morfolinos (MO) antisentido específicos contra los genes atonal homólogo 1, BDNF y Pu.1 obtenidos de Gene Tools. Ver tabla 2.

1-2nl de 0.5mM del MO contra el gen Pu.1; 8-10nl de 10 μ M del MO de atonal1a y 5-8 nl de 10 μ M del MO contra BDNF fueron inyectados en estadio de una célula.

Tabla 2. Lista de los morfolinolinos utilizados en los ensayos de regeneración post corte *in vivo*

Nombre MO	Secuencia
MO atonal	5' TCTGTTGGTTTGTGCTTTTGGGAGG 3'
MO PU.1	5'-GATATACTGATACTCCATTGGTGGT-3'
MO BDNF	5'-TGTTGGAAGTGGAGACAGCAAAAAGG-3'

2.4 Microinyección de embriones

Para la microinyección de embriones se usó una placa de Petri con medio E3 para posicionar los embriones. Los embriones en estadio de una célula fueron ordenados en 3 filas paralelas en el borde de un portaobjeto, para luego ser inyectados con 10 nl de una solución de DNA o morfolino en rojo fenol al 1% en agua, usando un inyector de presión de nitrógeno (Narishige).

2.5 Transformación de bacterias competentes

La transformación de los plásmidos se realizó mediante el método de choque térmico. Brevemente, a 100 µl de bacterias competentes se le agregó 100 ng de DNA plasmidial y se incubó en hielo durante 30 min. A continuación, se dio un choque térmico de 45 seg. a 42°C. Posteriormente, la mezcla se incubó nuevamente en hielo por 10 min., para luego agregar 800 µl de medio SOC y se incubó en un agitador a 37°C por 1 hora. Pasado este tiempo, el cultivo de bacterias fue sembrado en placas de agar con el antibiótico apropiado e incubado a 37°C durante toda la noche.

2.6 Axotomía con un microscopio de 2 fotones y captura de imágenes de confocal *time-lapse in vivo* (experimentos realizados en UCLA)

Los embriones fueron anestesiados con triclaína y posicionados dentro de una gota de agarosa de bajo punto de fusión hasta su solidificación. Los embriones inmovilizados fueron sellados dentro de una cámara llena de *ringers* PTU. Los efectos dañinos del PTU fueron descartados, ya que se obtuvo resultados similares en controles sin PTU. Los embriones fueron monitoreados por 20 horas, desde el momento de la axotomía. Se determinó la región de interés, en el microscopio confocal Zeiss 510 de 2 fotones monitoreando los axones que expresaban GFP, usando poder bajo que no causa daños, usando un objetivo de inmersión en agua de 25x. Se realizó un zoom en el sitio de corte determinado, se incremento el poder y se escaneo dicha región. Lo cual fue suficiente para cortar el axón. Se monitorearon distintos embriones a la vez usando la herramienta de múltiples ubicaciones, en un microscopio confocal Zeiss LSM 510, utilizando objetivos 20x, 0,5 NA y 40x.

2.7 Adición de inhibidor AG1478 y cobre

10 μ M de AG1478 (Calbiochem) en 2% DMSO fue adicionado al agua de los peces desde las 10 hpf hasta el término del experimento para bloquear la señalización ErbB (Levitcki y col. 1995; Busse y col. 2000) y así la migración de las células de Schwann (Lyons y col. 2005).

Para los tratamientos de cobre se adicionó CuSO_4 (Merck, Darmstadt, Germany) disuelto en agua de sistema del vivero, usando una concentración final de 50 μ M.

2.8 Análisis morfológico y cuantificación de los datos

Se utilizó el programa *ImageJ*, para cuantificar los fragmentos axonales durante la degeneración axonal (figura 17). La expresión de GFP (luego de convertir las imágenes a escala de grises de 8 bit) se ajustó usando la función de umbral de *ImageJ*. El umbral (en blanco y negro) y el área total fueron seteados por igual para todas las imágenes analizadas. Los fragmentos axonales fueron medidos usando el plugin “analyze particles” de Image J (con los siguientes settings : size (pixel²=0-infinity, circularity= 0-1; show outlines)).

Los tiempos obtenidos para las distintas fases de la WD se determinaron mediante la inspección visual de los stacks y luego se promediaron en cada tratamiento.

2.9 Estadística y análisis

Para la comparación de tratamientos se utilizó el test ANOVA de dos. El nivel de significancia fue de $p < 0.05$ para todos los tratamientos.

La cuantificación de los fragmentos obtenidos del análisis descrito en la sección anterior fueron graficados respecto al tiempo y ajustados a una distribución gaussiana.

Todo el análisis de los datos se realizó con el programa Prism 5.0 (GraphPad Prism Software, Inc., USA)

3. RESULTADOS

El diseño experimental se basó en la descripción de los procesos de degeneración y regeneración post corte del nervio de la línea lateral del pez cebra.

A partir de nuestros resultados, proponemos a la LLP del pez cebra como un atractivo sistema-modelo, versátil, accesible y de fácil manipulación para el estudio de la degeneración y regeneración *in vivo*.

3.1 Objetivo 1a. Establecer un protocolo de axotomía del nervio de la LLP reproducible, para caracterizar los procesos de degeneración y regeneración del nervio de la línea lateral post corte.

Para caracterizar los procesos de degeneración post corte de axones sensoriales y la posterior regeneración de éstos *in vivo*, fue necesario estandarizar un protocolo reproducible de axotomía de los axones de la LLP. Para esto, se realizaron tanto secciones mecánicas, como axotomías mediante un láser. En ambos experimentos se utilizaron larvas transgénicas de pez cebra de 3 dpf.

Con el fin de estudiar el comportamiento de todos los axones que conforman el nervio de la línea lateral se usaron peces transgénicos neuroD:GFP, obtenidos del laboratorio del Dr. Alex Nechiporuk de la Universidad de Oregon, Estados Unidos (Obholzer y col, 2008). Este transgénico expresa la proteína fluorescente verde bajo

el control del promotor del gen *neuroD*, el cual corresponde a un factor de transcripción que promueve la diferenciación neuronal y se mantiene expresado en las neuronas diferenciadas de los ganglios craneales del pez. Por otro lado, para describir los procesos a nivel de célula única, se inyectó un constructo de DNA, formado por parte de la región promotora del gen *HuC*, el cual se expresa en todas las neuronas del pez cebra, y la región codificante de la proteína fluorescente verde. De esta manera, aprovechando el mosaicismo de expresión al inyectar el constructo en estadio de una célula se seleccionaron las larvas con expresión en una única neurona.

Para determinar la presencia de degeneración axonal aguda, fueron analizadas las primeras 2 horas post axotomía tomando fotos cada un minuto. Estas imágenes revelan la presencia de AAD durante la primera media hora post daño, dejando una distancia de 150 μm entre los extremos adyacentes al corte (figura 12, película 1 disco adjunto, $n=10$). Para analizar la WD, se capturaron imágenes cada 20 minutos. Este análisis mostró las tres fases estereotipadas de la WD: una fase *lag* o de “espera”, una fase de fragmentación y una fase de limpieza de los fragmentos axonales (figura 12, película 2 disco adjunto, $n= 15$). Similar a lo descrito en Martin, y Sagasti 2010, la fase *lag* es un período de latencia durante el cual el axón desconectado del soma neuronal no muestra signos de degeneración. Esta fase dura en promedio 3 horas (figura 14). La fase de fragmentación se caracterizó por una desintegración abrupta del axón en varios segmentos.

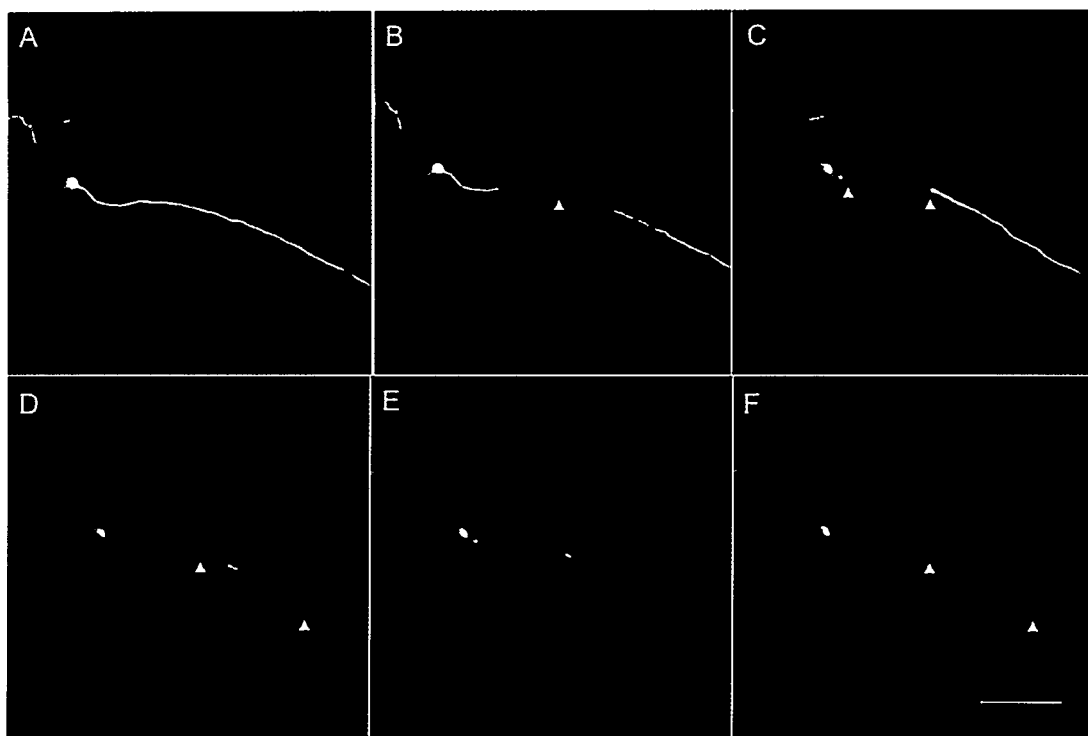


Figura 12. AAD y Degeneración Walleriana. Larva de 3dpf que expresa GFP en una neurona de la LLP. A, en la neurona intacta se observa la forma bipolar de la neurona. B, en el momento de la axotomía se observa (cabeza de flecha roja) el sitio específico del daño con el láser. C, 30 minutos post axotomía se observa AAD. D, 3 horas post axotomía, se observa la fragmentación abrupta de toda la parte distal al corte(indicado por flechas rojas). E, 4 horas post corte aun se mantienen algunos fragmentos. F, 5 horas post axotomía se observa la eliminación de los fragmentos axonales (flechas rojas). Microscopía confocal 20x. Escala 100 μm .

Se ha descrito que la degeneración es un proceso que ocurre progresivamente desde proximal hacia distal respecto al sitio de corte (Beirowski y col. 2005; Gilley y Coleman, 2010; Kerschensteiner y col. 2005; Lubinska, 1977). Sin embargo, también existe evidencia de que este proceso ocurre simultáneamente a lo largo de todo el axón (Martin y Sagasti 2010). Para determinar el tipo de degeneración (progresiva o simultánea) se tomaron imágenes de un área mayor, con un aumento de 10X (figura 13, n= 10). Se observó que la fragmentación ocurre de una sola vez a lo largo de todo el nervio de la LLP, lo cual refuerza el hecho de que la WD es un proceso activo y

concuenda con datos publicados en los axones del nervio trigémino del pez cebra (Martin y Sagasti, 2010).

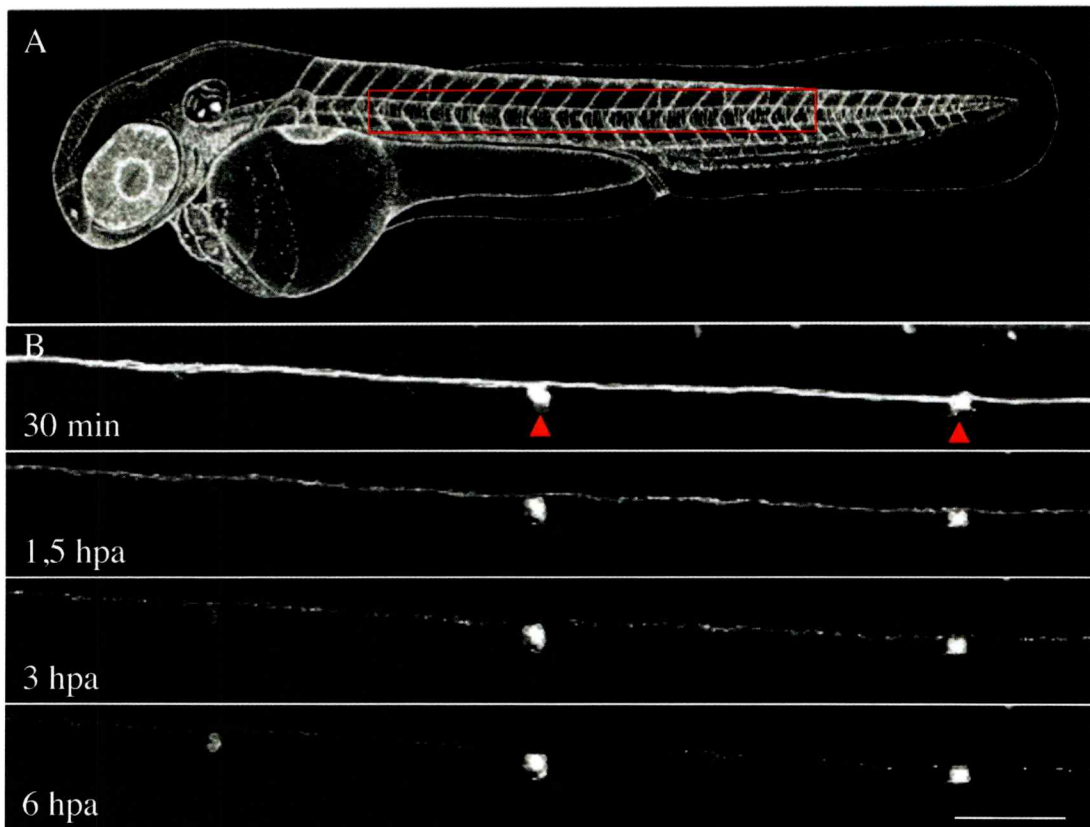


Figura 13. WD es simultánea en el nervio de la LLP. Larva transgénica que expresa GFP en los axones de la LLP y en la células ciliadas (cabeza de flechas rojas). A, esquema de una larva de 3dpf que muestra el área analizada (rectángulo rojo). B, secuencia del proceso de fragmentación del nervio de la LLP. Microscopía confocal 10X. Escala 100 μ m. (hpa) horas post-axotomía.

La fase de limpieza, comienza inmediatamente luego de la fragmentación y se extiende hasta que todos los restos axonales son removidos, lo cual dura en promedio 5 horas post corte (figura 14, película 2 disco adjunto).

Para determinar el tipo celular que participa en la fagocitosis de los restos axonales se estudiaron -por pérdida de función- las células de Schwann y leucocitos. Se utilizó un inhibidor de la señalización ErbB (AG1478), el cual evita la migración de las células de Schwann, fenocopiando a los mutantes *erbb2*, *erbb3*, y *sox10* los cuales carecen

de células de Schwann en los nervios periféricos (Kelsh y Eisen, 2000, Lyons y col. 2005, Pogoda y col. 2006). Adicionalmente, se estudió el mutante *leo1*, el cual no posee células de Schwann (Nguyen y col, 2010). Se determinó que en promedio la remoción de los restos axonales no presenta una diferencia significativa con los controles (figura 13 y 16).

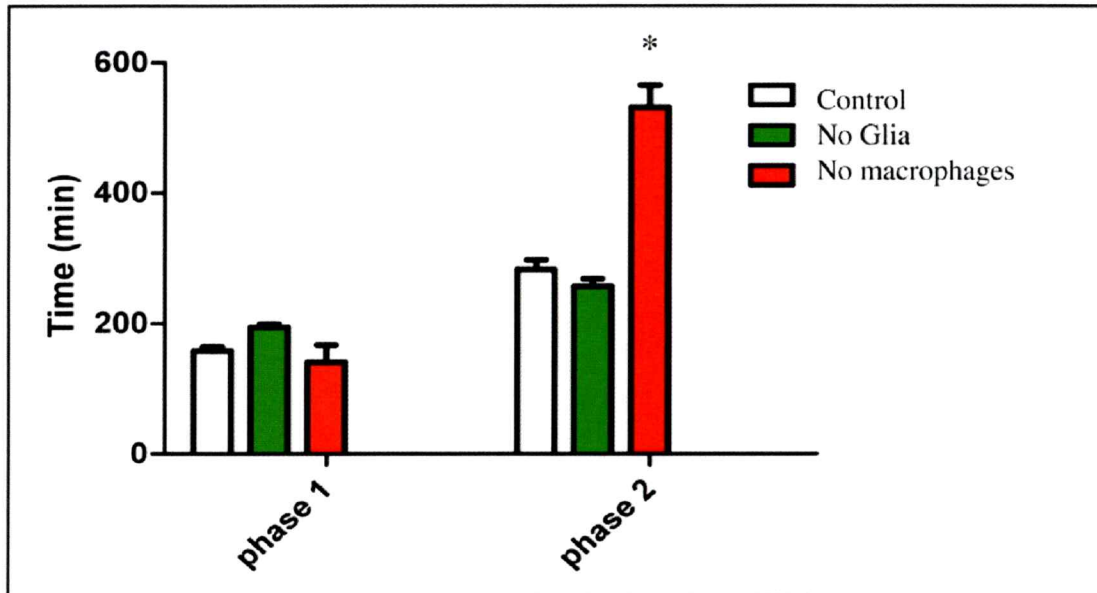


Figura 14. Cuantificación y comparación de las fases de la WD. Fases de fragmentación (fase uno) y de eliminación de los fragmentos (fase dos), con 2 de ensayos de pérdida de función para determinar la identidad de los participantes en este proceso celular. La inhibición de la formación de los macrófagos, con el morfolino contra Pu.1 alarga la fase dos de manera significativa. El inhibidor del receptor de EGF (AG1478) inhibe la migración de las células de Schwann. (*) Diferencia significativa, ANOVA de dos vías, $p < 0,05$.

Para obtener un *knockdown* de leucocitos se usó el morfolino contra Pu.1, el cual ha sido descrito como un gen esencial en la diferenciación del linaje mieloide (Rhodes y col, 2005). Además, se utilizaron mutantes *cloche*, los cuales no desarrollan células sanguíneas (Stainier y col. 1995). En experimentos con ambos fondos genéticos se observó un significativo retraso en la remoción de los restos axonales al compararlos

con los controles silvestres (figura 14). Estos datos sugieren, que las células que fagocitan, tanto los fragmentos axonales como los mielínicos, son los leucocitos.

Por otra parte, al realizar el *time-lapse* con el doble transgénico que expresa GFP en axones (neuroD:GFP) y leucocitos (LysC:GFP) se observa que éstos últimos migran hacia la zona de la axotomía y hacia los fragmentos axonales (figura 15, película 3 disco adjunto, n=8). Este resultado concuerda con los experimentos del laboratorio del Dr. Michael Granato (Universidad de Pensilvania) quien ha podido detectar con mayor precisión este fenómeno en neuronas motoras, mostrando una clara colocalización entre macrófagos y fragmentos axonales (comunicación personal).

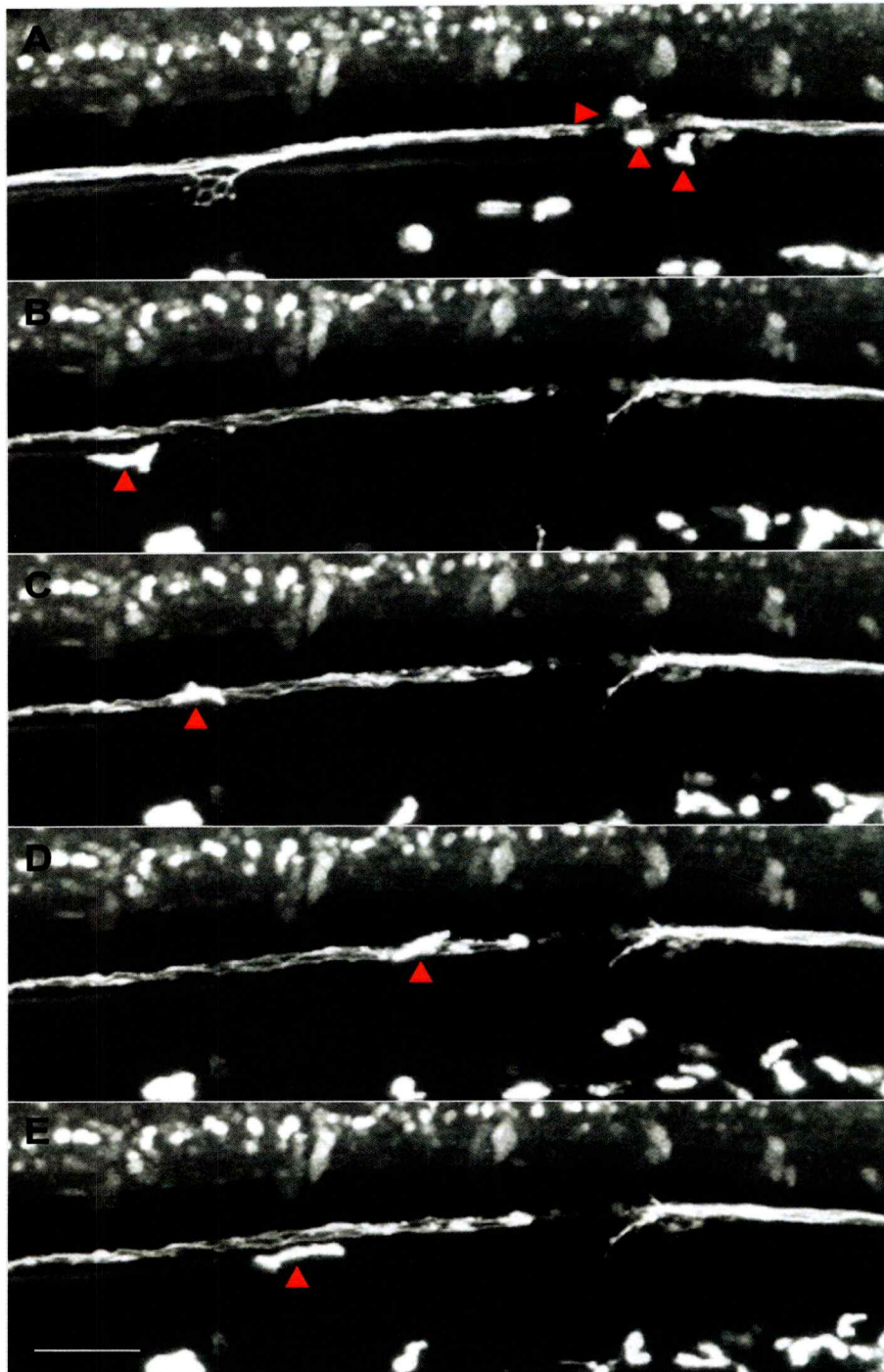


Figura 15. Leucocitos presentes durante la WD. Larvas transgénicas de 3dpf, que expresan GFP en los leucocitos y en los axones de la LLP. A, post axotomía, se observan 3 leucocitos (cabezas de flecha rojas) en el sitio del corte. B, C, D y E secuencia de seguimiento, a lo largo del nervio, de un macrófago durante la WD. Microscopía confocal 20x. Escala 100 μ m.

Tabla 3. Cuantificación de los leucocitos que hacen contacto con el nervio de la LLP, en larvas controles y en ausencia de glía.

	Control	Sin Glía
Larva 1	1	7
Larva 2	16	12
Larva 3	8	38
Larva 4	9	32
Larva 5	4	20
Larva 6	10	33
Larva 7	4	14
Larva 8	24	23
Promedio	9,5	22,38
Desviación estándar	7,45	11.15
n	8	8

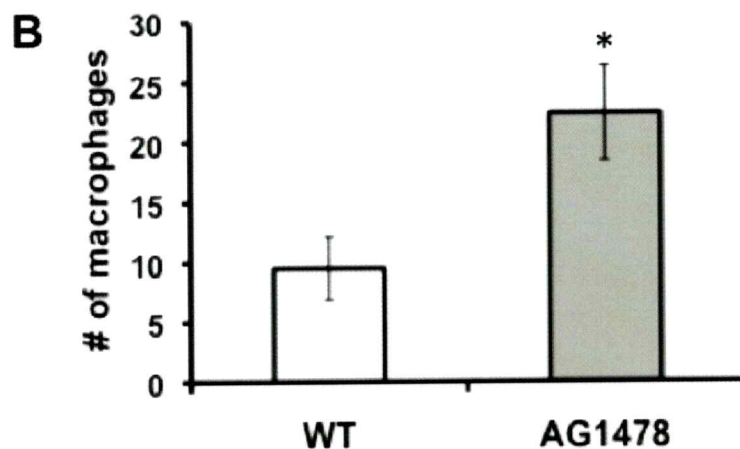
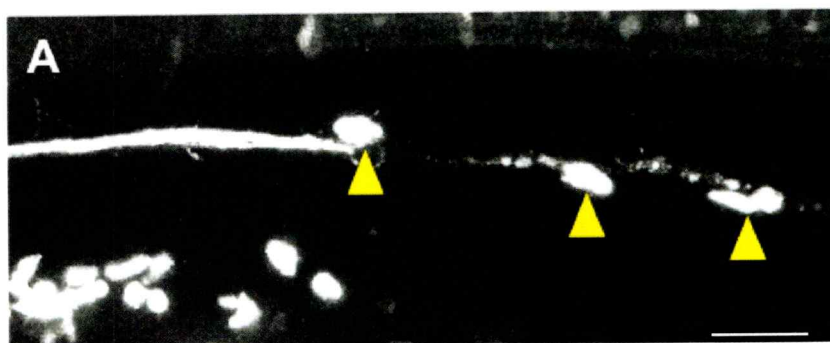


Figura 16. Cuantificación y comparación del contacto de leucocitos en presencia y ausencia de glía. (A) Leucocitos (cabezas de flecha amarillas) haciendo *homing* hacia el área de los axones en degeneración. Escala 40 μ m (B) El número de leucocitos que hacen contacto con los axones en degeneración es significativamente mayor en ausencia de glía (AG1478). Análisis realizado entre las 2.5 y 4.5 horas post axotomía.

Mediante el programa *ImageJ* se cuantificó la fragmentación de los axones durante la degeneración con los distintos tratamientos (tabla 4 y figura 17). Con estos datos, se determinó que la fragmentación axonal se ajusta a una campana de Gauss (figura 18, tablas 5 y 6). Se determinó la estructura paramétrica de los datos y luego se realizó una ANOVA de dos vías (las dos vías son: el tratamiento con drogas (tres niveles de la vía, control, Mo Pu.1 y ausencia de glía) y la otra vía es el tiempo). El resultado de la ANOVA de dos vías es: 1) efecto significativo del tiempo, es decir, en la misma curva el número de fragmentos cambia significativamente con el tiempo, 2) efecto significativo del tratamiento, es decir las curvas entre si son diferentes (todas con todas, control v/s Mo Pu.1 v/s glía, chequeado con el test Bonferroni post hoc), 3) interacción significativa, es decir que hay un efecto combinado entre el tiempo y el tratamiento (cambio de pendiente entre las curvas).

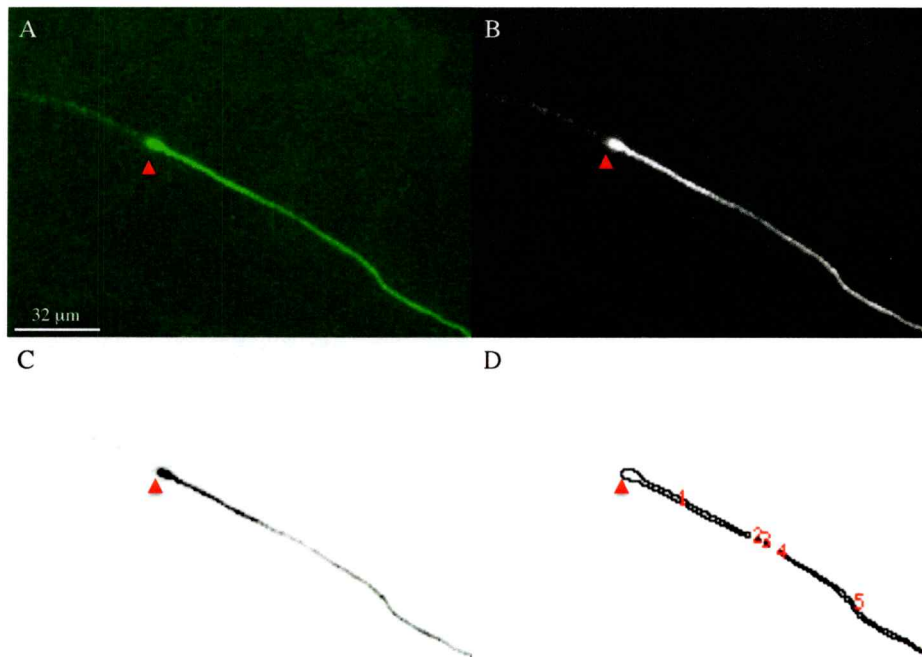


Figura 17. Esquema del proceso de cuantificación de los fragmentos A, área analizada, axón que expresa GFP. Microscopía confocal 20X. B, conversión a escala de grises. C, inversión de colores y ajuste del umbral. D, conteo de los fragmentos con el programa *ImageJ*.

Tabla 4. Cuantificación fragmentos axonales durante la WD

time (min)	CONTROL			MO Pul			No glia		
	MEAN	SD	n	MEAN	SD	n	MEAN	SD	n
30				5	1.4	8			
45	6	4.4	10	6.5	4.9	8			
60				9	4.2	8			
75	7	5.2	10	10	2.8	8			
90				6.5	2.1	8			
105	8	5.5	10	9	4.2	8			
120				11.5	2.1	8	1.1	0.4	10
120							1.3	0.7	10
129									
135	10	5.1	10	12	7.1	8	1.1	0.4	10
138							1.1	0.4	10
147									
150				9.5	7.8	8	1.5	0.5	10
156									
165	12	7	10	14	7.1	8	1.8	0.9	10
165							3	3.4	10
174									
180				16.5	3.5	8	4.5	4	10
183							4.8	4	10
192									
195	10	2.5	10	16.5	2.1	8	6.8	5.1	10
201									
210				16.5	2.1	8	9.6	6	10
210							10.9	6.2	10
219									
225	15	2	10	18	0	8	9	5.1	10
228									
240							7.9	5	10
247				17	0	8			
255	13	4.7	10	17.5	6.4	8	6.9	4	10
266									
270				12	5.7	8			
285	12	8.3	10	13.5	3.5	8	5.8	5.1	10
285									
300				11	1.4	8	4.3	4.1	10
304									
315	9	5.5	10	10.5	4.9	8	4.1	4.4	10
323									
330				11.5	0.7	8	4.3	5.4	10
342									
345	8	2.1	10	8.5	3.5	8			
360				10.5	3.5	8	3.3	3.6	10
361									
375	2	2.1	10	9.5	2.1	8	2.6	3.9	10
380									
390				12	4.2	8	2.1	3	10
399									
405	4	0.7	10	11	4.2	8	1.8	2.5	10
418									
420				10	0	8			
435	4		10	14.5	4.9	8	1.5	2.3	10
437									
450				12	2.8	8	0.8	1.5	10
456									
465	6		10	12.5	2.1	8	0.7	1.3	10
475									
480				11	2.8	8	0.5	1.2	10
494									
495	6		10	12.5	2.1	8			
510				10.5	3.5	8	0.7	1.2	10
513									
525	7		10	10.5	3.5	8	0.3	0.6	10
532									
540				9.5	3.5	8	0	0	10
551									
555				9.5	2.1	8			
570				6	4.2	8	0.3	0.6	10
570									
585				7.5	6.4	8	0	0	10
589									
600				9	4.2	8	0	0	10

Tabla 5. Resultados análisis ANOVA de dos vías

	control	MO Pu1	No glia
Gaussian distribution			
Best-fit values			
AREA	3902	9013	1322
SD	119.6	263.2	60.17
MEAN	214.9	295.8	243.7
Std. Error			
AREA	248.9	488.1	72.28
SD	9.738	18.35	3.809
MEAN	8.031	10.84	3.727
95% Confidence Intervals			
AREA	3415 to 4390	8057 to 9970	1181 to 1464
SD	100.5 to 138.7	227.2 to 299.2	52.71 to 67.64
MEAN	199.1 to 230.6	274.5 to 317.0	236.4 to 251.0
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom	131	309	327
R ²	0.2995	0.1719	0.4015
Absolute Sum of Squares	3002	6114	3726
Sy.x	4.787	4.448	3.376
Number of points			
Analyzed	134	312	330

Tabla 6. Resultados ajuste de curva gaussiana.

	control	MO Pu1	No glia
Gaussian			
Best-fit values			
AMPLITUDE	11.99	14.69	7.839
MEAN	195.7	168.4	246.6
SD	174.8	417.5	64.36
Std. Error			
AMPLITUDE	0.6687	0.8829	0.7133
MEAN	32.56	166.9	7.206
SD	29.77	224.8	7.843
95% Confidence Intervals			
AMPLITUDE	10.66 to 13.31	12.93 to 16.45	6.426 to 9.252
MEAN	131.2 to 260.2	-163.5 to 500.3	232.4 to 260.9
SD	115.8 to 233.8	0.0 to 864.7	48.82 to 79.90
Goodness of Fit			
Degrees of Freedom	117	93	117
R²	0.2728	0.07796	0.349
Absolute Sum of Squares	2712	2244	1443
Sy.x	4.814	4.912	3.511
Constraints			
SD	SD > 0.0	SD > 0.0	SD > 0.0
Number of points			
Analyzed	120	96	120

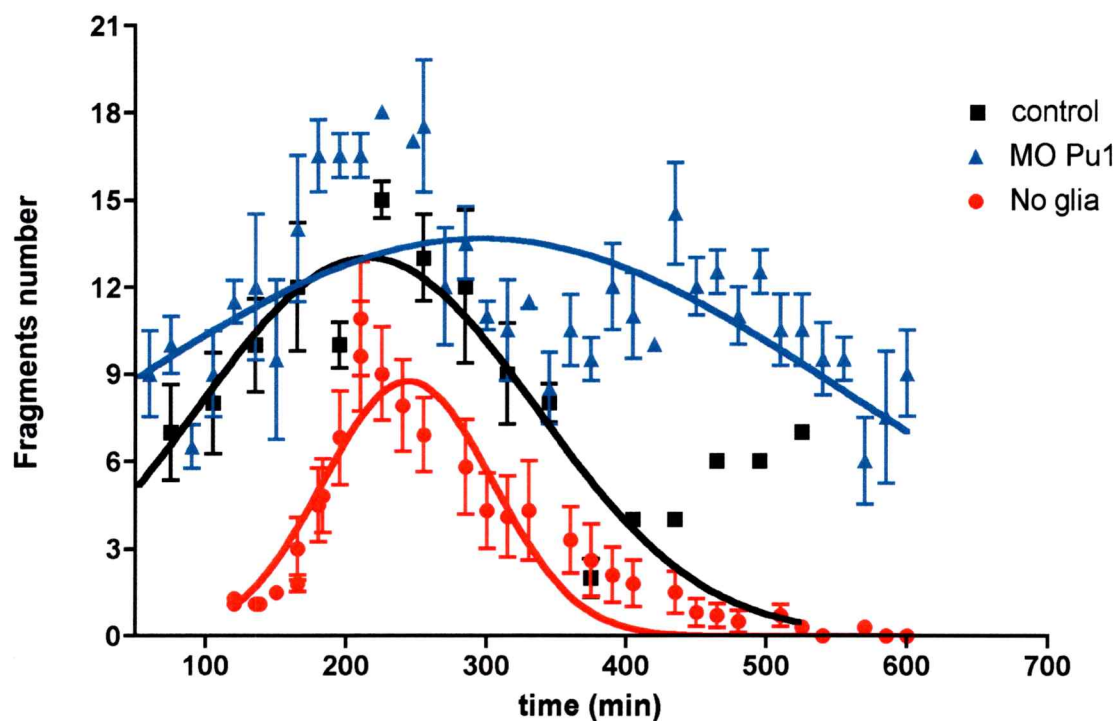


Figura 18. Cuantificación y comparación del número de fragmentos axonales durante la WD, con distintos tratamientos. Se cuantificaron los fragmentos axonales, se ajustaron las curvas y se compararon entre ellas (ver texto y materiales y métodos). Las 3 curvas son significativamente distintas entre sí. MO Pu1, implica ausencia de leucocitos. No glia, implica ausencia de células de Schwann.

3. 2 Objetivo 1.b. Determinar el destino de los neuromastos y, en particular, de las células ciliadas, luego de su denervación.

La expresión de GFP en las larvas transgénicas *brn3c:GFP*, comienza cuando las células ciliadas han comenzado a diferenciarse. Este hecho nos permitió observar la diferenciación de éstas células durante la degeneración axonal. Realizamos análisis de *time-lapse* en larvas *brn3c:GFP* post axotomía, enfocándonos en el primer neuromasto. Se observó que en el total de larvas analizadas (n=14) las células ciliadas se diferencian cuando los axones han degenerado post-axotomía (figura 19, película 4 disco adjunto, n= 15 larvas).

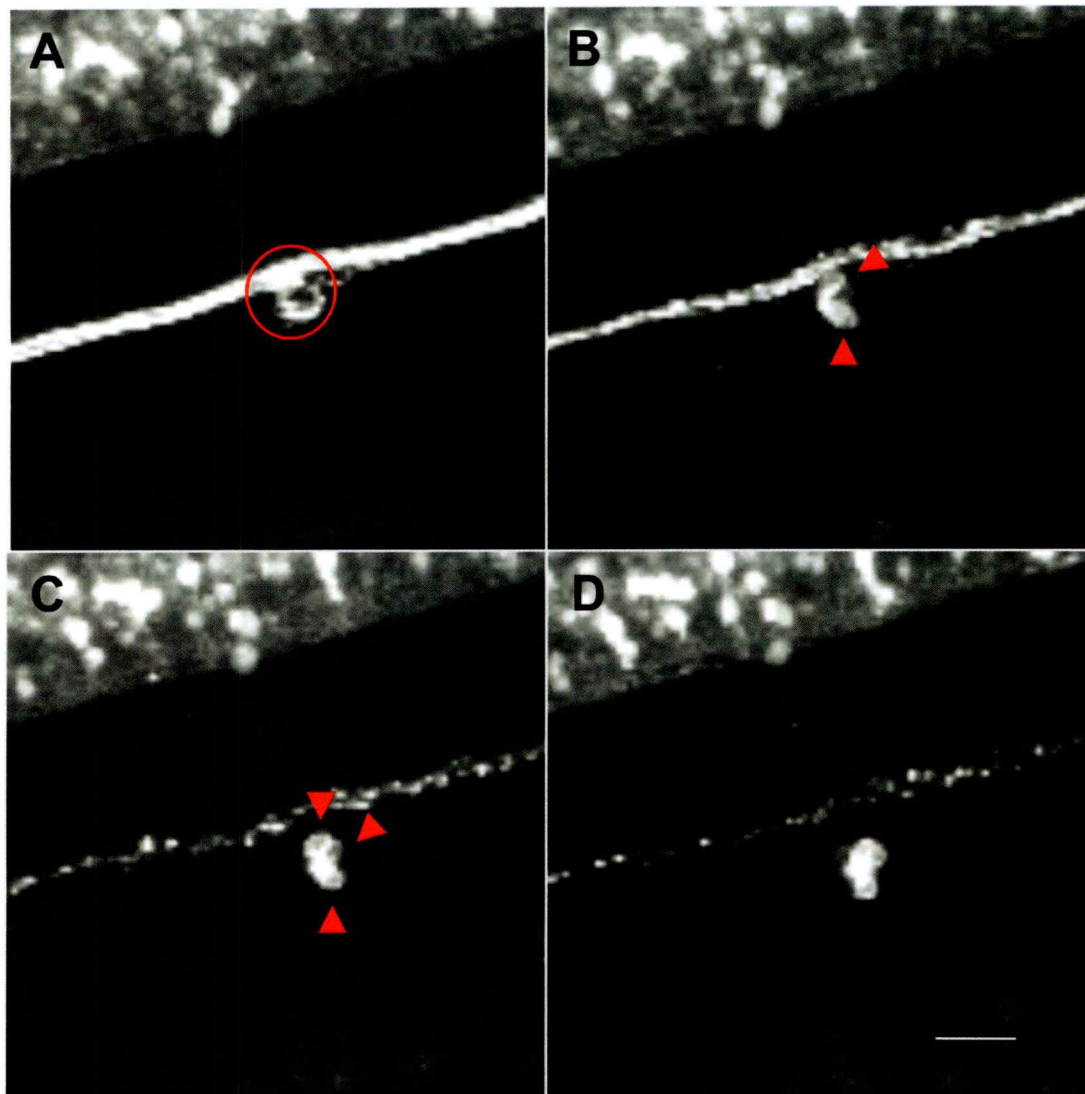


Figura 19. Diferenciación de células ciliadas en ausencia de inervación. Larvas transgénicas de 3dpf, que expresan GFP en las células ciliadas y en los axones de la LLP. A, al tiempo cero post axotomía, sólo se observan los axones y los terminales sinápticos que inervarán a las células ciliadas. B, 2 horas post axotomía se observan 2 células ciliadas (cabezas de flecha roja) y el nervio empezando a fragmentarse. C, 3 horas post axotomía se observan 3 células ciliadas. D, 4 horas post axotomía, se observa la degeneración total de los axones y la presencia de un grupo definido de células ciliadas. Microscopía confocal 20x. Escala 60 μm .

De manera similar se analizó la regeneración de las células ciliadas luego de su eliminación con CuSO_4 . Se observó que la totalidad de las larvas regeneran las células ciliadas en ausencia de inervación (figura 20, película 5 disco adjunto, $n=16$).

Además, se fijaron larvas a las 3 y 6 horas post axotomía y se cuantificó el número de células ciliadas en el primer neuromasto de la LLP. La comparación estadística (ANOVA de dos vías, $p < 0,05$) arrojó que no existen diferencias significativas entre el número de células ciliadas de controles con el nervio intacto y de larvas axotomizadas (figura 21).

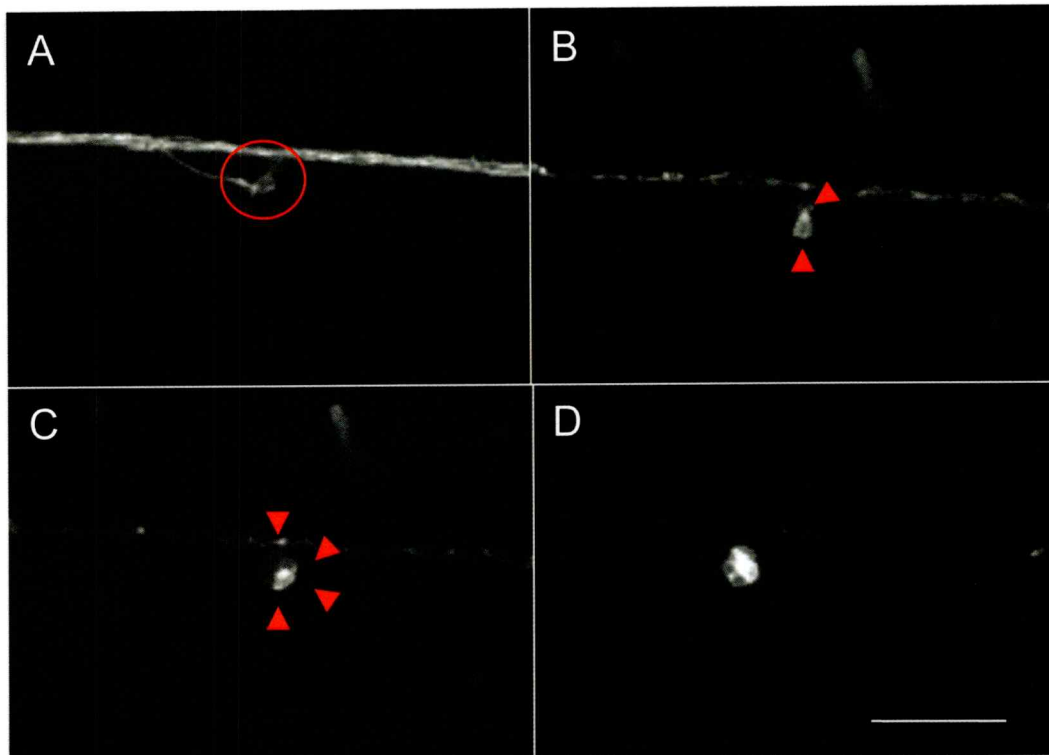


Figura 20. Regeneración de células ciliadas en ausencia de innervación. Larvas transgénicas de 3dpf, *brn3c::GFP* x *neuroD::GFP*, que expresan GFP en las células ciliadas y en los axones de la LLP. A, cero horas post tratamiento con cobre, las células ciliadas se han eliminado, sólo se observan los axones y las neuritas que innervaban a las células ciliadas (círculo rojo). B, 3 horas post axotomía se observan 2 células ciliadas (cabezas de flecha roja). C, 5 horas post axotomía se observa la regeneración de 4 células ciliadas. D, 6 horas post axotomía, se observa la degeneración total de los axones y la presencia de un grupo definido de células ciliadas. Microscopía confocal 20x. Escala 100 μ m.

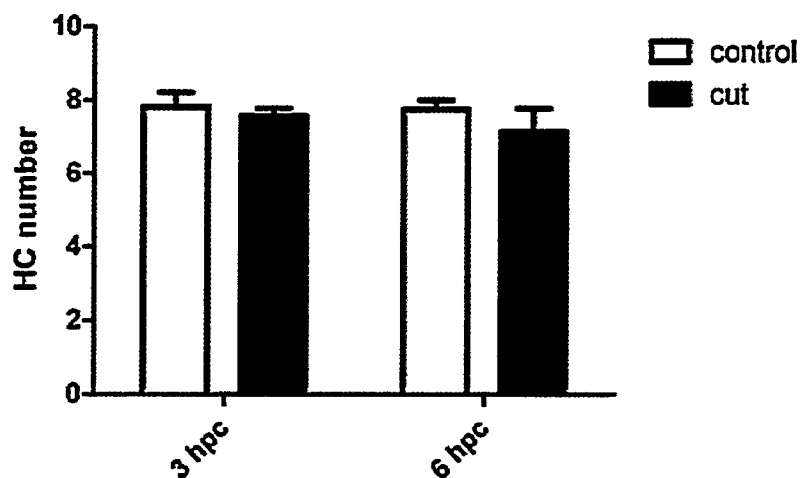
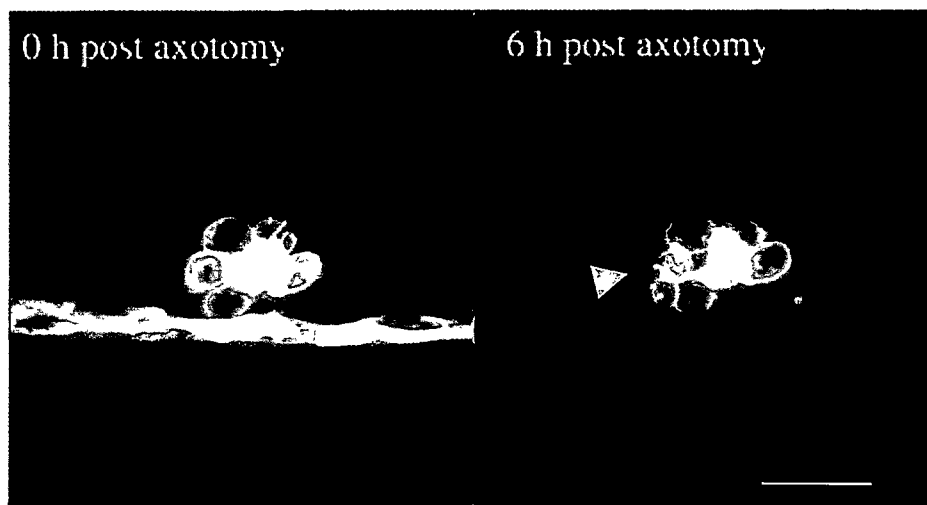


Figura 21. Cuantificación de células ciliadas durante la WD. Panel superior: neuromasto de una larva de 3 dpf que expresa GFP tanto en axones, como en células ciliadas. A las 6 horas post-axotomía la flecha indica una célula muriendo. Panel inferior: cuantificación y comparación de las células ciliadas (HC) 3 y 6 horas post corte (hpc), no se observan diferencias significativas con el control. ANOVA de dos vías $p > 0,05$. Microscopía confocal 40X. Escala 50 μm .

3. 3 Objetivo 1.c. Estudiar el patrón de reinervación luego de dañar el nervio.

Se ha descrito en diversos modelos que los axones de nervios periféricos son capaces de regenerar luego de algún daño que los desconecta del soma neuronal (Vargas y

Barres col. 2007). Sin embargo el estudio detallado de este fenómeno carece de resultados *in vivo*. Por lo tanto, este objetivo pretende caracterizar la regeneración de los axones de la línea lateral *in vivo*, específicamente con respecto a la trayectoria y velocidad de reinervación post corte.

Con la metodología de axotomía y *time-lapse* usada anteriormente, se determinó que las neuritas de los axones comienzan a crecer, luego de que los restos axonales han sido removidos (figura 22, película 7 disco adjunto, n=15), aproximadamente a las 10 horas post axotomía. Además, los axones en crecimiento siguen el camino del nervio original ya degenerado (figura 22). También, se midió la velocidad de regeneración del nervio, la cual fue de 0,5 $\mu\text{m}/\text{min}$. En 24 horas post axotomía se observó la total y correcta regeneración del nervio de la LLP.

Para determinar la participación de las células gliales durante la regeneración axonal, se utilizó el inhibidor AG1478 y el mutante *leol*, los cuales no presentan células de Schwann. Se realizó la axotomía en estas larvas a los 3 dpf, y se estudió la regeneración de los axones por *time-lapse* hasta los 4dpf. En el total de larvas tratadas con el inhibidor (n=9) y en los mutantes (n=7) se observó que los axones no siguieron el camino original, se desviaron hacia el vitelo y la zona dorsal (figura 23, película 8 disco adjunto).

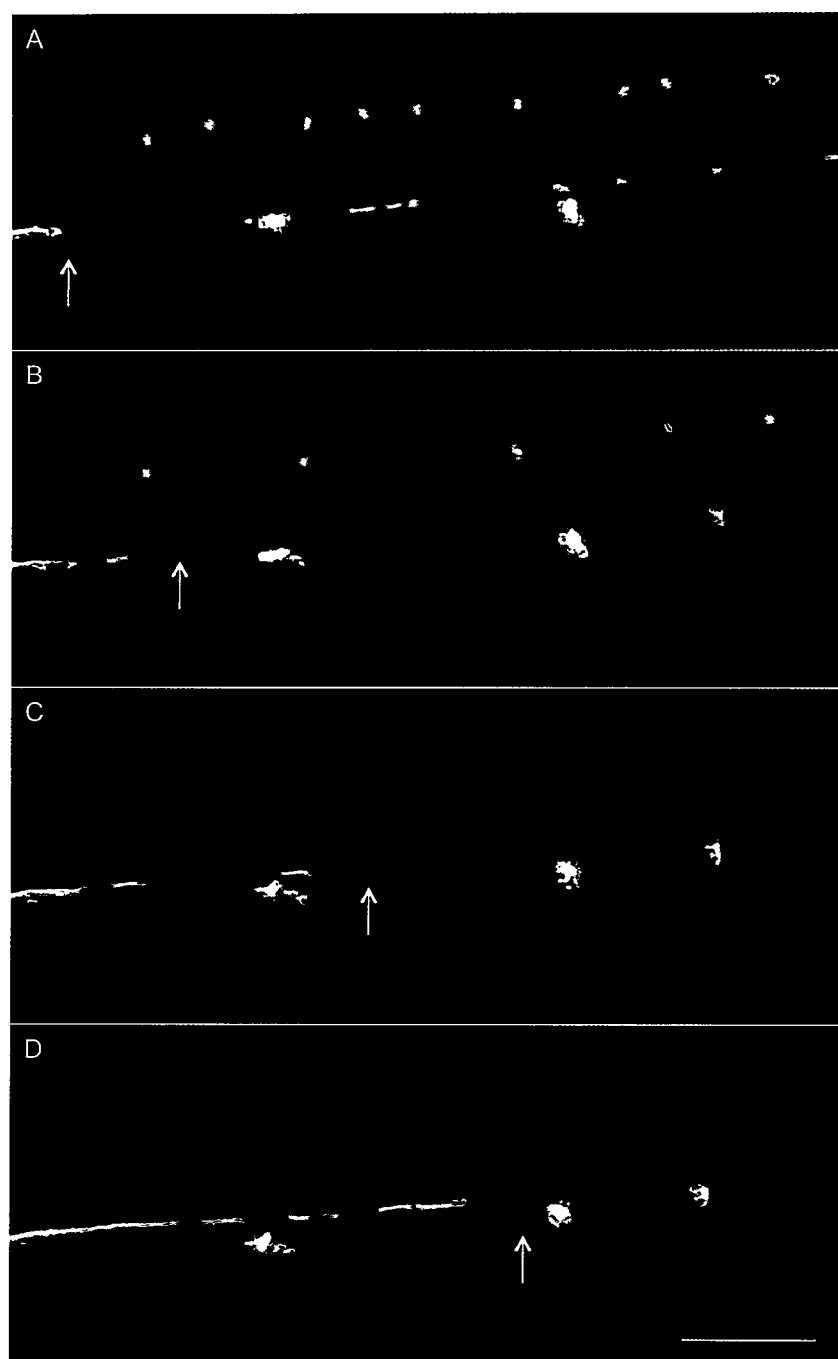


Figura 22. Regeneración axonal post-lesión. Larvas transgénicas de 3dpf, *brn3c::GFP* x *neuroD::GFP*, que expresan GFP en las células ciliadas y en los axones de la LLP. A, B, C, D, secuencia de crecimiento de los axones de la LLP. Microscopía confocal 20x. Escala 100 μ m.

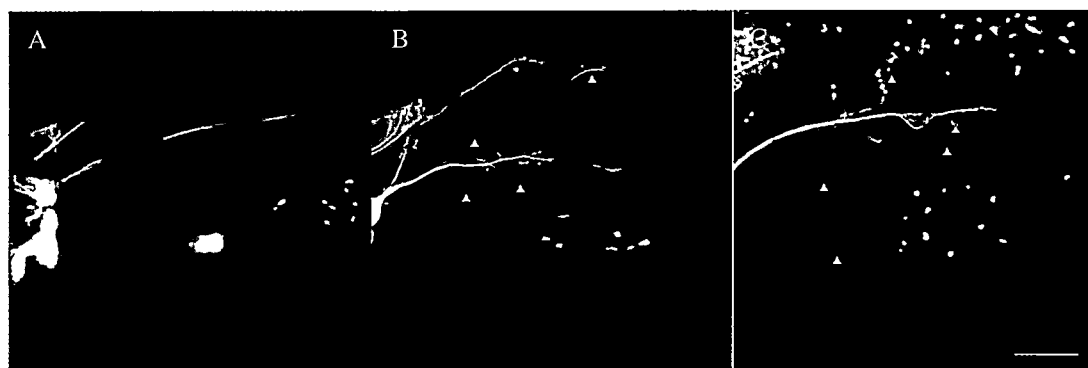


Figura 23. Regeneración axonal en ausencia de células de Schwann. Larvas transgénicas neuroD:GFP de 4dpf, axotomizadas a los 3dpf. (A) En las larvas controles se observa que todos los axones crecen delimitados por el miosepto horizontal del pez. (B) Larva expuesta al inhibidor AG1478, n=9. (C) Larva mutante *leo1*, n=7. En ausencia de células gliales (B y C) las neuritas crecen por rutas distintas a las del nervio original (cabezas de flechas rojas).

3.4 Objetivo 2.a. Estudiar el patrón de reinervación al cortar el nervio y eliminar las células ciliadas.

En este objetivo se estudió la participación de las células ciliadas durante la regeneración del nervio luego del corte de éste. Para esto, se eliminaron las células ciliadas de distintas maneras, luego se realizó la axotomía del nervio en larvas de 3 dpf y se analizaron los resultados por microscopía confocal *time-lapse*. Se midió la velocidad de regeneración de los axones y la trayectoria de estos, utilizando el programa *Image J*.

Como primera aproximación se eliminaron las células ciliadas con 50 μM de CuSO_4 , lo cual permite la regeneración de estas células sensoriales luego del tratamiento. Al comienzo los axones crecen siguiendo una ruta errática (diferente a la ruta directa, seguida originalmente por el nervio en desarrollo). Sin embargo, cuando las células

ciliadas regeneran, los axones en crecimiento retoman el rumbo correcto (figura 24, película 5 disco adjunto).

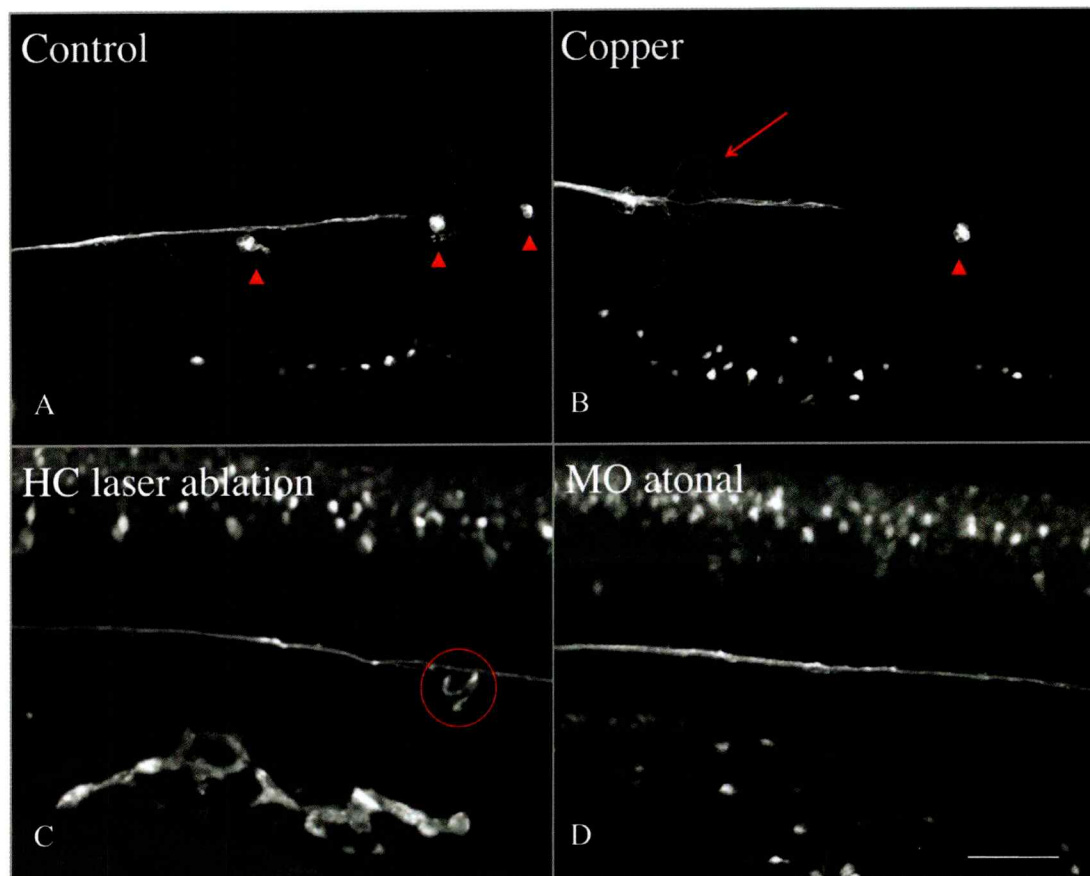


Figura 24. Regeneración axonal en ausencia de células ciliadas. Embriones de 24 horas post axotomía con diferentes tratamientos para eliminar las células ciliadas. (A) larva control. (B) La eliminación de células ciliadas con CuSO_4 produce un navegación errática (flecha roja), que se normaliza cuando las células ciliadas regeneran. (C) La ablación por láser (círculo) y (D) la inhibición de la diferenciación de las células ciliadas con el morfolino athonal (MO atonal) muestran reinervación correcta. HC, células ciliadas. Escala $100\mu\text{m}$.

Una segunda herramienta usada para eliminar las células sensoriales fue mediante el láser con el cual realizamos las axotomías. Se eliminaron todas las células ciliadas de los 8 neuromastos de un lado de la larva con el láser de dos fotones. Luego se realizó la axotomía del nervio de la LLP en ese mismo lado. Los análisis por *time-lapse*

mostraron que no hay diferencias en la trayectoria de regeneración del nervio post lesión (figura 24 C, película 9).

Usamos, en tercera instancia, la eliminación genética de las células ciliadas. Una herramienta bastante utilizada por investigadores que trabajan usando el modelo del pez cebra son los morfolidos. Un morfolino es un RNA antisentido que hibrida con el RNA específico contra el cual fue diseñado e impide su traducción, bloqueando de manera específica la expresión del RNA deseado.

Se inyectó en estadio de una célula el morfolino contra el gen atonal homólogo 1 (MO atonal), el cuál impide es desarrollo y diferenciación de las células ciliadas, tanto en peces como en ratón (Sarrazin y col. 2006; Bermingham y col. 1999). Al igual que en los experimentos de ablación mecánica (láser) de las células ciliadas, se observó que la trayectoria de regeneración de los axones eran similares a los controles (figura 24 D, película 10).

En los tres ensayos de eliminación de células ciliadas descritos y en los experimentos de eliminación de las células de Schwann con el inhibidor AG1478, se midió y comparó la velocidad de crecimiento axonal y no se observaron diferencias significativas (figura 25).

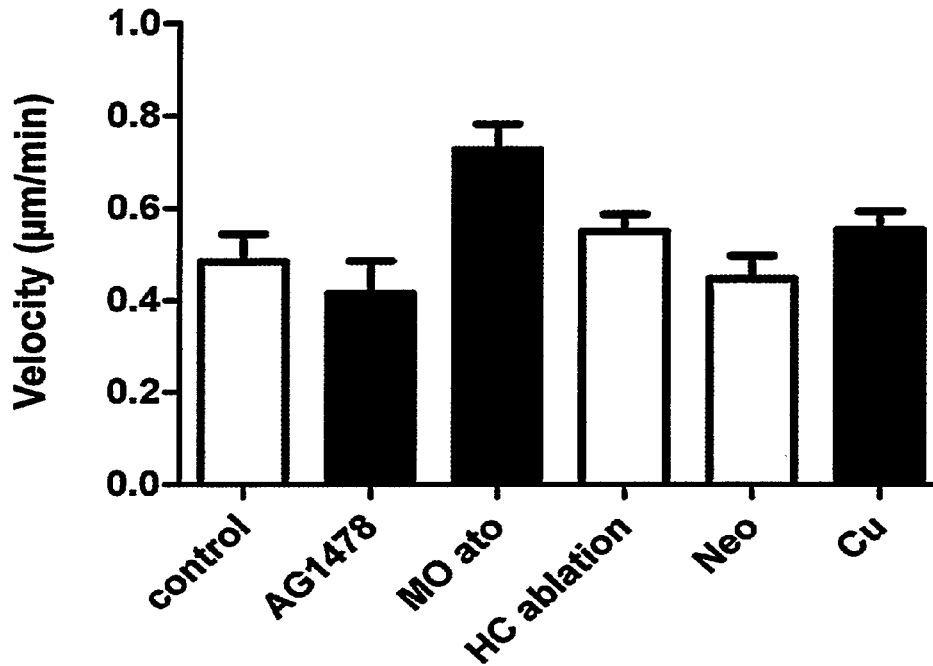


Figura 25. Comparación de la velocidad de regeneración axonal con distintos tratamientos. El promedio de velocidad de reinervación no muestra diferencias significativas con el control. Análisis de varianza no paramétrico. $p < 0,05$.

Para determinar la diferencia en la trayectoria de los axones, se cuantificaron las neuritas fuera del miosepto horizontal (determinando esta área como tres diámetros de nervio hacia dorsal y ventral de las larvas de éste, cabezas de flecha rojas en figura 23 B y C). Este análisis se realizó en las larvas sin células de Schwann (con inhibidor AG1478) y sin células ciliadas, eliminándolas con CuSO_4 e impidiendo su diferenciación con el morfolino contra atonal homólogo 1 (figura 26).

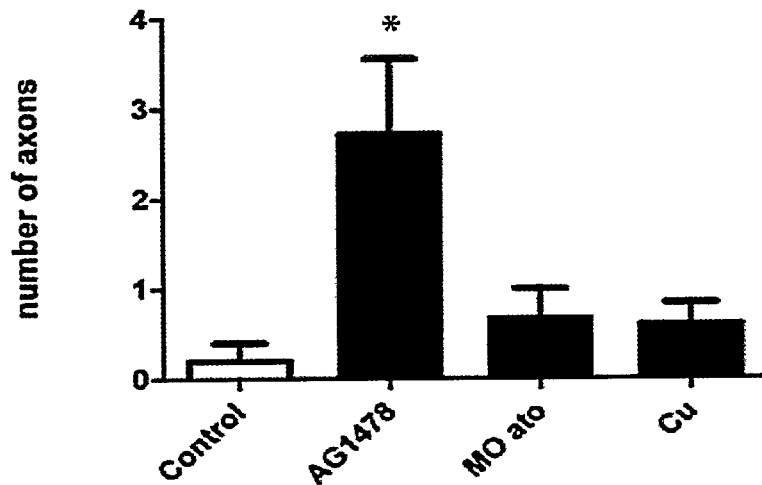


Figura 26. Cuantificación y comparación del número de axones fuera del área del miosepto con 3 diferentes tratamientos. La ausencia de células de Schwann muestra axones fuera del área (AG1478 en el gráfico); eliminación de las células ciliadas con cobre (Cu) e inhibición de la diferenciación de las células ciliadas con el morfolino contra athonal1 (MO ato) no muestran diferencias con el control. (*) diferencias significativas. ANOVA no paramétrica de una vía, $p < 0,05$.

3.5 Objetivo 3. Evaluar la función de factores candidatos a participar en la regeneración axonal post corte.

El factor neurotrófico derivado de cerebro, BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*) es una proteína que participa en la sobrevivencia de neuronas ya existentes, fomenta el crecimiento y diferenciación de neuronas y la formación de nuevas sinapsis. Además, se ha descrito que NGF y BDNF son sobreexpresados luego de daños en nervios periféricos, pero su participación durante la regeneración de éstos no está clara (Makwana y Raivich 2005, Markus y col. 2002, Snider y col. 2002).

Se ha descrito que BDNF se expresa en las células ciliadas, tanto en el oído interno de ratón, como en la línea lateral del pez cebra (Schechter y col. 2004; Hashimoto y col. 1997). Además, se ha descrito que la sobre-expresión de esta proteína promueve la re-inervación en ratones sordos con implantes de células ciliadas (Wise y cols, 2010).

Para determinar la participación de esta neurotrofina en la regeneración axonal post-daño, se realizó un *knockdown* utilizando un morfolino específico contra esta molécula y luego se realizó el mismo ensayo de axotomía y análisis por *time-lapse*. Se observó que en los morfantes de BDNF no hubo regeneración de los axones de línea lateral (figura 27, película 11).

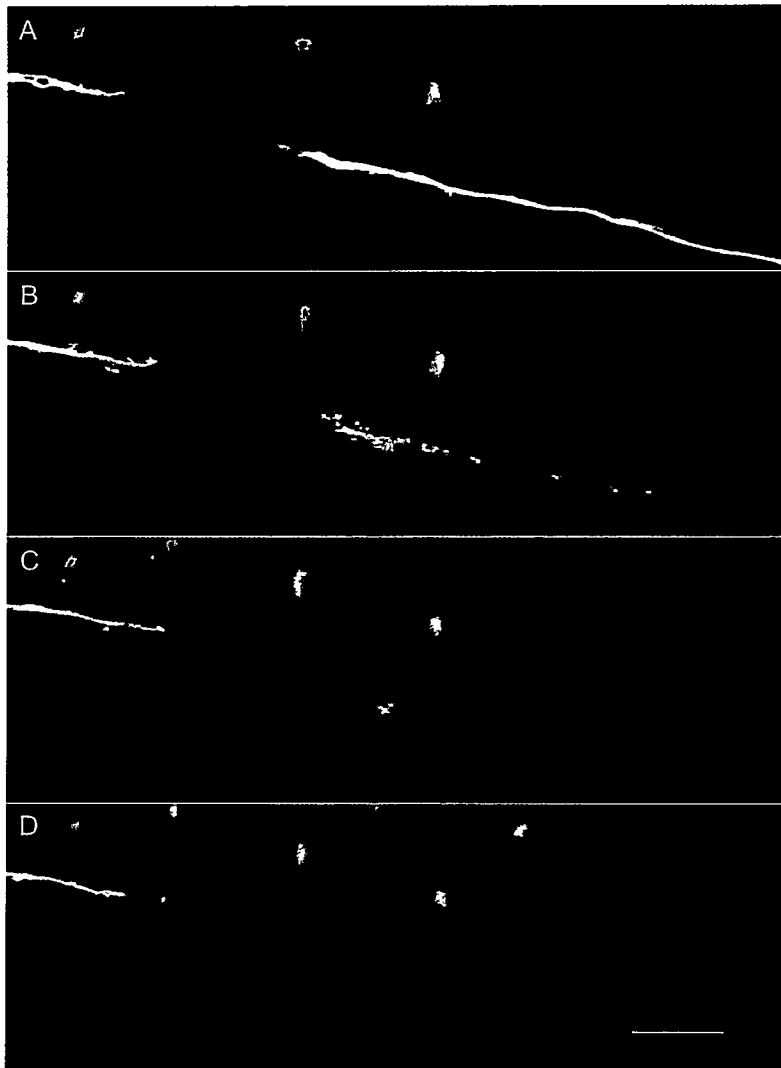


Figura 27. Morfantes BDNF post axotomía. Se muestra el mismo espécimen seguido en el tiempo. (A,B y C) se observan las fases de la WD. (D) 20 horas post axotomía no se observa regeneración de los axones (comparar con figura 22 control). Microscopía confocal 20x. Escala 100 μ m.

4. DISCUSIÓN

En esta tesis, nos interesó indagar en los mecanismos que gobiernan la regeneración axonal en un sistema periférico en el pez cebra, de modo de establecer la identidad de los componentes celulares y moleculares que participan. Por un lado, los resultados de esta investigación muestran que la regeneración de los axones de la línea lateral del pez cebra es independiente de la presencia de sus células blanco: las células ciliadas.

Para demostrar esto, fue necesario establecer un protocolo reproducible de axotomía del nervio de la LLP y caracterizar los procesos de degeneración y regeneración del nervio de la línea lateral post corte. Se determinó que los axones de la LLP del pez cebra sufren degeneración Walleriana luego de ser desconectados del soma. Este es el primer reporte que caracteriza detalladamente este tipo de degeneración en un modelo vertebrado *in vivo*. Los estudios desarrollados hasta ahora han descrito este proceso en modelos experimentales *in vitro* o *ex vivo* tales como muestras fijadas (Waller, 1850) cultivos celulares (Caroni y Schwab 1988, Schwab y Caroni 1988, Vanselow y col. 1990), explantes de tejido (George y col. 1995, Sievers y col. 2003, Zhai y col. 2003), etc.

Los factores existentes en cultivo celular son, en su mayoría, variables manipuladas. Lo cual presenta las ventajas permitir el control preciso y fino del ambiente celular (por ejemplo: temperatura, factores de crecimiento, densidad celular, etc.),

proporcionan una muestra de células homogénea y caracterizada, presentan economía en el uso de reactivos o drogas a estudiar pues al realizarse en volúmenes reducidos, y con un acceso directo de las células a la droga las concentraciones requeridas son mucho más bajas que en el animal completo, etc. (Freshney, 1987). Sin embargo, es una técnica sensible a contaminación, además las células son incapaces de crecer en ausencia de una compleja mezcla de nutrientes que simula el plasma intersticial (Freshney, 1987).

Por otra parte, aunque en los explantes se mantiene el contexto celular y el ambiente local cercano, estos no presentan la respuesta sistémica que desencadena un evento como una lesión en un nervio.

Es por estas razones que la metodología de visualización *in vivo*, implementada en el organismo completo, abre una serie de posibilidades en el estudio de estos temas. Como por ejemplo, la descripción de procesos patológicos, la evaluación de la eficiencia y el mecanismo de intervenciones terapéuticas destinadas a prevenir la degeneración o para promover la regeneración. La visualización *in vivo* no presenta muchas de las limitaciones de los métodos convencionales de seguimiento, ya que permite confirmar directamente la desconexión total de los axones, permite describir el comportamiento de crecimiento de las neuritas, el cual muchas veces corresponde a un movimiento de extensión-retracción y permite una visión mecanicista deducible de una observación continua en el tiempo. El desarrollo del modelo de axotomía y regeneración del nervio de la línea lateral en el pez cebra ofrece todas las ventajas mencionadas para los estudios *in vitro*, con el análisis dentro del contexto que permite obtener conclusiones biológicamente relevantes. Además, de manera más general, cómo los axones responden a una lesión en el pez cebra podría extrapolarse al estudio

de patologías como traumatismo de la médula espinal, esclerosis múltiple y esclerosis lateral amiotrófica.

En este mismo punto es de interés mencionar que el láser utilizado para realizar la axotomía genera un daño solo en el plano y en las coordenadas en donde es enfocado. Es decir, los tejidos vecinos no presentan daño alguno, escenario homologable al fenómeno descrito en las enfermedades, lesiones o accidentes vasculares asociados al modelo (Neumann y col. 2002).

El pez cebra se caracteriza por regenerar diversos tejidos y estructuras (Poss y col. 2003). Al respecto, esta tesis describe y caracteriza por primera vez la regeneración de los axones post-lesión en la línea lateral del pez cebra. El proceso de regeneración axonal comienza inmediatamente después de la degeneración del fragmento axonal desconectado del cuerpo celular (figura 26). De nuestras observaciones, se desprende que el proceso ocurre de manera similar a lo descrito en invertebrados (Yanik y col. 2004) y algunos vertebrados (Pardo-Martin y col. 2010, O'Brien y col. 2009) en los nervios de diversas neuronas del sistema nervioso periférico. Determinamos que las nuevas neuritas comienzan a crecer por la "vía" original a una velocidad de $0,5\mu\text{m}/\text{min}$ y reinervan a las células ciliadas completando el "recorrido" total de la línea lateral a las 24 horas post axotomía, período mucho menor a lo descrito anteriormente en el sistema nervioso periférico y central de ratón, los cuales crecen a velocidades de $0,2\mu\text{m}/\text{min}$ y $0,07\mu\text{m}/\text{min}$ respectivamente (Kerschensteiner y col. 2005).

El crecimiento de los axones lesionados comienza luego de la eliminación de los fragmentos axonales por macrófagos. Los resultados muestran que en ausencia de estas células fagocíticas los fragmentos se mantienen por un período

significativamente mayor en comparación con los controles (Figura 14). Esto sugiere que los leucocitos son los principales encargados de fagocitar los restos axonales.

Numerosas evidencias en el SNP de ratón describen la acción conjunta de macrófagos y células gliales en la eliminación, tanto de fragmentos axonales, como mielínicos (Shamash y col. 2002, Banner y Patterson 1994, Liu y col. 1995, Hirata y col. 1999).

Sin embargo, los resultados de este trabajo mostraron que en ausencia de células de Schwann los restos axonales fueron removidos sin problemas (figuras 14 y 18). Si bien, no podemos descartar un rol de las células de Schwann en la fagocitosis de restos axonales, su dispensabilidad indica que su participación es limitada.

De manera interesante, se observó que las células de Schwann son esenciales para la correcta navegación del nervio de la LLP en crecimiento regenerativo. En ausencia de estas células, las neuritas crecen erráticamente y no logran inervar a las células ciliadas. Diversos estudios han demostrado que estas células secretan factores inductores del crecimiento de los axones (revisado en Vargas y Barres, 2007). Uno de estos factores podría ser BDNF, y nuestros resultados muestran por primera vez *in vivo* que BDNF es necesario para la regeneración del nervio de la LLP del pez cebra. Sin embargo, no podemos distinguir si el rol de BDNF es primordialmente en la guía de los axones en crecimiento o es necesario para el crecimiento *per se*.

4.1 Ventajas del estudio de la degeneración y regeneración axonal en la LLP.

En este trabajo se determinó el tiempo en el cual ocurren los fenómenos de degeneración y regeneración en este modelo, los cuales son extremadamente rápidos, en comparación con modelos caracterizados anteriormente. Por ejemplo, la fase *lag*

en el SNP de ratón tarda de 1 a 1,5 días después de la axotomía (Beirowski y col. 2005, Kerschensteiner y col. 2005.), fenómeno que en larvas de pez cebra demora 3 horas, aproximadamente. La eliminación de los fragmentos axonales, es decir la degeneración completa de los axones, demora en promedio 5 horas. El hecho de que en solo 5 a 6 horas post-corte se pueda determinar si se ha producido la degeneración Walleriana, permite pensar en estrategias de mediano a intenso calibre (*medium to high-throughput*), así como ahorros y eficiencias producto del menor uso de drogas, y un mayor número de animales.

Estas características, sumadas a las ventajas ya conocidas del pez cebra, tales como ser un modelo vertebrado, poseer el genoma secuenciado, tener un ciclo de vida corto y la obtención de un gran número de ejemplares por puesta, nos permiten proponer al pez cebra como un excelente modelo para el estudio de la degeneración y regeneración axonal a gran escala.

4.2 Cuantificación y comparación de la fase de fragmentación de la WD

Un importante aporte de esta tesis es la cuantificación y comparación del fenómeno de degeneración axonal. Considerando el análisis del número de fragmentos, el ajuste gaussiano simple da cuenta del 95% de la varianza de los datos, valores que se corresponden con un modelo estadísticamente confiable (Figura 18).

La cuantificación de los fragmentos y el ajuste de los datos a una curva y la comparación estadística, permiten realizar un análisis robusto y confiable de los resultados obtenidos con distintos tratamientos.

La curva gaussiana que describe el número de fragmentos en el tiempo, en animales control, coincide con los resultados observados y esperados a partir de los registros en tiempo extendido, *time-lapse* (figura 18). Es decir, luego del corte existe sólo una pieza axonal distal, la cual luego de aproximadamente 3 horas, genera un máximo de fragmentos (máximo en la curva), el cual disminuye de manera paulatina, debido a la eliminación por los fagocitos. Luego de 6 horas post axotomía, todos los fragmentos se han eliminado.

La curva de Gauss descrita al eliminar las células de Schwann presenta una media y amplitud similar al control. Sin embargo, los primeros valores y el máximo son diferentes (figura 18), lo cual implica que en ausencia de las células de Schwann la fragmentación axonal ocurre en un período de tiempo similar, pero el número de fragmentos es menor. Este fenómeno podría explicarse por la participación activa de las células de Schwann, específicamente "cortando" el fragmento distal en fragmentos más pequeños, o bien secretando factores que induzcan dicho corte.

Se ha estudiado que las células gliales eliminan y degradan la mielina luego de un daño axonal (Holtzman y Novikoff 1965, Han y col. 1989, Hirata y col. 1999). Sin embargo, la participación directa o indirecta en la desintegración del citoesqueleto no ha sido descrita previamente. Por lo tanto, este resultado sugiere la participación de las células de Schwann en la DGC. Probablemente, esta corresponda a una participación indirecta, debido a la influencia de las células de Schwann sobre los macrófagos, por medio de las citoquinas que liberan.

Por otra parte, la curva que describe la fragmentación axonal en el tiempo al eliminar los leucocitos se ajusta a una gaussiana, pero con un decaimiento más lento (figura 18). Es decir, el número de fragmentos axonales se mantiene en el tiempo. Este

resultado confirma las observaciones previas y reafirma el hecho de que son los macrófagos las principales células encargadas de eliminar los restos axonales.

La comparación de los datos concuerda con los resultados observados, lo que permite obtener resultados concluyentes, comparar entre distintos tratamientos y facilitar futuros experimentos utilizando este método ya estandarizado.

4.3 Eliminación de los fragmentos por los macrófagos

Tanto el análisis de imágenes, como la cuantificación de los fragmentos y área de los axones durante la degeneración mostraron diferencias significativas al eliminar a los leucocitos del organismo completo (figuras 14 y 18).

Se ha descrito en otros sistemas que los macrófagos participan en la eliminación de residuos celulares post-lesión fagocitando tanto restos axonales como mielínicos que han sido opsonizados. Las opsoninas son moléculas que cubren extracelularmente y de esta manera “marcan” a los residuos de nervio para ser fagocitados por los macrófagos. Los macrófagos expresan receptores en su superficie que reconocen opsoninas específicas (Bruck y Friede 1990, Friede y Bruck 1993).

Si bien se demostró que los leucocitos son los responsables principales de la eliminación de los fragmentos axonales, la aproximación experimental no permite dilucidar el mecanismo mediante el cual las células fagocíticas estarían actuando. Por lo tanto, son necesarios más experimentos para determinar si los macrófagos son el único tipo celular que esta fagocitando restos axonales y mielínicos y cuales son los mediadores moleculares implicados en este proceso.

4.4 Participación de las células de Schwann en la regeneración.

Se ha descrito el papel fundamental de las células de Schwann durante la regeneración axonal post-daño (Vargas y Barres, 2007, Nguyen y col. 2002). Una vez denervadas, las células de Schwann proliferan y la membrana basal del tejido conectivo restante forma tubos endoneurales. Esta nueva formación estructural recibe el nombre de “bandas de Büngner” (Dyck y Hopkins 1972, Thomas y King 1974). Estas bandas forman una guía estructural por la cual los axones crecen (Nguyen y col. 2002). Además, diversos estudios muestran que luego de una lesión nerviosa, las células de Schwann sobre-expresan factores neurotróficos, entre ellos BDNF (Frostick y col. 1998). En esta tesis se ha demostrado la participación esencial de las células de Schwann en la correcta regeneración axonal. En ausencia de estas células la regeneración no se ve afectada en cuanto a la velocidad de crecimiento (figura 25). Sin embargo, la trayectoria de las neuritas es completamente aberrante. Estas crecen hacia dorsal y ventral y no se retraen, a pesar de no encontrar su *target* (figura 23). El crecimiento erróneo observado en ausencia de células de Schwann en los axones de la LLP, se podría explicar por la ausencia de las bandas de Büngner y/o la falta de generación de BDNF por parte de ellas. Estos resultados son consistentes con los experimentos de pérdida de función de esta proteína, en los cuales se detiene por completo la regeneración del nervio de la LLP. Tomados juntos, los resultados sugieren que esta neurotrofina es esencial para activar los mecanismos de regeneración post daño. La sobreexpresión de BDNF en las células de Schwann luego de una lesión nerviosa, explicaría tanto los resultados obtenidos en ausencia de estas células como los del bloqueo de la neurotrofina. Al eliminar las células de Schwann,

BDNF aún se expresa en distintos territorios del pez, como por ejemplo en el cerebro (datos no mostrados, Hashimoto y col. 1997). Esta alza en la expresión de BDNF podría explicar el crecimiento errático de los axones, suponiendo que el crecimiento durante la reinervación fuese guiado hacia los tejidos con mayores niveles en las cercanías de la línea media del flanco de la larva. Por otro lado, el bloqueo con el morfolino de BDNF inhibe la traducción de la proteína en todo el pez, lo cual explicaría la detención completa de la regeneración. Sin embargo, nuevas aproximaciones experimentales son necesarias para confirmar estos hechos.

Un trabajo reciente del grupo del Doctor Alain Ghysen (Universidad de Montpellier, Francia) determinó el rol fundamental de GDNF en la guía axonal durante el desarrollo y regeneración del nervio de la LLP (Schuster y col. 2010). Sus resultados contrastan con los nuestros ya que ellos describen que en ausencia de células de Schwann los axones regeneran siguiendo la línea de células interneuromásticas y demuestran que esta guía está dada por GDNF. Sin embargo, el método de eliminación de células de Schwann es distinto, ya que ellos eliminan sólo parte de estas células (las presentes entre los neuromastos I y II) por medio de un láser, lo cual podría dejar restos de éstas y la proliferación producto de la axotomía podría reemplazarlas. Además, quedan intactas las células de Schwann ubicadas posterior al neuromasto II.

4.5 Participación de las células ciliadas en la reinervación

La pregunta central que se quiso resolver en este trabajo fue si las células ciliadas, células blanco de la inervación, eran necesarias para la correcta regeneración de los

axones de la LLP. La eliminación química de estas (mediante toxicidad por cobre) resultó en un crecimiento errático del nervio en regeneración, el cuál cesó al reaparecer un grupo de células ciliadas que, aparentemente, guió a las neuritas por el camino correcto (figura 24). Sin embargo, la eliminación estas células mecánica y genéticamente mostraron velocidad y trayectoria de regeneración axonal normales (figura 24 y 25). En suma, estos resultados sugieren en principio que las CC no participan en la guía axonal durante la regeneración. Sin embargo, es necesario confirmar estos resultados en estudios futuros.

El resultado obtenido al tratar los peces con sulfato de cobre es intrigante y amerita mayor estudio. Una posible explicación a lo observado puede deberse a la metodología empleada para generar el daño en las células sensoriales. Se ha determinado que el tratamiento con cobre no daña tejidos adyacentes, ni a las células gliales, ni a los axones de la LLP (Hernández y col. 2006). No obstante, el tratamiento con 50 μM de CuSO_4 elimina no sólo las células ciliadas sino también las células de soporte del neuromasto (efecto que no ocurre con las otras metodologías usadas, ablación con láser y ablación genética). De esta manera, es posible que la conducta de navegación aberrante y desviada de los axones en regeneración luego del tratamiento con cobre se deba a la ausencia de las células accesorias del neuromasto y no a la ausencia de las células ciliadas. Esto, sumado a los resultados del ensayo de TUNEL, en el cual se observó apoptosis en células de soporte post axotomía, daría cuenta de la existencia de una relación entre neuronas y células de soporte. Otra alternativa, es que el cobre (y no la ablación mecánica o genética de las células ciliadas), interfiera con la señal responsable de la correcta guía axonal durante la regeneración. En trabajos futuros sería interesante identificar tanto las células como

las moléculas que guían a los axones durante la regeneración. Cabe destacar que el hipotético factor actúa a una gran distancia: hay alrededor de 100 μ m entre el axón seccionado y el primer neuromasto, lo que habla de una molécula secretada y que es capaz de difundir lejanamente en el tejido.

4.6 Comparación de la regeneración entre neuronas de la LLP y del ganglio de la raíz dorsal.

Las neuronas bipolares de la LLP y las neuronas pseudounipolares del ganglio de la raíz dorsal de mamíferos son similares en cuanto a estructura y a los blancos que inervan. En ambas la proyección periférica inerva órganos receptores sensitivos en los tejidos periféricos, mientras que la proyección central entra en el SNC (Neumann y Wolf 1999, Richardson e Issa 1984).

Se han obtenido avances importantes en el estudio de las neuronas pseudounipolares del ganglio de la raíz dorsal, las cuales presentan características regenerativas distintas según la proyección, periférica o central, que se estudie (Chen y col. 2007). De la misma manera las neuronas bipolares de la LLP del pez cebra permitirían estos estudios comparando las características de degeneración y regeneración de las ramas centrales vs. periféricas. Si bien se ha descrito la capacidad de regeneración axonal en ciertas neuronas centrales del pez cebra (Becker y Becker, 2008), sería interesante testear esta capacidad en neuronas que proyectan tanto hacia la periferia como hacia el cerebro. Además, el análisis de la regeneración central condicionada por una axotomía periférica previa, se presenta como un muy atractivo tema de estudio. Más aun, en este modelo en el cual el uso de morfolinós y drogas que inhiben factores implicados en regeneración son ensayos simples.

4.7 Sobreexpresión de *Wld^S* en los axones de la LLP

Estudios recientes han demostrado que el *pruning* de los axones del nervio trigémino en el pez cebra son removidos por un mecanismo similar a la degeneración Walleriana, ya que al sobreexpresar *Wld^S* en ellos este proceso también evita la degeneración de los axones (Martin y Sagasti, 2010). Si bien, no se ha descrito el fenómeno de *pruning* en los axones de la LLP, sería interesante estudiarlo y analizar si se repite este comportamiento en dos “escenarios” distintos en el mismo animal.

Dentro del objetivo de caracterizar la degeneración de los axones de la LLP, se intentó sobreexpresar la proteína *Wld^S*, lo que no pudo efectuarse por razones técnicas. Sin embargo, debido a la ventaja que representa el estudio de la LLP, tanto para observar los *target* de estos axones, como para probar la funcionalidad de las células ciliadas, usando tintes vitales adicionados al agua de los peces, sería interesante determinar si *Wld^S* protege a estos axones como ha sido descrito en ratón, rata, mosca y cultivos celulares (Adalbert y col. 2005, Araki y col. 2004, Hoopfer y col. 2006, Macdonald y col. 2006, Wang y col. 2001).

4.8 Relevancia clínica de este estudio.

4.8.1. Sordera.

Debido a la similitud funcional y estructural entre las células ciliadas del oído interno de vertebrados y las de la línea lateral, se sugiere que el desarrollo de ambos tipos celulares se basa en mecanismos similares (Pichon y Ghysen, 2004).

La pérdida definitiva de las células ciliadas en mamíferos es una de las principales causas de sordera. Varios estudios han tratado de diferenciar o implantar células ciliadas en animales sordos, pero, aún si se desarrollan exitosamente, éstas no pueden sentir estímulos si no están inervadas (Nadol, 1997). Por esta razón, estudiar la relación entre la célula ciliada y su neurona sensorial; y conocer el posible mecanismo de regeneración del nervio y la reinervación de su célula *target* en la LLP, se vislumbra como un gran aporte en el ámbito clínico para combatir esta discapacidad. De esta manera, el uso del modelo que se ha desarrollado en esta tesis puede contribuir a este conocimiento por la alta conservación de componentes y mecanismos existente entre los vertebrados.

4.8.2. Enfermedades neurodegenerativas.

Desde el descubrimiento de *Wld^S*, se han desarrollado un buen número de estudios acerca del mecanismo que subyace a la mantención de un axón tras su desconexión del soma neuronal. Actualmente se ha demostrado que la sobreexpresión de *Nmnat1* fenocopia esta protección (Araki y col. 2004, Sasaki y col. 2009, Wang y col. 2005). Sin embargo, quedan numerosas moléculas las cuales probar. La caracterización y modelamiento de la degeneración Walleriana en la LLP del pez cebra es un avance que permitirá testear a gran escala los factores implicados en este mecanismo.

4.8.3. Regeneración axonal posterior al trauma.

Modelos genéticos, como *C. elegans* y *Drosophila*, se han establecido rápidamente como organismos manejables para disectar la base genética de la regeneración axonal. Resulta auspicioso que las nuevas vías asociadas a la regeneración, identificadas en invertebrados, sean conservadas en vertebrados, aunque los efectos de una vía específica sobre la regeneración puede presentar variaciones en función del tipo celular y ambiente (Wang y Jin, 2010). Además, la mayor redundancia y complejidad de los mecanismos reguladores de la regeneración en vertebrados se presentan como grandes desafíos para los estudios futuros. La manipulación de una vía, frecuentemente, no genera impactos notables en la recuperación funcional de las neuronas lesionadas, mientras que la combinatoria de tratamientos en modelos de lesión de la médula espinal en ratón ha revelado interesantes resultados (Alto y col. 2009, Kadoya y col. 2009).

Por lo tanto, la investigación de los efectos sinérgicos se vislumbran como el futuro foco de investigación de la regeneración axonal. Los resultados obtenidos en esta tesis son un claro aporte al respecto, pues el modelo permite el uso de mutantes y métodos simples de manipulación de las vías de señalización *in vivo*. Búsquedas farmacológicas y genéticas a gran escala en un organismo vertebrado de bajo costo serán un valioso aporte a la necesidad urgente de identificar nuevos blancos y drogas para la terapia de regeneración axonal.

5. CONCLUSIONES

-Los axones de la línea lateral del pez cebra presentan degeneración Walleriana.

-En la fase de eliminación de los fragmentos axonales de la degeneración Walleriana participan los leucocitos del sistema inmune.

-El proceso de regeneración axonal es independiente de la presencia las células ciliadas.

-La correcta regeneración axonal depende de la presencia de las células de Schwann alrededor del nervio de la línea lateral.

BIBLIOGRAFÍA

Adalbert R, Gillingwater TH, Haley JE, Bridge K, Beirowski B, Berek L, Wagner D, Grumme D, Thomson D, Celik A, Addicks K, Ribchester R y Coleman MP. 2005. A rat model of slow Wallerian degeneration (WldS) with improved preservation of neuromuscular synapses. *Eur. J. Neurosci.* 21:271–77

Adalbert R, Nogradi A, Szabo A, Coleman MP. 2006. The slow Wallerian degeneration gene in vivo protects motor axons but not their cell bodies alter avulsion and neonatal axotomy. *Eur. J. Neurosci.* 24:2163–2168.

Appenzeller, O. and G. Palmer. 1972. The cyclic AMP (adenosine 3',5'-phosphate) content of sciatic nerve: changes after nerve crush. *Brain Res* 42: 521-524.

Araki T, Sasaki Y, Milbrandt J. 2004. Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science* 305:1010–13.

Avellino AM, Hart D, Dailey AT, MacKinnon M, Ellegala D, Kliot, M. 1995. Differential macrophage responses in the peripheral and central nervous system during Wallerian degeneration of axons. *Exp. Neurol.* 136:183–98

Banner LR, Patterson PH. 1994. Major changes in the expression of the mRNAs for cholinergic differentiation factor/leukemia inhibitory factor and its receptor after injury to adult peripheral nerves and ganglia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:7109–13.

Becker T, Wullimann MF, Becker CG, Bernhardt RR, Schachner M. 1997. Axonal regrowth after spinal cord transection in adult zebrafish. *J Comp Neurol* 377: 577-595.

Becker T, Bernhardt RR, Reinhard E, Wullimann MF, Tongiorgi E, Schachner M. 1998. Readiness of zebrafish brain neurons to regenerate a spinal axon correlates with differential expression of specific cell recognition molecules. *J Neurosci* 18: 5789-5803.

Becker, C. G. y T. Becker 2008. Adult zebrafish as a model for successful central nervous system regeneration. *Restor Neurol Neurosci* 26: 71-80.

Beirowski B, Adalbert R, Wagner D, Grumme DS, Addicks K, Ribchester RR, Coleman MP. 2005. The progressive nature of Wallerian degeneration in wild-type and slow Wallerian degeneration (WldS) nerves. *BMC Neurosci.* 6:6

Beirowski B, Babetto E, Coleman MP, Martin KR. 2008. The *WldS* gene delays axonal but not somatic degeneration in a rat glaucoma model. *Eur. J. Neurosci.* 28:1166–79.

Brosamle, C. and M. E. Halpern. 2002. Characterization of myelination in the developing zebrafish. *Glia* 39: 47-57.

Bruck W, Friede RL. 1990. Anti-macrophage CR3 antibody blocks myelin phagocytosis by macrophages in vitro. *Acta Neuropathol.* 80:415–18.

Burne JF, Staple JK, Raff MC. 1996. Glial cells are increased proportionally in transgenic optic nerves with increased numbers of axons. *J. Neurosci.* 16:2064–73.

Busse D, Doughty RS, Ramsey TT, Russell WE, Price JO, Flanagan WM, Shawver LK, Arteaga CL. 2000. Reversible G(1) arrest induced by inhibition of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase requires up-regulation of p27(KIP1) independent of MAPK activity. *J Biol Chem.* 275:6987-95.

Cámara-Lemarroy CR, Guzmán-de la Garza FJ, Fernández-Garza NE. 2010. Molecular inflammatory mediators in peripheral nerve degeneration and regeneration. *Neuroimmunomodulation* 17: 314-324.

Campenot, R. B. 1982. Development of sympathetic neurons in compartmentalized cultures. II Local control of neurite growth by nerve growth factor. *Dev Biol* 93: 1-12.

Carlsen, R. C. and L. J. Anderson. 1982. Subcellular distribution of axonally transported adenylate cyclase: effect of nerve constriction and comparison with acetylcholinesterase. *J Neurochem* 39: 1467-1477.

Caroni, P. and M. E. Schwab. 1988. Two membrane protein fractions from rat central myelin with inhibitory properties for neurite growth and fibroblast spreading. *J Cell Biol* 106: 1281-1288.

Cavanagh, J. B. 1964. The significance of the "dying back" process in experimental and human neurological disease. *Int Rev Exp Pathol* 3: 219-267.

Cavanagh JB. 1979. The 'dying back' process. A common denominator in many naturally occurring and toxic neuropathies. *Arch. Pathol. Lab Med.* 103:659–64

Chen, Z. L., W. M. Yu, Strickland, S. 2007. Peripheral regeneration. *Annu Rev Neurosci* 30: 209-233.

Coleman, B., M. G. de Silva, et al. 2007. Concise review: the potential of stem cells for auditory neuron generation and replacement. *Stem Cells* 25(11): 2685-2694.

Coleman, M. P., Conforti, L., Buckmaster, E. A., Tarlton, A., Ewing, R. M., Brown, M. C., Lyon, M. F., Perry, V. H. 1998. An 85-kb tandem triplication in the

- slow Wallerian degeneration (Wlds) mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:9985–90.
- Coleman, M. P. and M. R. Freeman 2010. Wallerian degeneration, Wld(s), and Nmnat. *Annu Rev Neurosci* 33: 245-267.
- Collazo, A., S. E. Fraser, Mabee, P. M. 1994. A dual embryonic origin for vertebrate mechanoreceptors. *Science* 264:426-430.
- Conforti, L., Tarlton, A., Mack, T. G., Mi, W., Buckmaster, E. A., Wagner, D., Perry, V. H., Coleman, M. P. 2000. A Ufd2/D4Cole1e chimeric protein and overexpression of rbp7 in the slow Wallerian degeneration (WldS) mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:11377–82.
- Conforti, Robert Adalbert, and Michael P. Coleman. 2007. Neuronal death: where does the end begin?. *Trends Neurosci.*30: 159–166.
- de la Monte, S. M., Gabuzda, D. H., Ho, D. D., Brown, R. H., Jr., Hedley-Whyte, E. T., Schooley, R. T., Hirsch, M. S., Bhan, A. K. 1988. Peripheral neuropathy in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Neurol* 23: 485-492.
- Deckwerth TL, Johnson EM, Jr. 1994. Neurites can remain viable after destruction of the neuronal soma by programmed cell death (apoptosis). *Dev. Biol.* 165:63–72.
- Fern R, Ransom B, Waxman S. 1995. Voltage-gated calcium channels in CNS white matter: role in anoxic injury. *J. Neurophysiol.* 74, 369-377.
- Freshney, 1987. *Culture of animal cells. A manual of basic technique.* Wiley-Liss. Pp 1- 4.
- Friede RL, Bruck W. 1993. Macrophage functional properties during myelin degradation. *Adv. Neurol.* 59:327–36.
- George E, Glass J, Griffin J. 1995. Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels. *J. Neurosci.* 15, 6445-6454.
- Ghabriel MN, Allt G. 1979. The role of Schmidt-Lanterman incisures in Wallerian degeneration. I. A quantitative teased fiber study. *Acta Neuropathol.* 48:93–93.
- Gillingwater T. H., Ingham C. A., Parry K. E., Wright A. K., Haley J. E., Wishart T. M., Arbuthnott G. W. and Ribchester R. R. 2006. Delayed synaptic degeneration in the CNS of WldS mice after cortical lesion. *Brain* 129: 1546–1556.
- Gosh-Roy A, Chisholm AD. 2010. *Caenorhabditis elegans*: a new model organism for Studies of axon regeneration. *Dev Dyn*, 239:1460-1464.

Griffin JW, George R, Lobato C, Tyor WR, Yan LC, Glass, J. D. 1992. Macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration: relevance to immune-mediated demyelination. *J. Neuroimmunol.* 40:153–65.

Griffin JW, George EB, Chaudhry V. 1996. Wallerian degeneration in peripheral nerve disease. *Baillieres Clin. Neurol.* 5:65–75.

Hall, C., M. V. Flores, Storm, T., Crosier, K., Crosier, P.. 2007. The zebrafish lysozyme C promoter drives myeloid-specific expression in transgenic fish. *BMC Dev Biol* 7: 42.

Hasbani DM, O'Malley KL. 2006. Wld(S) mice are protected against the Parkinsonian mimetic MPTP. *Exp. Neurol.* 202:93–99

Hashimoto, M. and G. Heinrich 1997. Brain-derived neurotrophic factor gene expression in the developing zebrafish. *Int J Dev Neurosci* 15: 983-997.

Hatakeyama S, Yada M, Matsumoto M, Ishida N, Nakayama KI. 2001. U-Box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J. Biol. Chem.* 276:33111–20.

Hernandez, P. P., V. Moreno, Olivari, F. A., Allende, M. L. 2006. Sub-lethal concentrations of waterborne copper are toxic to lateral line neuromasts in zebrafish (*Danio rerio*). *Hear Res* 213: 1-10.

Hernandez, P. P., F. A. Olivari, Sarrazin, A. F., Sandoval, P. C., Allende, M. L.. 2007. Regeneration in zebrafish lateral line neuromasts: expression of the neural progenitor cell marker *sox2* and proliferation-dependent and-independent mechanisms of hair cell renewal. *Dev Neurobiol* 67: 637-654.

Hilliard, M. A. 2009. Axonal degeneration and regeneration: a mechanistic tug-of-war. *J Neurochem* 108(1): 23-32.

Hirata K, Mitoma H, Ueno N, He J, Kawabuchi M. 1999. Differential response to macrophage subpopulations to myelin degradation in the injured sciatic nerve. *J. Neurocytol.* 28:685–95.

Holtzman E, Novikoff AB. 1965. Lysosomes in the rat sciatic nerve following crush. *J. Cell Biol.* 27:651–69

Hoopfer ED, McLaughlin T, Watts RJ, Schuldiner O, O'Leary DD, Luo L. 2006. Wld(s) protection distinguishes axon degeneration following injury from naturally occurring developmental pruning. *Neuron* 50:883–95.

Howell, G. R., Libby, R. T., Jakobs, T. C., Smith, R. S., Phalan, F. C., Barter, J. W., Barbay, J. M., Marchant, J. K., Mahesh, N., Porciatti, V., Whitmore, A. V., Masland, R. H., John, S. W. 2007. Axons of retinal ganglion cells are insulted in the optic

nerve early in DBA/2J glaucoma. *J. Cell Biol.* 179:1523–37

Kage E., Hayashi Y., Takeuchi H., Hirotsu T., Kunitomo H., Inoue T., Arai H., Iino Y. and Kubo T. 2005. MBR-1, a novel helix-turnhelix transcription factor, is required for pruning excessive neuritis in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* 15, 1554–1559.

Kaneko S, Wang J, Kaneko M, Yiu G, Hurrell JM, et al. 2006. Protecting axonal degeneration by increasing nicotinamide adenine dinucleotide levels in experimental autoimmune encephalomyelitis models. *J. Neurosci.* 26:9794–804

Kelsh RN, Eisen JS 2000. The zebrafish colourless gene regulates development of non-ectomesenchymal neural crest derivatives. *Development* 127:515–525.

Kerschensteiner M, Schwab ME, Lichtman JW, Misgeld T. 2005. In vivo imaging of axonal degeneration and regeneration in the injured spinal cord. *Nat. Med.* 11:572–77.

Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S. 1999. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96:635–44.

Laser, H., Conforti, L., Morreale, G., Mack, T. G., Heyer, M., Haley, J. E., Wishart, T. M., Beirowski, B., Walker, S. A., Haase, G., Celik, A., Adalbert, R., Wagner, D., Grumme, D., Ribchester, R. R., Plomann, M., Coleman, M. P. 2006. The slow Wallerian degeneration protein, WldS, binds directly to VCP/p97 and partially redistributes it within the nucleus. *Mol. Biol. Cell* 17:1075–84.

Lee T., Lee A. and Luo L. 1999. Development of the *Drosophila* mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast. *Development* 126, 4065–4076.

Levitzki and Aviv Gazit . 1995. Source: Tyrosine Kinase Inhibition: An Approach to Drug Development. *Science*, 267, 5205: 1782-1788.

Liu HM, Yang LH, Yang YJ. 1995. Schwann cell properties: 3. C-fos expression, bFGF production, phagocytosis and proliferation during Wallerian degeneration. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 54:487–96.

Lopez-Schier, H. and A. J. Hudspeth. 2005. Supernumerary neuromasts in the posterior lateral line of zebrafish lacking peripheral glia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 1496-1501.

Ludwin S. K. and Bisby M. A. 1992. Delayed Wallerian degeneration in the central nervous system of Ola mice: an ultrastructural study. *J. Neurol. Sci.* 109:140–147.

Lunn, E. R., V. H. Perry, Brown, M. C., Rosen, H., Gordon, S. 1989. Absence of

Wallerian Degeneration does not Hinder Regeneration in Peripheral Nerve. *Eur J Neurosci* 1: 27-33.

Luo L. and O'Leary D. D. 2005 Axon retraction and degeneration in development and disease. *Annu. Rev. Neurosci.* 28, 127–156.

Lyon MF, Ogunkolade BW, Brown MC, Atherton DJ, Perry VH. 1993. A gene affecting Wallerian nerve degeneration maps distally on mouse chromosome 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:9717–20

Lyons, Hans-Martin Pogoda, Matthew G. Voas, Ian G. Woods, Brianne Diamond, Rebecca Nix, Naomi Arana, Jennifer Jacobs, William S. Talbot. 2005. *erbb3* and *erbb2* Are Essential for Schwann Cell Migration and Myelination in Zebrafish . *Current Biology*, 15: 513-524.

Macdonald JM, Beach MG, Porpiglia E, Sheehan AE, Watts RJ, Freeman MR. 2006. The *Drosophila* cell corpse engulfment receptor *draper* mediates glial clearance of severed axons. *Neuron* 50:869–81

Marck TG, Reiner M, Beirowski B, Mi W, Emanuelli M, et al. 2001. Wallerian degeneration of injured axons and synapses is delayed by a *Ube4b/Nmnat* chimeric gene. *Nat. Neurosci.* 4:1199–206

Magni G, Amici A, Emanuelli M, Orsomando G, Raffaelli N, Ruggieri S. 2004. Structure and function of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase. *Curr. Med. Chem.* 11:873–85

Makwana, M. and G. Raivich 2005. Molecular mechanisms in successful peripheral regeneration. *FEBS J* 272(11): 2628-2638.

Markus, A., T. D. Patel, Snider, W. D. 2002. Neurotrophic factors and axonal growth. *Curr Opin Neurobiol* 12: 523-531.

Martin, S. M., G. S. O'Brien, *Portera-Cailliau C, Sagasti A.* 2010. Wallerian degeneration of zebrafish trigeminal axons in the skin is required for regeneration and developmental pruning. *Development* 137: 3985-3994.

May, F., Vroemen, M., Matiasek, K., Henke, J., Brill, T., Lehmer, A., Apprich, M., Erhardt, W., Schoeler, S., Paul, R., Blesch, A., Hartung, R., Gansbacher, B., Weidner, N. 2005. Nerve replacement strategies for cavernous nerves. *Eur Urol* 48: 372-378.

Metcalf, W. K. 1985. Sensory neuron growth cones comigrate with posterior lateral line primordial cells in zebrafish. *J Comp Neurol* 238: 218-224.

Mi W, Beirowski B, Gillingwater TH, Adalbert R, Wagner D, et al. 2005. The slow Wallerian degeneration gene, *Wlds*, inhibits axonal spheroid pathology in gracile axonal dystrophy mice. *Brain* 128:405–16.

- Monaco JJ. 1992. A molecular model of MHC class-I-restricted antigen processing. *Immunol. Today* 13:173–79.
- Morreale G, Conforti L, Coadwell J, Wilbrey AL, Coleman MP. 2009. Evolutionary divergence of valosin containing protein/cell division cycle protein 48 binding interactions among endoplasmic reticulum associated degradation proteins. *FEBS J.* 276:1208–20.
- Nadol, J. B., Jr. 1997. Patterns of neural degeneration in the human cochlea and auditory nerve: implications for cochlear implantation. *Otolaryngol Head Neck Surg* 117: 220-228.
- Neumann S, Bradke F, Tessier-Lavigne M, Basbaum AI. 2002. Regeneration of sensory axons within the injured spinal cord induced by intraganglionic cAMP elevation. *Neuron* 34:885– 93.
- Neumann S, Woolf CJ. 1999. Regeneration of dorsal column fibers into and beyond the lesion site following adult spinal cord injury. *Neuron* 23:83–91.
- Nguyen QT, Sanes JR, Lichtman JW. 2002. Pre-existing pathways promote precise projection patterns. *Nat. Neurosci.* 5:861–67
- Nguyen, C.T., Langenbacher, A., Hsieh, M., and Chen, J.N. 2010. The Paf1 complex component Leo1 is essential for cardiac and neural crest development in zebrafish. *Dev. Biol.* 341: 167-175.
- Obholzer, N., Wolfson, S., Trapani, J.G., Mo, W., Nechiporuk, A., Busch-Nentwich, E., Seiler, C., Sidi, S., Söllner, C., Duncan, R.N., Boehland, A., and Nicolson, T. 2008. Vesicular glutamate transporter 3 is required for synaptic transmission in zebrafish hair cells. *J. Neurosci.* 28: 2110-2118.
- Oblinger M, Lasek R. 1988. Axotomy-induced alterations in the synthesis and transport of neurofilaments and microtubules in dorsal root ganglion cells. *J. Neurosci.* 8, 1747-1758.
- O'Brien G.S., Rieger S., Martin S.M., Cavanaugh A.M., Portera-Cailliau C., Sagasti A. 2009. Two-photon axotomy and time-lapse confocal imaging in live zebrafish embryos. *JoVE.* 24.
- O'Leary, D. D. and S. E. Koester. 1993. Development of projection neuron types, axon pathways, and patterned connections of the mammalian cortex. *Neuron* 10: 991-1006.
- Olivari, F. A., P. P. Hernandez, Allende M.L. 2008. Acute copper exposure induces oxidative stress and cell death in lateral line hair cells of zebrafish larvae. *Brain Res* 1244: 1-12.

Pardo-Martin, C., T. Y. Chang, et al. 2010. High-throughput in vivo vertebrate screening. *Nat Methods* 7: 634-636.

Perry VH, Brown MC, Gordon S. 1987. The macrophage response to central and Peripherals nerve injury: a possible role for macrophages in regeneration. *J. Exp. Med.* 165:1218-23.

Perry VH, Tsao JW, Fearn S, Brown MC. 1995. Radiation-induced reductions in macrophage recruitment have only slight effects on myelin degeneration in sectioned peripheral nerves of mice. *Eur. J. Neurosci.* 7:271-80.

Pichon, F. and A. Ghysen 2004. Evolution of posterior lateral line development in fish and amphibians. *Evol Dev* 6: 187-193.

Pogoda HM, Sternheim N, Lyons DA, Diamond B, Hawkins TA, Woods IG, Bhatt DH, Franzini-Armstrong C, Dominguez C, Arana N, Jacobs J, Nix R, Fetcho JR, Talbot WS. 2006. A genetic screen identifies genes essential for development of myelinated axons in zebrafish. *Dev Biol* 298:118-131.

Raff, M. C., Whitmore, A. V., y Finn, J. T. 2002. Axonal self-destruction and neurodegeneration. *Science.* 296:868-71.

Richardson PM, Issa VM. 1984. Peripheral injury enhances central regeneration of primary sensory neurones. *Nature* 309:791-93.

Rhodes, Andreas Hagen, Karl Hsu, Min Deng, Ting Xi Liu, A. Thomas Look, and John P. Kanki. 2005. Interplay of Pu.1 and Gata1 Determines Myelo-Erythroid Progenitor Cell Fate in Zebrafish. *Developmental Cell*, Vol. 8, 97-108.

Sagot, Y., Dubois-Dauphin, M., Tan, S. A., de Bilbao, F., Aebischer, P., Martinou, J. C., Kato, A. C. 1995. Bcl-2 overexpression prevents motoneuron cell body loss but not axonal degeneration in a mouse model of a neurodegenerative disease. *J Neurosci* 15: 7727-7733.

Sajadi A, Schneider BL, Aebischer P. 2004. Wld(s)-mediated protection of dopaminergic fibers in an animal model of parkinson disease. *Curr. Biol.* 14:326-30

Samsam M, Mi W, Wessig C, Zielasek J, Toyka KV, et al. 2003. The Wlds mutation delays robust loss of motor and sensory axons in a genetic model for myelin-related axonopathy. *J. Neurosci.* 23:2833-39.

Sarrazin, A. F., Villablanca, E. J., Nunez, V. A., Sandoval, P. C., Ghysen, A., Allende, M. L., 2006. Proneural gene requirement for hair cell differentiation in the zebrafish lateral line. *Dev Biol* 295(2): 534-545.

Saxena, S. y P. Caroni 2007. Mechanisms of axon degeneration: from development to disease. *Prog Neurobiol* 83: 174-191.

Schaumburg, H. H., H. M. Wisniewski, et al. 1974. Ultrastructural studies of the dying-back process. I. Peripheral nerve terminal and axon degeneration in systemic acrylamide intoxication. *J Neuropathol Exp Neurol* 33: 260-284.

Schlaepfer W. 1977. Structural alterations of peripheral nerve induced by the calcium ionophore A23187. *Brain Res.* 136, 1-9.

Schuster, K., C. Dambly-Chaudiere, Ghysen A. 2010. Glial cell line-derived neurotrophic factor defines the path of developing and regenerating axons in the lateral line system of zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 19531-19536.

Shamash S, Reichert F, Rotshenker S. 2002. The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor- α , interleukin-1 α , and interleukin-1 β . *J. Neurosci.* 22:3052-60.

Sima, A. A., Bouchier, M., Christensen, H. 1983. Axonal atrophy in sensory nerves of the diabetic BB-Wistar rat: a possible early correlate of human diabetic neuropathy. *Ann Neurol* 13: 264-272.

Siman R, Trojanowski J, Povlishock J. 1999. The role of calpain-mediated spectrin proteolysis in traumatically induced axonal injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 365-375.

Snider, W. D., Zhou, F. Q., Zhong, J., Markus, A. 2002. Signaling the pathway to regeneration. *Neuron* 35: 13-16.

Stainier, D. Y., B. M. Weinstein, Detrich HW, Zon LI, Fishman MC. 1995. Cloche, an early acting zebrafish gene, is required by both the endothelial and hematopoietic lineages. *Development* 121: 3141-3150.

Stoll G, Griffin JW, Li CY, Trapp BD. 1989a. Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J. Neurocytol.* 18:671-83.

Stone, M. C., M. M. Nguyen, Allende DL., Rolls MM., 2010. Global up-regulation of microtubule dynamics and polarity reversal during regeneration of an axon from a dendrite. *Mol Biol Cell* 21: 767-777.

Stys P, Waxman S, Ransom B. 1991. Na-Ca exchanger mediates Ca influx during anoxia in mammalian central nervous system white matter. *Ann. Neurol.* 30:375-380.

Vargas and Ben A. Barres. 2007. Why Is Wallerian Degeneration in the CNS So Slow?. *Annual Review of Neuroscience.* Vol. 30: 153-179.

Trapp BD, Hauer P, Lemke G. 1988. Axonal regulation of myelin protein mRNA levels in actively myelinating Schwann cells. *J. Neurosci.* 8:3515-21.

Waller A. 1850. Experiments on the section of glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog and observations of the alternatives produced thereby in the structure of their primitive fibres. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 140:423–29.

Walsh, J. C. and J. G. McLeod, 1970. Alcoholic neuropathy. *Proc Aust Assoc Neurol* 7: 77-83.

Wang MS, Fang G, Culver DG, Davis AA, Rich MM, Glass JD. 2001. The WldS protein protects against axonal degeneration: a model of gene therapy for peripheral neuropathy. *Ann. Neurol.* 50:773–79.

Williams PL, Hall SM. 1971a. Chronic Wallerian degeneration an in vivo and ultrastructural study. *J. Anat.* 109:487–503.

Williams PL, Hall SM. 1971b. Prolonged in vivo observations of normal peripheral nerve fibres and their acute reactions to crush and deliberate trauma. *J. Anat.* 108:397–408.

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

Yanik, M. F., Cinar, H., Cinar, H. N., Chisholm, A. D., Jin, Y., Ben-Yakar, A. 2004. Neurosurgery: functional regeneration after laser axotomy. *Nature* 432: 822.

Zhou, F. Q, Zhou, J., Dedhar, S., Wu, Y. H., Snider, W. D.2004. NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3beta and functions of the microtubule plus end binding protein APC. *Neuron* 42: 897-912.

Zhou, F. Q.,Walzer, M., Wu, Y. H., Zhou, J., Dedhar, S., Snider, W. D.2006. Neurotrophins support regenerative axon assembly over CSPGs by an ECM-integrin-independent mechanism. *J Cell Sci* 119: 2787-2796.

Ziv, N. E. and M. E. Spira 1995. Axotomy induces a transient and localized elevation of the free intracellular calcium concentration to the millimolar range. *J Neurophysiol* 74: 2625-2637.

Zottoli, S. J., Bentley, A. P., Feiner, D. G., Hering, J. R., Prendergast, B. J., Rieff, H. I. 1994. Spinal cord regeneration in adult goldfish: implications for functional recovery in vertebrates. *Prog Brain Res* 103: 219-228.