

UCH-FC  
DOC-BMCN  
U564  
CI

**Universidad de Chile**  
Facultad de Ciencias



# **Identificación y caracterización de progenitores neurales en 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

**CRISTIAN ALBERTO UNDURRAGA SANHUEZA**

Julio, 2013

**Director de tesis: Miguel Allende Connelly**

**FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE**



**INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE DOCTORADO**

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

**CRISTIAN ALBERTO UNDURRAGA SANHUEZA**

Ha sido aprobado 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 de Tesis rendido el día 1 de julio de 2013

**DIRECTOR DE TESIS:**

Dr. Miguel Allende Connelly

A handwritten signature in blue ink, reading "Miguel Allende", positioned above a horizontal dotted line.

**COMISION DE EVALUACION DE LA TESIS:**

Dr. Christian González-Billault (Presidente)

Dr. Juan Fernández H.

Dra. Verónica Palma A.

Dr. Juan Larraín C.

Three handwritten signatures in blue ink, each positioned above a horizontal dotted line. The signatures are stylized and difficult to read.



A mi familia, en especial al más grande... Mi Viejo.



Según la historia familiar nací el 16 de Abril de 1977...según la historia "oficial", un par de años después...eso explicaría mi juventud de siempre. Yo creo que es el espíritu el que te mantiene joven.

En el lugar no hay duda, fue en Santiago de Chile, aunque me gusta más sentirme un ciudadano del mundo, el cuál quiero conocer lo más posible, para lo cuál tengo planeado vivir 100 años o más, mi actual estilo de vida va en ese camino.

Mi infancia fue divertida, no había como aburrirse en la casa grande de Av. Italia. Con los compañeros del colegio, que afortunadamente lo eran también del barrio, crecimos en un colegio público, gratuito y de calidad, pasando después a un Liceo también igual, donde la diversidad de compañeros fue importante para mi desarrollo como persona. Grande fue el cambio a un colegio particular de Curicó, el cuál sirvió para terminar de desarrollar la base ya formada, tanto intelectual como socialmente.

La Universidad fue larga, pasando por Bachillerato, el Pregrado y el Postgrado, pero me permitió valorar a nuestra institución y tener esa visión amplia de país, tan necesaria por estos días.

La curiosidad por naturaleza que desde niño he tenido, y que espero no perder nunca, me ha llevado por el camino de las Ciencias...hermoso y multifacético, que deje un tiempo de lado para ser dirigente de Postgrado, gran e inolvidable misión.

Y aquí estoy, terminando mi tesis al fin...y que espero sea el inicio de una gran carrera científica, la del Dr. Undurraga, más conocido como "Undu", el cual espera formar algún día el Instituto Social de Ciencias Biológicas, en algún lugar de la costa de Chile.

☺



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que de uno u otro modo me han entregado cariño, buena onda y amor en mi vida. En especial a las personas que me han ayudado y apoyado todo el tiempo que llevó la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar debo agradecer a mi familia, los que me han soportado todo este tiempo, no entendiendo muchas veces en que consistía, pero siempre estando ahí para darme aliento.

En segundo lugar, al Laboratorio de Biología del Desarrollo de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile en el cual realicé mi tesis doctoral. A mi tutor Miguel Allende, el "Big Fish" por excelencia. Fue un tutor ejemplar, un científico que inspira y ayuda en todo sentido, que te entiende, comprende y guía, en definitiva, un ejemplo a seguir. A los integrantes históricos del lab, el "Gran" Florencio, amigo por siempre, confidente y soporte en las buenas y malas. A Juanito, con sus discusiones futbolísticas y "amagues" de todo tipo, nos hacía la estadía en el lab más agradable. A la Cata, que nos soportó todo el tiempo, su la ayuda con los peces, los olvidos en cruces, los avisos de alimentaciones etc. se agradecerá siempre.

A los integrantes de mi Comisión de Tesis, por su ayuda, críticas constructivas, palabras de aliento y apoyo en todo momento... Gracias !!.

Agradezco a las instituciones y laboratorios que me han ayudado en esta tesis. Los laboratorios del Dr. Juan Fernández, Dra. Verónica Palma y Dr. Álvaro Glavic fueron esenciales en el desarrollo de esta tesis. Importantísimos fueron las pasantías en los laboratorios del Dr. Clemens Grabher, Dr. Felix Loosli y Dr. Urban Liebel en el Karlsruhe Institute of Technology (KIT) de Karlsruhe. También debo agradecer a la Dra. Virginie Lecaudey y su grupo, en la Universidad de Freiburg, por recibirme casi inesperadamente, pero acogerme como uno más de su grupo. Un agradecimiento especial para el laboratorio del Dr. Jochen Wittbrodt y sus integrantes, en la Universidad de Heidelberg, el cuál me "soportó" por meses y donde viví hermosas experiencias e hice importantes experimentos. Debo dar las gracias al Dr. Alain Ghysen y la Dra. Christine Dambly-Chaudièrec, cuyos comentarios y aportes fueron importantísimos para esta tesis.

Debo dar las gracias a las instituciones que me han apoyado económicamente estos años, como fueron MECESUP y su beca de Doctorado, Conicyt y su beca de término de tesis, Company of Biologists y su Travelling Fellowship, al proyecto DFG-Conicyt, y a la Vicerrectoría de Asuntos Académicos de la Universidad de Chile.

Eternos agradecimientos a los integrantes del mítico equipo "OPA", cuyos integrantes, muchos repartidos por el mundo, siempre seguiremos el lema: "Hasta la Victoria en la Final!".

Empezar a nombrar una por una a las personas que me han ayudado sería eterno. Con el corazón lo digo, son muchas las que han estado a mi lado ayudando en este camino y en distintos momentos de él, por lo que arriesgarme a nombrarlos y olvidar a alguno, sería injusto e imperdonable. Estoy seguro que me perdonarán no nombrarlos ahora, pues todos ellos saben lo mucho que les agradezco.

# INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	v
INDICE.....	vi
INDICE DE FIGURAS.....	ix
INDICE DE TABLAS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Neurogénesis.....	3
1.2 Células progenitoras neurales.....	5
1.3 Genes Sox.....	6
1.4 Familia SoxB1.....	7
1.5 Regulación de genes proneurales por genes Sox.....	9
1.6 Modelo del pez cebra.....	10
1.7 Línea lateral del pez cebra.....	12
1.8 Células ciliadas mecanosensoriales.....	15
1.9 Genes proneurales en la línea lateral del pez cebra.....	20
<b>II. HIPÓTESIS</b> .....	<b>23</b>
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
3.1 Objetivo general.....	23
3.2 Objetivos específicos.....	23

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS** **25**

---

4.1 Material biológico.....	25
4.2 Tratamientos con Sulfato de Cobre.....	27
4.3 Inmunofluorescencia.....	28
4.4 Hibridaciones in situ (ISH).....	38
4.5 Incorporación de BrdU.....	31
4.6 Marcación nuclear.....	32
4.7 Muerte celular.....	32
4.8 Microscopia, <i>time-lapse in vivo</i> , Obtención y Tratamiento de Imágenes.....	32
4.9 Estadística y análisis.....	33

## **V. RESULTADOS** **34**

---

5.1 Identificar con marcadores específicos las células progenitoras neurales presentes a) en el primordio que da origen a la línea lateral posterior y b) en los neuromastos ya depositados.....	44
5.1.1 Hibridaciones <i>in situ</i> .....	34
5.1.2 Expresión de Sox-2 en la línea lateral del pez cebra.....	37
5.1.3 Expresión de Sox-3 en la línea lateral del pez cebra.....	39
5.1.4 Análisis del transgénico <i>sox3h7::GFP</i> .....	43
5.1.5 Marca del anticuerpo PAN-Sox en la línea lateral del pez cebra.....	50
5.1.6 Análisis de otros marcadores.....	56
5.2 Comprobar la presencia de células que presenten características de progenitoras neurales en los neuromastos de la línea lateral posterior.....	59
5.2.1 Ciclos de regeneración sucesivos en el neuromasto.....	59
5.2.2 Proliferación celular.....	63
5.2.3 Proliferación de células positivas para marcadores de progenitores neurales.....	64
5.2.4 Autorenovación.....	70
5.2.5 Multipotencialidad.....	74
5.3 Caracterización de células troncales que participan en la regeneración de la línea lateral.....	91

## **VI. DISCUSIÓN** **105**

---

6.1 Identificación molecular y celular de progenitores neurales en los neuromastos de la línea lateral.....	106
6.1.1 Expresión de genes característicos de progenitores neurales en el neuromasto, detectados por hibridación <i>in situ</i> .....	106

6.1.2	Expresión de marcadores de progenitores neurales detectados en el neuromasto por inmunohistoquímica.....	109
6.1.3	La expresión de GFP en la línea transgénica <i>sox3h7:GFP</i> identifica progenitores y células de soporte en el neuromasto.....	109
6.1.4	Identificación y caracterización de las células de soporte.....	111
6.1.5	La expresión de GFP identifica a las células del manto en peces transgénicos <i>pnfkb:GFP</i> .....	111
6.2	En el neuromasto existen células con características de progenitores neurales.....	115
6.2.1	Capacidad ilimitada de regeneración de las células ciliadas en neuromastos.....	115
6.2.2	Destino de las células que proliferan durante la migración del primordio de la línea lateral .....	116
6.2.3	Capacidad de autorenovación de las células troncales del neuromasto.....	118
6.2.4	Evidencias de la multipotencialidad de las células troncales del neuromasto.....	118
6.2.5	la regeneración repetida permite inducir una fuerte reacción proliferativa en el neuromasto.....	123
6.3	Comparación de la regeneración caracterizada en los neuromastos con la observada en otros modelos.....	126
6.4	Consideraciones finales.....	131
<b><u>VII. CONCLUSIONES</u></b>		<b>133</b>
<b><u>VIII. PROYECCIONES</u></b>		<b>134</b>
<b><u>IX. ANEXO</u></b>		<b>135</b>
9.1	Expresión de otros genes en la línea lateral.....	135

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Correlación negativa entre complejidad y capacidad de regeneración en los animales.....	2
Figura 2. Neurogénesis en mamíferos.....	4
Figura 3. Células madres neurales.....	6
Figura 4. Familia SoxB1.....	9
Figura 5. Neurogénesis en pez cebra.....	12
Figura 6. Desarrollo de Línea Lateral Posterior del Pez cebra.....	13
Figura 7. Línea lateral anterior y posterior del pez cebra.....	14
Figura 8. Esquema de un neuromasto maduro de la línea lateral del pez cebra.....	14
Figura 9. Células ciliadas en vertebrados.....	15
Figura 10. Células ciliadas en el neuromasto de pez cebra y oído del ratón.....	17
Figura 11. Ausencia de regeneración de células ciliadas en mamíferos.....	18
Figura 12. Regeneración de células ciliadas en la línea lateral.....	19
Figura 13. Genes proneurales y neurogénicos en la línea lateral posterior.....	21
Figura 14. Expresión de Sox2 en la línea lateral.....	21
Figura 15. Expresión de genes de la familia Soxb1 en embriones de pez cebra.....	35
Figura 16. Expresión de Sox2 en primordio y neuromastos de la LLP en larvas de pez cebra.....	38
Figura 17. Células Sox2 en un neuromasto de la LLP.....	39
Figura 18. Expresión de Sox3 en el primordio de la LLP (35 hpf).....	41
Figura 19. Inmunofluorescencia de Sox3 en larvas Transgénicas <i>brn3c:mGFP</i> de 3 dpf.....	42
Figura 20. Células Sox3 en neuromasto de la LLP.....	43
Figura 21. Colocalización de la proteína Sox3 en el transgénico <i>sox3h7:GFP</i> .....	44
Figura 22. Expresión de GFP en el transgénico <i>sox3h7:GFP</i> .....	46

Figura 23. Doble Transgénico <i>atoh1a:Tom/sox3h7:GFP</i> .....	47
Figura 24. Expresión de Sox2 en larvas transgénicas <i>sox3h7:GFP</i> en distintos estadios.....	48
Figura 25. Expresión de Sox3 en larvas transgénicas <i>sox3h7:GFP</i> de 3 dpf.....	49
Figura 26. Células <i>sox3h7:GFP</i> en un neuromasto de la LLP.....	50
Figura 27. Detección de la marca de PANSox en larvas de 34 hpf.....	52
Figura 28. Expresión de proteínas SoxB1 en larvas transgénicas de 48 hpf.....	53
Figura 29. Doble inmunohistoquímicas para PANSox y Tubulina Acetilada en larvas de 4 dpf.....	54
Figura 30. Expresión de PANSox en una larva transgénica <i>sox3h7:GFP</i> de 4dpf.....	55
Figura 31. Células marcadas con el anticuerpo PANSox en el neuromasto.....	56
Figura 32. Análisis del transgénico <i>pNfkB:GFP</i> .....	57
Figura 33. Número de células ciliadas en el neuromastos L1 de larvas controles.....	60
Figura 34. Daño a las células ciliadas de los neuromastos de la línea lateral mediante tratamientos con $\text{CuSO}_4$ .....	61
Figura 35. Ciclos de regeneración en larvas transgénicas <i>bm3c:mGFP</i> .....	62
Figura 36. Número de células ciliadas en ciclos reiterativos de regeneración.....	63
Figura 37. Proliferación de células que expresan Sox2.....	65
Figura 38. Proliferación de células que expresan Sox3.....	66
Figura 39. Proliferación en células que expresan proteínas de la familia SoxB1 (PANSox+).....	67
Figura 40. Proliferación celular en neuromastos de larvas transgénicas <i>sox3h7:GFP</i> .....	68
Figura 41. Permanencia y ubicación de células proliferativas del primordio, en neuromastos maduros a distintos tiempos post pulsos de BrdU.....	70
Figura 42. Proporción de células BrdU+/Sox3+ en neuromastos post pulso de BrdU a 30 hpf y caza a distintos tiempos.....	70

Figura 43. Incorporación de BrdU e inmunofluorescencias para PH3.....	72
Figura 44. Proporción de células que mantienen un estado proliferativo prolongado (BrdU+/PH3+).....	73
Figura 45. El daño con sulfato de cobre destruye las células de soporte de los neuromastos.....	75
Figura 46. Regeneración de dos tipos celulares en neuromastos 44 horas luego de un daño inducido por cobre.....	76
Figura 47. Regeneración de células ciliadas por transdiferenciación.....	78
Figura 48. Tratamiento de larvas <i>atoh1a:Tom</i> .....	79
Figura 49. Las células ciliadas regeneran a partir de progenitores que expresan proteínas SoxB1.....	80
Figura 50. Colocalización de la expresión de GFP y la proteína Sox2 en neuromastos de larvas <i>sox3h7:GFP</i> .....	81
Figura 51. Porcentaje de células <i>atoh1a+</i> y <i>sox3h7+</i> que expresan Sox2+ luego de un proceso regenerativo.....	82
Figura 52. Esquema de experimentos de "Time Lapse".....	83
Figura 53. División simétrica de un precursor que da origen a dos células ciliadas con persistencia del marcador del precursor.....	84
Figura 54. División simétrica de un precursor que da origen a dos células ciliadas con pérdida del marcador del precursor.....	85
Figura 55. Los precursores de células ciliadas pueden dividirse simétricamente o permanecer indivisos durante la regeneración.....	87
Figura 56. Diferenciación de una célula ciliada y su asociación con una célula de soporte.....	88
Figura 57. Diferenciación de células ciliadas a partir de precursores premitóticos.....	90
Figura 58. Esquema de marcación con BrdU seguido de daño y regeneración de neuromastos.....	91
Figura 59. Estabilidad de progenitores en neuromastos luego de un proceso de daño y regeneración.....	92
Figura 60. Existe una población de progenitores que se dividen en el neuromasto y mantienen ese estado aún luego de un proceso regenerativo.....	93

Figura 61. Esquema de experimentos de ciclos repetidos de daño y regeneración con incorporación de BrdU en el primer ciclo regenerativo.....	95
Figura 62. Porcentaje de células progenitoras que mantienen la marca BrdU+ luego de sucesivas rondas de daño y regeneración.....	96
Figura 63. Predominancia de progenitores mitóticos luego de sucesivas rondas de regeneración en neuromastos.....	98
Figura 64. Rondas sucesivas de regeneración generan un aumento en la proporción de células progenitoras que sufrieron una ronda de proliferación previa.....	98
Figura 65. Un progenitor mitótico puede dar origen a células ciliadas luego de varias rondas de regeneración.....	100
Figura 66. Las células ciliadas regeneradas en fases sucesivas de regeneración provienen de progenitores que sufrieron mitosis en una primera fase regenerativa.....	101
Figura 67. Detección del proceso de transición entre célula progenitora y célula ciliada diferenciada.....	103
Figura 68. Incremento progresivo de células ciliadas que mantienen un marcador de célula progenitora durante ciclos reiterados de daño y regeneración.....	104
Figura 69. Esquema que muestra los distintos tipos celulares encontrados y analizados en esta tesis, los genes o proteínas que expresan, y las líneas transgénicas que los marcan con proteínas fluorescentes.....	113
Figura 70. Esquema que ilustra los diversos tipos celulares en neuromastos de la LLP.....	114
Figura 71. Modelo de regeneración en neuromastos de la línea lateral.....	129
Anexo 1, Figura 72. Expresión de genes marcadores de células progenitoras.....	135

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Miembros de la familia de genes Sox que se expresan en el sistema nervioso de varios modelos vertebrados.....	7
<b>Tabla 2.</b> Líneas transgénicas del pez cebra utilizadas en esta tesis, tipos celulares marcados y ubicación de la marca.....	26
<b>Tabla 3.</b> RNAs polimerasas y enzimas de restricción utilizadas en la síntesis de las sondas empleadas en esta tesis.....	30

## RESUMEN

La aparición de nuevas neuronas, o neurogénesis, ha sido ampliamente estudiada en diversos vertebrados, desde peces hasta mamíferos. A pesar de todos los estudios y avances en esta materia, este fenómeno aún no ha sido entendido por completo. La capacidad de generar nuevas neuronas, a partir de progenitores neurales, en estadios distintos a los embrionarios, es muy limitada en los organismos estudiados, por lo tanto, el generar un nuevo modelo de estudio de este fenómeno es de gran interés biológico, pues permitirá estudiar los mecanismos que permiten la supervivencia y regeneración de las células progenitoras neurales con nuevos enfoques y herramientas.

Los progenitores neurales observados en distintos vertebrados presentan las siguientes características: a) tienen la capacidad de auto-renovarse, es decir, de mantener su número en un lugar específico y en un estado estable sin diferenciarse; b) presentan características de multipotencialidad, es decir, pueden generar distintos tipos de linajes celulares; y c) se ha visto en vertebrados que las células *progenitoras neurales* presentan un ciclo celular relativamente corto, pudiendo dividirse un número limitado de veces y hacia un destino celular más comprometido, en comparación a las células *troncales neurales*, las cuales presentan ciclos celulares más largos y pueden dividirse indefinidamente.

La utilización del pez cebra (*Danio rerio*) como modelo para estudios de procesos ocurridos en el desarrollo de vertebrados, está ampliamente fundamentado, debido a las características de sus embriones y larvas como también por la amplia variedad de técnicas celulares y moleculares que se pueden utilizar en este organismo. En particular se propone para este proyecto, investigar el sistema sensorial de la línea lateral del pez cebra, el cual presenta características particulares que lo hacen especialmente interesante para el estudio del fenómeno de neurogénesis en vertebrados. Este sistema sensorial del pez, se origina a partir de las placodas ectodérmicas, desde las cuales se separa un grupo de células que migran hacia la cabeza y otro grupo de células que migran hacia la cola, formando los respectivos primordios migratorios anteriores y posteriores. Estos primordios depositan regularmente grupos de células que darán origen a los neuromastos, los órganos sensoriales de la línea lateral. En ellos encontramos que luego de su depósito se producen procesos de diferenciación celular que terminan generando las células ciliadas mecanorreceptoras y las células accesorias (llamadas éstas células del manto y células de soporte). Las células mecanorreceptoras son similares a las células ciliadas del oído de vertebrados, incluidos los mamíferos. Ambos tipos celulares tienen una morfología característica, células con grandes núcleos y largos cilios que emergen desde la parte apical de la célula. También se ha visto que estas células ciliadas tienen un programa genético similar, utilizado en las primeras etapas del desarrollo, cuando se originan ambos sistemas.

Además comparten características fisiológicas que las hacen sensibles a los mismos compuestos, como los antibióticos.

La principal característica que distinguen a estos dos tipos de células ciliadas es que en el oído de mamíferos no se ha detectado la regeneración de nuevas células ciliadas luego de un daño en ellas. Por el contrario, en el sistema de la línea lateral del pez cebra, se ha observado la regeneración de sus células ciliadas luego de un daño, tanto con antibióticos como con metales pesados. Nuestra hipótesis es que, no solo existirían *células progenitoras neurales* durante el desarrollo del sistema, sino que algunas de estas células progenitoras se mantienen como tales durante toda la vida del individuo, como *células troncales neurales*.

Sobre la base de estos antecedentes, el objetivo en este proyecto, es la identificación y caracterización de células progenitoras neurales que estarían presentes en los neuromastos durante el desarrollo de la línea lateral del pez cebra y en peces adultos. Para llevar a cabo este objetivo identificamos marcadores de progenitores neurales, adicionales a los conocidos, que se expresan en la línea lateral. La expresión de estos marcadores de progenitores neurales, como los de la familia SoxB1, fueron observados en el primordio migratorio y en los neuromastos depositados, lo que nos indicaría la presencia de precursores neurales en estos lugares. Es importante mencionar que estos genes se expresan en células de los neuromastos durante la vida postembrionaria y adulta del pez, además encontramos que esta expresión coincide con la capacidad de regeneración que poseen las células ciliadas en los peces. Luego de esto, validamos las características de progenitores neurales de estas células, es decir: a) observamos que poseen la capacidad de proliferar y de auto-renovarse (sufren una división celular manteniendo su estado indiferenciado), y b) encontramos que poseen la capacidad de generar uno o más de los tipos celulares diferenciados presentes en este sistema sensorial del pez.

Nuestros resultados demuestran la presencia de una población de células troncales neurales en los neuromastos, y que estas células pueden generar una descendencia que se puede diferenciar en varios de los tipos celulares que forman el órgano maduro.

## ABSTRACT

The emergence of new neurons, or neurogenesis, has been widely studied in various vertebrates, from fish to mammals. Despite the advances and studies in this field, this phenomenon has not been fully understood. The ability to generate new neurons from neural progenitors, in postembryonic stages, is very limited in higher vertebrates, therefore, introducing a new model for studying this phenomenon is of great biological interest, because it will allow the study of mechanisms that determine the survival and regeneration of neural progenitor cells, with new approaches and tools.

The neural progenitors observed in different vertebrate models have certain characteristics that define them as such: a) they have a capacity for self-renewal, i.e., they have the ability to subsist in a specific place and in a steady state and undifferentiated, b) have characteristics of multipotent cells, i.e., they can generate different types of cell lines, and c) in some vertebrates the *neural progenitors cells* often have a relatively short cell cycle, can divide only a limited number of time and toward a more committed cell fate, compared to the *neural stem cells*, which have longer cell cycles and can divide indefinitely.

The use of zebrafish (*Danio rerio*) as a model to study processes occurring in vertebrate development is widely established due to the characteristics of their embryos and larvae as well as the wide variety of cellular and molecular techniques that can be used in this organism. In particular this project aims to investigate the sensory system of the lateral line in zebrafish, which has specific characteristics that make it particularly interesting to study the phenomenon of neurogenesis in vertebrates. This sensory system in fish is developmentally derived from the ectodermal placodes. One of these placodes becomes separated into two group of cells, one group migrates towards the head and another group of cells migrates towards the tail, forming the respective anterior and posterior lateral line migratory primordia. These primordia regularly deposit groups of cells that give rise to the neuromasts, the sensory organs of the lateral line. We find that after deposition, cellular differentiation processes occur, generating the mechanoreceptor hair cells, and the accessory cells (called mantle cells and support cells). These mechanoreceptor cells are similar to ciliated cells from the inner ear of other vertebrates, including mammals. Both cell types have a characteristic morphology, large nuclei and long cilia wich emerge from the apical pole of the cells; both cell types have a similar genetic program used in the early stages of their development. They also share physiological characteristics that make them sensitive to similar compounds, such as antibiotics.

The main feature that distinguishes this fish cells, is that in mammals regeneration does not occur after a damage. In contrast, in the zebrafish lateral line system, regeneration of the hair cells after damage with antibiotics or with

heavy metals, like copper sulphate has been reported. Our hypothesis is that there exist not only *neural progenitor cells* during the development of the lateral line, but some of these progenitor cells are maintained as such throughout the life of the fish, as *neural stem cells*.

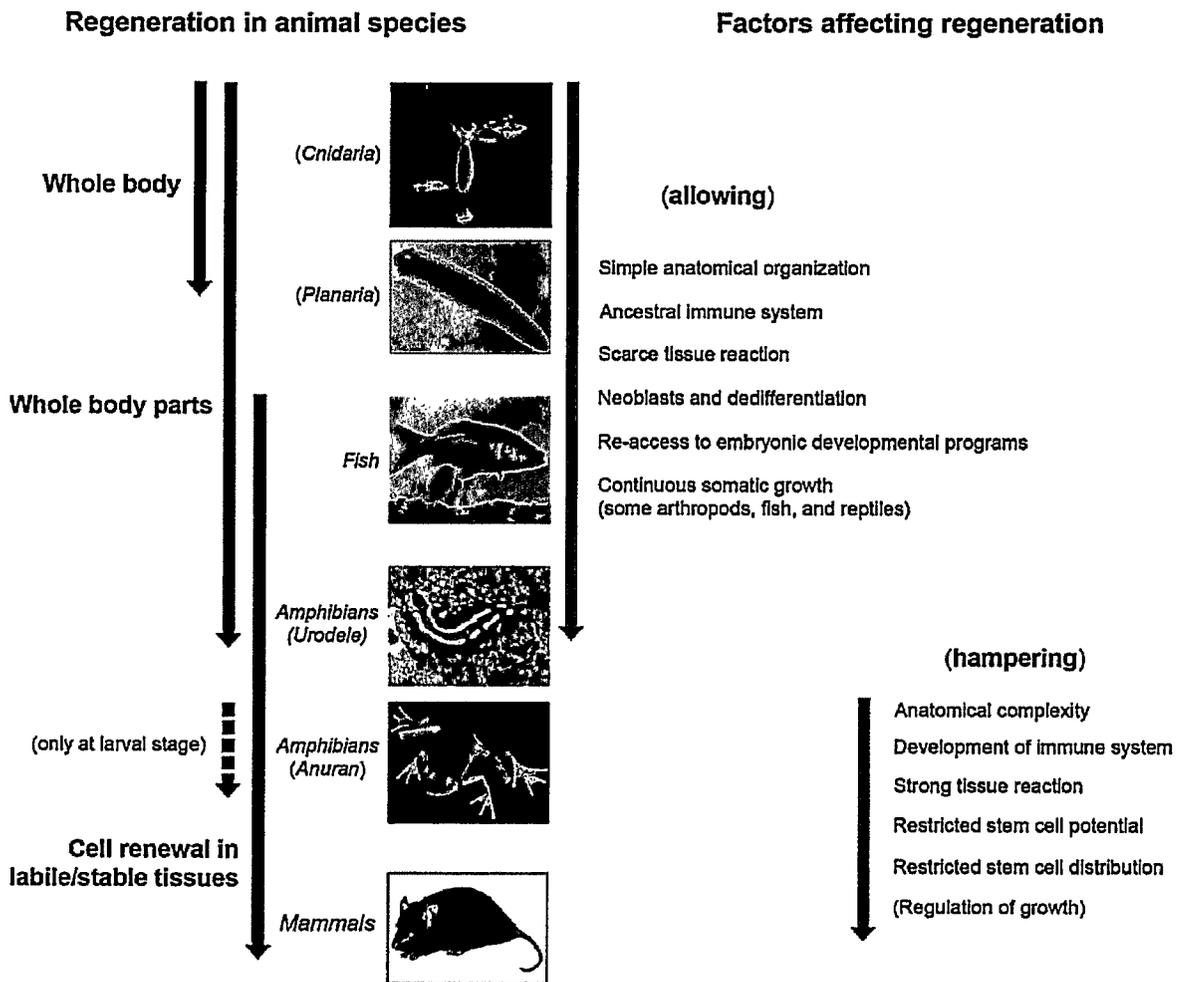
Based on this background, the objective of this project is the identification and characterization of neural progenitor cells, that may be present in the neuromasts during the development of the zebrafish lateral line and on into adulthood. To accomplish this objective, we identified markers of neural progenitors, in addition to those that are already known, which are expressed in the lateral line. The expression of markers of neural progenitors, such as those of the SoxB1 family, which has been observed in the migratory primordium and in the deposited neuromasts, may indicate the presence of neural precursors in these sites. It is noteworthy that these genes are expressed in cells of the neuromasts during postembryonic development and the adult life in the fish. This expression coincides with the ability to regenerate hair cells in fish, which can regenerate rapidly after a injury. After this, we examined the features of the neural progenitors. i.e., a) We described their proliferative capacity and ability to self-renew (undergo cell division with maintenance of the undifferentiated state), and b) we analyzed whether they have the ability to produce one or more of the differentiated cell types present in this sensory system.

Our results demonstrate the presence of a population of neural stem cells in neuromasts and that these cells can generate offspring that differentiate into the different cell types that make up the mature organ.

# I. INTRODUCCION

Los animales perciben las propiedades del medio ambiente a través de distintos y variados sistemas sensoriales. Estos sistemas sensoriales forman parte del Sistema Nervioso de los animales y básicamente consisten en: a) receptores sensoriales, que reciben distintos tipos de estímulos dependiendo de su especialización; b) una vía neural que lleva esta información al cerebro; y c) regiones especializadas del cerebro, que procesan esta información.

Al igual que para el resto de los tejidos, los sistemas sensoriales varían en su capacidad de renovación celular y de auto-reparación según la especie (Figura 1; Bonfanti, 2011). En la mayoría de los órganos de mamíferos, el potencial de regeneración de células y tejidos es insuficiente para permitir la reparación de daños severos (Carlson, 2005; Masaki y cols., 2007). Por ejemplo, la evolución de una alta complejidad en el sistema nervioso en vertebrados superiores, en el cual se han alcanzado capacidades cognitivas y nuevas funciones de alto beneficio selectivo se han acompañado de la pérdida en la capacidad de regenerar las células neurales que lo conforman (Emsley y cols., 2005; Tanaka y cols., 2009).



**Figura 1. Correlación negativa entre complejidad y capacidad de regeneración en los animales.** Esquema que muestra las diversas capacidades de regeneración según la complejidad. Se enumeran factores que benefician y que dificultando el proceso de regeneración. (adaptado de Bonfanti, 2011).

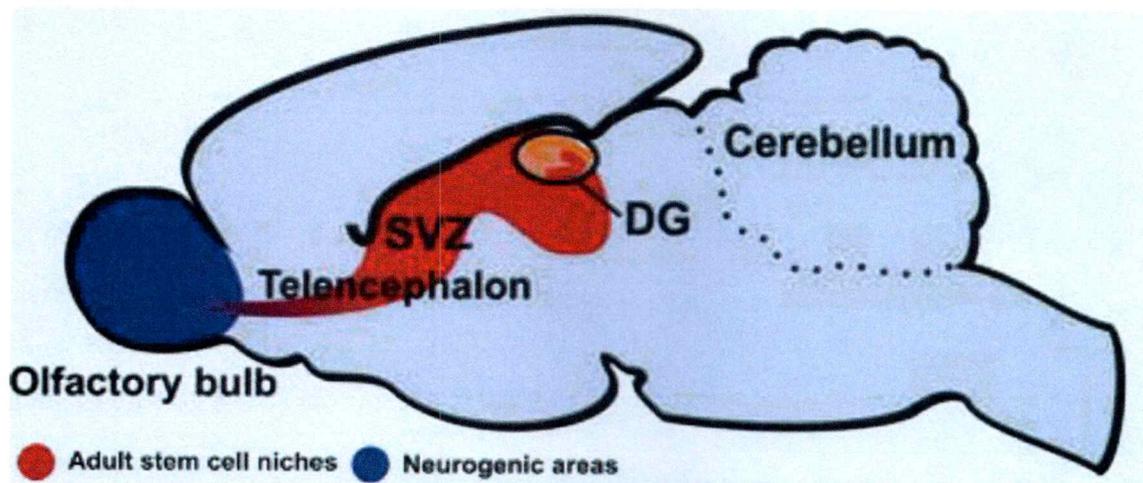
Desde los primeros estudios de Abraham Trembley hace más de 260 años, en los cuales demostró que la capacidad de regenerar no solo existía en plantas, si no que también en animales como las Hidras (Trembley, 1744), el proceso de regeneración ha sido un área intrigante para las ciencias biológicas. En los últimos años, el campo de la regeneración comparada en vertebrados ha tenido un gran auge, el cual ha ido en paralelo con el aumento de los estudios de

células madres en una variedad de vertebrados (Tanaka y cols., 2009). Durante mucho tiempo los organismos menos complejos han sido considerados excelentes modelos para la investigación del proceso de regeneración. Por ejemplo, animales como los celenterados (hidra), platelmintos (planarias) y equinodermos (estrellas de mar), mantienen células en su cuerpo que permiten el crecimiento, el reemplazo de células perdidas y la reparación de lesiones (Holstein y cols., 1991; Newmark y Sánchez-Alvarado, 2004; Reddien y Sánchez-Alvarado, 2004; Birnbaum y cols., 2008). Al mismo tiempo, el descubrimiento de sitios específicos, llamados “nichos” de células madres, en muchos tejidos y órganos de mamíferos ha abrigado esperanzas en que pudieran activarse procesos de regeneración como aquellos observados en vertebrados menos complejos (Bonfanti, 2011). Es por esto que en la neurobiología, los avances que revelan la presencia de células madres neurales en el cerebro de mamíferos adultos y la evidencia de neurogénesis en ellos, han hecho reconsiderar el dogma del sistema nervioso de mamíferos como un tejido no renovable.

### **1.1. Neurogénesis**

La neurogénesis en vertebrados es un fenómeno ampliamente investigado, y que ocurre normalmente en los estadios tempranos de su desarrollo. Investigaciones de los últimos 20 años en vertebrados, han mostrado neurogénesis en adultos en algunas zonas específicas, donde se generan nuevas células destinadas a distintas regiones del telencéfalo (Álvarez-Buylla y cols.,

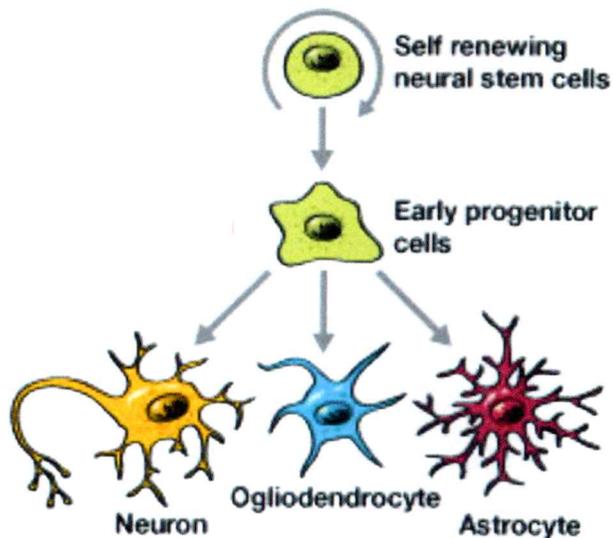
1997; Zupanc, 2001), y que han sido nombrados como “nichos”, pues mantendrían ciertas características homeostáticas apropiadas para la mantención de células madres neurales. Es así como en aves y ratones se ha observado neurogénesis en amplias zonas del cerebro, como es el caso del *nidopallium* y telencéfalo medio (hipocampo) en aves (Nottebohm y cols., 1994; Barnea y Nottebohm, 1996), y el giro dentado en el hipocampo y la capas granulares del bulbo olfatorio en ratones (Figura 2; Lois y cols., 1994; Hack y cols., 2005). En cambio, otros vertebrados como reptiles, anfibios y peces muestran amplias zonas de proliferación, incluso con crecimiento continuo del cerebro, como es el caso del cerebro anterior en reptiles, y la retina y *tectum* óptico en teleósteos (Font y cols., 2001; Marcus y cols., 1999). En los vertebrados inferiores, los nichos de células madres son más abundantes que en ratones o aves, y han sido encontrados en otras zonas además del telencéfalo (Kaslin y cols., 2008).



**Figura 2. Neurogénesis en mamíferos.** Esquema del telencéfalo de un mamífero adulto. Se observa las zonas en que se ha visto neurogénesis (área azul), acotada básicamente al bulbo olfatorio; y zonas donde se han encontrado nichos de células madres como el Giro Dentado (DG) y la zona sub ventricular (SVZ) (área roja). (adaptado de Kaslin y cols., 2009).

## 1.2. Células progenitoras neurales

Las células progenitoras neurales tienen la capacidad del auto-renovarse y de producir los tres principales tipos celulares del sistema nervioso. Desde que Reynolds, Weiss y sus colegas lograron aislar células madres neurales por primera vez hace 2 décadas (Reynolds y cols., 1992a, Reynolds y cols., 1992b), numerosos experimentos han corroborado este descubrimiento. Estos autores mostraron que células aisladas desde lugares específicos del sistema nervioso central de embriones y ratones adultos, y que se propagan en presencia de factores de crecimiento, originan esferas celulares que ellos denominaron "neuroesferas". A su vez mostraron que las neuroesferas contenían tanto células progenitoras como neuronas y células gliales, las cuales podían ser subsecuentemente disociadas para producir una nueva neuroesfera, y por ende nuevas células progenitoras, neuronas y células gliales. Por lo tanto, las células productoras de neuroesferas tienen la propiedad de una célula madre, es decir, pueden auto-renovarse y son multipotentes (Figura 3; Potten y cols., 1990).



**Figura 3. Células madres neurales.** Esquema que muestra como una célula madre neural se puede autorenovar y generar progenitores. A partir de estos, es posible generar cualquier tipo celular presente en el sistema nervioso de vertebrados, ya sea neuronas, oligodendrocitos o astrocitos (obtenida de [http://www.ninds.nih.gov/disorders/brain\\_basics/ninds\\_neuron.htm](http://www.ninds.nih.gov/disorders/brain_basics/ninds_neuron.htm)).

### 1.3. Genes Sox

Los genes Sox's codifican para una gran familia de factores de transcripción, que se caracterizan por compartir una secuencia homóloga llamada caja HMG (High Mobility Group). Esta caja HMG corresponde a un dominio de unión a DNA muy conservado en eucariontes y se ha visto su participación en el desarrollo de diversos tejidos. Genes de la familia Sox han sido identificados en una amplia variedad de organismos (Guth, 2008). Hasta la fecha se han descrito 26 genes Sox en vertebrados, los cuales se han ordenado en 9 subgrupos basado en la similitud de sus secuencias (Bowles y cols., 2000; Pevny y cols., 1997; Genetic Home Reference: <http://ghr.nlm.nih.gov/>). Muchos de estos genes a su

vez, han sido asociados a funciones en el sistema nervioso y a la mantención de progenitores neuronales (Tabla 1; Revisado por Pevny L. y Placzek M., 2005).

**Tabla 1.** Miembros de la familia de genes Sox que se expresan en el sistema nervioso de varios modelos vertebrados. (modificado de Pevny L. y Placzek M., 2005).

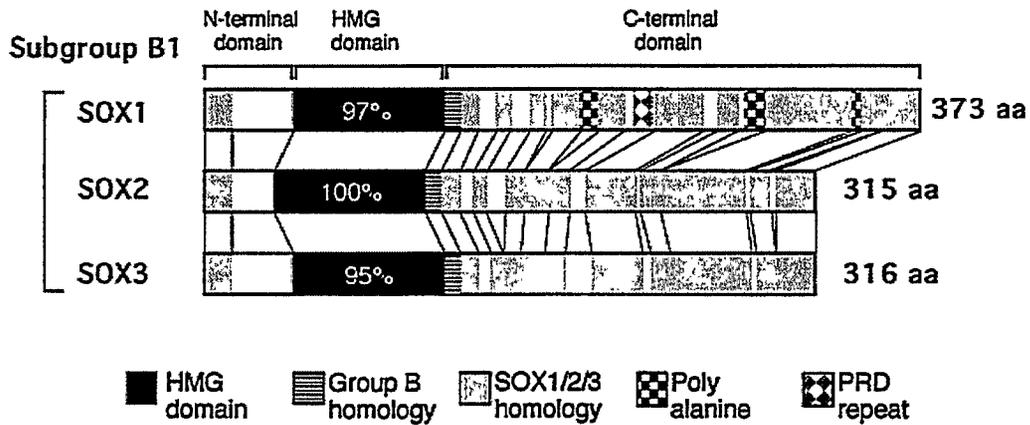
SOX family members in CNS and PNS, progenitor cells.			
Sox group	Gene	Species	Location of expression of SOX factors involved in maintaining progenitor fate
SOXB	<i>SoxB</i>	<i>Amphioxus</i>	Neural primordium
SOX B1	<i>Sox1</i>	Mouse	Neural plate, proliferating progenitors of CNS throughout ontogeny
		Chick	
	<i>Drosophila (SoxNeuro)</i>	Proliferating progenitors of embryonic CNS. Neuroblasts of CNS	
	<i>Sox2</i>	Mouse	Neural plate, proliferating progenitors of CNS throughout ontogeny.
		Chick	
	<i>Xenopus</i>	Neural plate, proliferating progenitors of CNS and PNS throughout ontogeny	
	<i>Drosophila (Dichaeta)</i>	Neural plate, proliferating progenitors of CNS and PNS throughout ontogeny Neuroblasts of CNS and midline glia	
	<i>Sox3</i>	Mouse	Neural plate, proliferating progenitors of CNS throughout ontogeny
		Chick	
	<i>Xenopus</i>	Neural plate and embryonic proliferating progenitors	
SOX B2	<i>Sox14</i>	Mouse	Subclass of interneurons in the developing spinal cord
		Chick	Subclass of interneurons in the developing spinal cord
	<i>Sox21</i>	Mouse	Ventricular zone of the developing nervous system
		Chick	Ventricular zone of the developing nervous system
SOX E	<i>Sox9</i>	Mouse	Neural crest progenitors, crest derivatives of branchial arches
		Chick	Neural crest progenitors, crest derivatives of branchial arches
	<i>Xenopus</i>	Neural crest progenitors	
	<i>Sox10</i>	Mouse	Neural crest progenitors, melanoblasts and glia
		Chick	Neural crest progenitors, melanoblasts and glia
	<i>Xenopus</i>	Neural crest progenitors, melanoblasts and glia	

#### 1.4. Familia SoxB1

Varios estudios sobre el desarrollo del sistema nervioso de vertebrados, han demostrado que los genes de la sub familia SoxB1 (*Sox1*, *Sox2* y *Sox3*, (comparados en Figura 4), son co-expresados en los neuroepitelios o futuros tejidos neurales durante la embriogénesis (Wood y cols., 1999). Estos factores de transcripción son responsables de mantener un amplio potencial en el desarrollo y le confieren identidad a las células madres neurales y a las células

progenitoras neurales (Pevny y cols., 1997; Bylund y cols., 2003; Graham y cols., 2003; Zhao y cols., 2004). Ratones mutantes de Sox1 (Nishiguchi y cols., 1998) y Sox3 (Rizzoti y cols., 2004) son viables y sin defectos evidentes en el CNS, sugiriendo una función redundante entre ellos. A su vez, se ha observado que Sox2 es expresado en células madres embrionarias y células precursoras durante el desarrollo (incluyendo células madres neurales) (Ferri y cols., 2004) y en células gliales que representarían una población de células madres en el adulto (Álvarez-Buylla y cols., 2002). El ratón mutante para el gen Sox2 es inviable, pues si bien llega a etapas de blastocisto, mueren tras implantarse (Avilion y cols., 2003). Por lo tanto Sox2 es un gen clave en la auto-renovación y proliferación de precursores neurales (Ferri y cols., 2004).

Se ha encontrado que esta familia de genes Sox actúa con la ayuda de cofactores, los cuales son importantes para explicar su actividad específica en distintos genes blancos (Pevny y Nicolis, 2010). Por ejemplo, se ha visto que para determinar ciertos tipos celulares en el ojo de vertebrados, Sox2 puede actuar junto con Pax6 y activar genes blanco en el cristalino (Kondoh y Kamachi, 2010), o utilizar como cofactor a Otx6 para determinar tipos celulares en la retina (Danno y cols, 2008). Por este mecanismo de acción vía cofactores, pequeñas diferencias de concentración de genes SoxB1, pueden producir importantes diferencias en la expresión de genes blanco.



**Figura 4. Familia SoxB1.** Comparación de las proteínas de la familia SoxB1, Sox1, Sox2 y Sox3, donde se muestra el dominio HMG y el porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos de esta región, comparado con la secuencia de Sox2. (modificado de Uchikawa y cols., 1999).

### 1.5. Regulación de genes Proneurales por genes Sox

Los factores de transcripción de tipo proneural están involucrados en la neurogénesis, dirigiendo la salida de los progenitores neurales del ciclo celular y mediando la expresión de genes característicos de neuronas post-mitóticas (Bertrand y cols., 2002). Los estudios de Bylund y cols. (2003) y Graham y cols. (2003) mostraron que la inhibición de SOX2 usando dominantes negativos promovería la diferenciación prematura de precursores, es decir, la salida del ciclo celular, la pérdida de marcadores de progenitores y la adquisición de nuevos marcadores neurales tempranos de tipo proneural. Estos autores proponen que los factores SoxB1 pueden suprimir la actividad de los genes proneurales, pero cuando se alcanza un umbral crítico, es necesaria a su vez, la supresión de los factores SoxB1 por parte de los genes proneurales, permitiendo de esta forma la diferenciación a neuronas. Por lo tanto, las proteínas SOXB1 tendrían como

función inhibir la neurogénesis, la cual estaría regulada por el balance de actividad entre genes SoxB1 y genes proneurales (Episkopou, 2005).

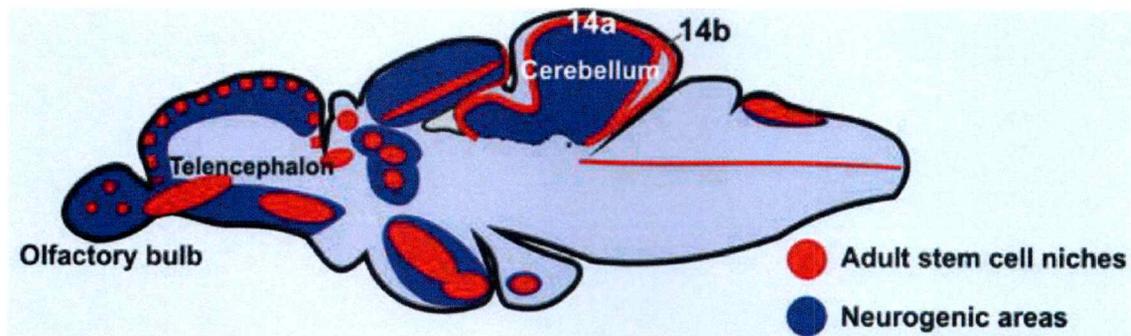
## 1.6. Modelo del Pez cebra

Diversas características hacen del pez cebra un excelente modelo de estudio en biología del desarrollo y regeneración. Entre sus ventajas se pueden mencionar la fecundación externa, por lo que todas las etapas del desarrollo son accesibles; la transparencia de los embriones, pudiendo observarse todos los procesos del desarrollo tanto internos como externos; y un tiempo de generación relativamente corto (aproximadamente 3 meses). Poseen, además, un rápido desarrollo, ya que a las 72 hpf tienen la mayoría de sus órganos presentes y funcionales, incluyendo todos los sistemas sensoriales.

Actualmente existe una gran colección de mutantes químicos e insercionales, muchos de los cuales están disponibles para la comunidad científica (<http://www.zfin.org>). Existe además un genoma secuenciado y bien anotado, lo que constituye una excelente herramienta para los análisis bioinformáticos y comparativos. A su vez, existen diversas y eficaces técnicas para realizar transgénesis, sumado a la posibilidad de inhibir específicamente la actividad génica mediante el uso de oligonucleótidos antisentido denominados morfolidos, metodología ampliamente utilizada y aceptada en la comunidad científica (<http://www.gene-tools.com>). Finalmente, la capacidad de realizar experimentos *in vivo*, le otorgan a este modelo una ventaja comparativa frente a otros organismos. Todas estas características hacen al pez cebra un excelente modelo vertebrado

para estudios en biología molecular, celular, del desarrollo, genética, neurociencias, inmunología, toxicología etc. (Nüsslein-Volhard y Dahm, 2002, Renshaw y Trede, 2012, Lee y cols., 2012).

En los últimos años, el pez cebra se ha utilizado ampliamente para investigaciones de regeneración en variados órganos y tejidos, como por ejemplo músculos, corazón, páncreas, hígado, aletas, piel, células pigmentarias y sistema nervioso central (Poss y cols., 2003; Raya y cols., 2004; Nakatani y cols., 2007; Hata y cols., 2007; White y Zon, 2008; Becker y Becker, 2008; O'Reilly-Pol y Johnson, 2009; Huang y Zon, 2008; Brignull y cols., 2009; Tal y cols., 2010; Antos y Tanaka, 2010; Antos y Brand, 2011). En varias zonas del sistema nervioso del pez cebra se ha observado una amplia y robusta neurogénesis, que es capaz de generar diferentes subtipos de neuronas y donde los progenitores encontrados están presentes en múltiples sitios del cerebro y cerebelo, siendo esta última la región más abundante en neurogénesis (Figura 5; Zupanc y cols., 2005; Adolf y cols., 2006, Grandel y cols., 2006; Kaslin y cols., 2009). Estas características hacen del pez cebra un modelo adecuado para estudiar *in vivo* nichos de células madres en el sistema nervioso.

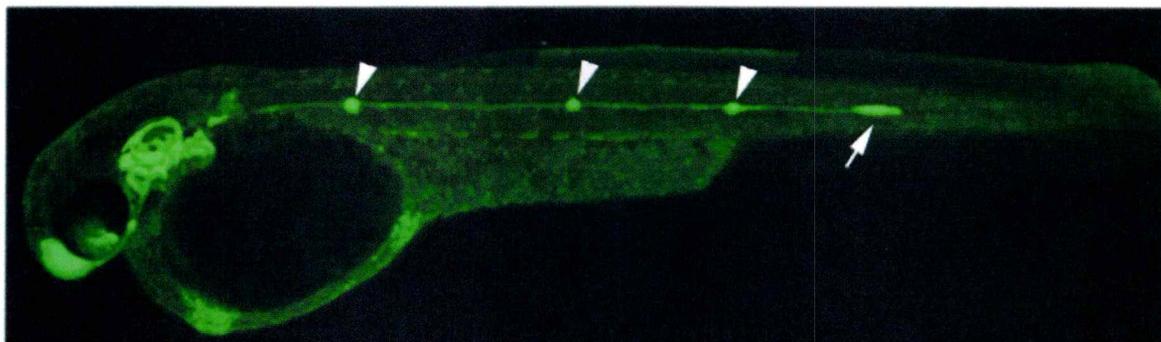


**Figura 5. Neurogénesis en pez cebra.** Esquema del cerebro de un pez cebra adulto, que muestra las zonas donde se ha observado neurogénesis (áreas azules); y donde se han encontrado nichos de células madre (áreas rojas), los cuales, a diferencia del telencéfalo de mamíferos, están abundantemente distribuidos a través del eje rostrocaudal del cerebro y en zonas dorsomediales del cerebelo. (adaptado de Kaslin y cols., 2009).

### 1.7. Línea Lateral del pez cebra

El pez cebra presenta, al igual que otros peces y anfibios, un sistema mecanosensorial llamado línea lateral, el cual permite al pez detectar cambios de presión y movimientos del agua. Este sistema está implicado en una serie de comportamientos, como la natación en cardumen, el apareamiento y la detección de presas. La línea lateral se origina durante la neurulación desde las placodas ectodérmicas que se encuentran rostral y caudal a la placoda ótica. A partir de las placodas ubicadas a ambos costados del pez, alrededor de las 20 horas post-fertilización (hpf) se desprenden dos grupos de aproximadamente 200 células (primordios migratorios). Uno migra hacia la cabeza, dando origen a la línea lateral anterior (LLA), y otro hacia la cola a lo largo del miosepto horizontal, dando origen a la línea lateral posterior (LLP) (Figura 6; Metcalfe y cols. 1985; Ghysen y cols., 2004). Durante la migración del primordio de la LLP, se depositan 6 a 8 grupos de

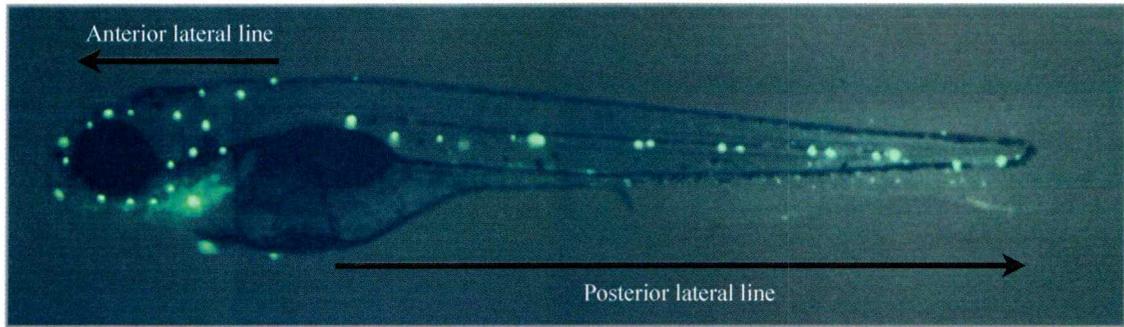
alrededor de 20 células, formando los proneuromastos, los que darán origen luego de diferenciarse a los neuromastos, que son los órganos sensoriales de este sistema mecanosensorial.



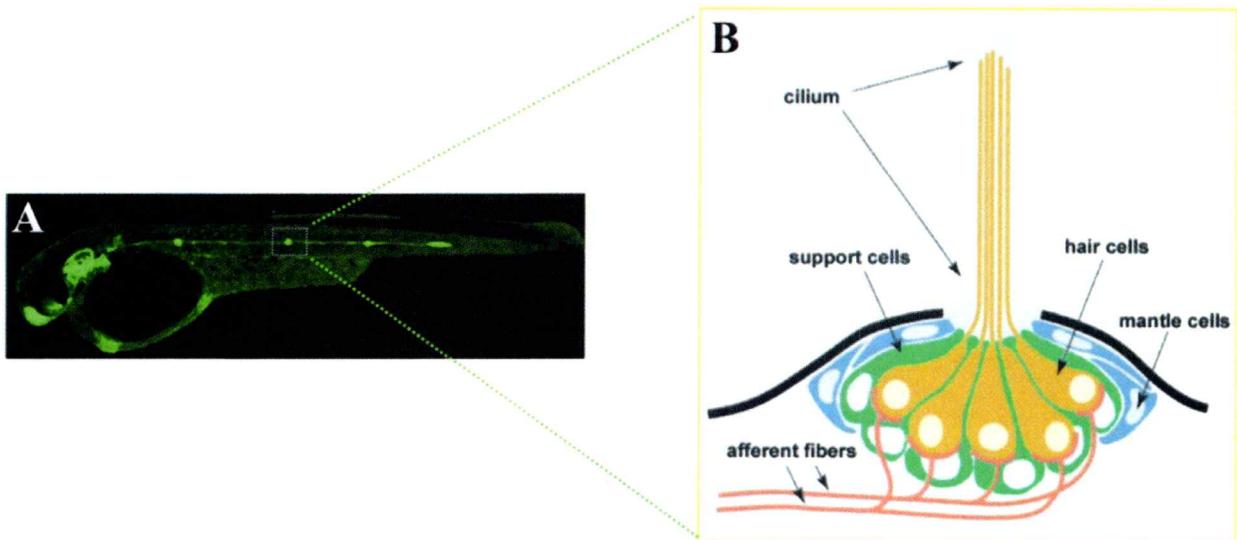
**Figura 6. Desarrollo de Línea Lateral Posterior del Pez cebra.** Embrión de pez cebra transgénico *cldnb:GFP* de 42 hpf, donde se observa la expresión de GFP en el primordio migratorio en el miosepto horizontal (flecha), y 3 proneuromastos depositados de la línea lateral posterior (puntas de flecha). (Hass y cols, 2006).

Al llegar al final de la cola del pez, el primordio se fragmenta en 2 o 3 partes, formando los proneuromastos terminales, obteniéndose un sistema con todos sus proneuromastos ya depositados a las 48 hpf (Figura 7). Una vez depositados los neuromastos, las células centrales se diferencian a células ciliadas mecanosensoriales, y las más periféricas, a células accesorias de dos tipos: las células del manto, que le dan la forma al neuromasto; y las células de soporte, que rodean a las ciliadas y le dan la estructura adecuada para su funcionamiento, obteniéndose finalmente un neuromasto maduro (Figura 8). En paralelo a estos procesos de diferenciación, las células ciliadas son invadidas por neuronas sensoriales localizadas en el ganglio de la línea lateral, y cuyos axones llegan al cerebro posterior (Ghysen y cols., 2004).





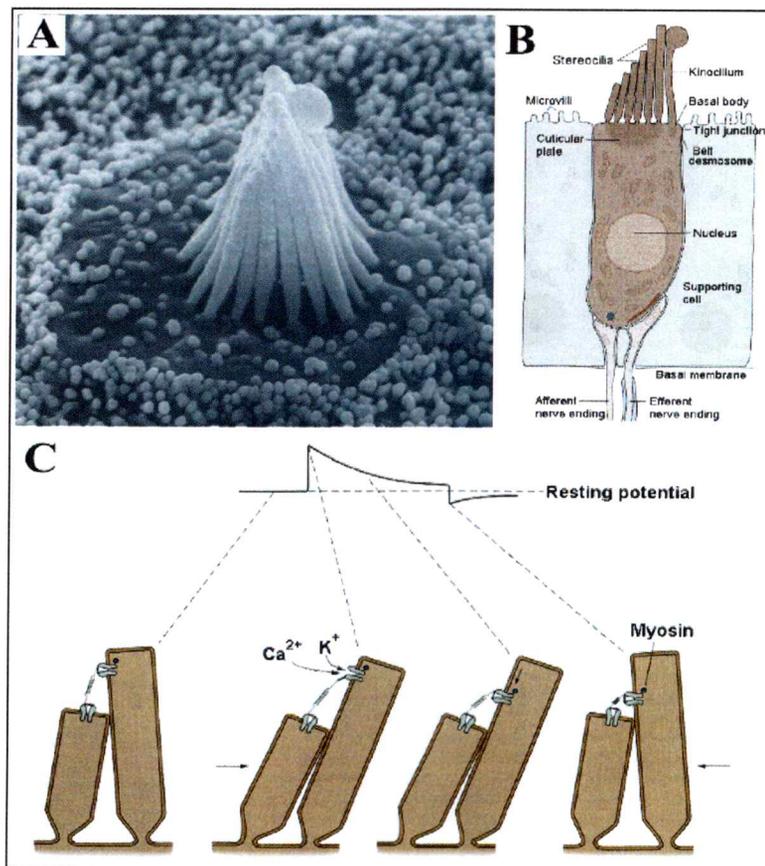
**Figura 7. Línea lateral anterior y posterior del pez cebra.** Larva de pez cebra de 3 dpf. Se observan las células ciliadas maduras, marcadas con tinción vital DiAsp, de la línea lateral anterior y posterior (modificado de Whitfield y cols, 1996).



**Figura 8. Esquema de un neuromasto maduro de la línea lateral del pez cebra.** A) Embrión transgénico *cldnb:GFP* de 42 hpf. Se observa la ubicación de un neuromasto de la línea lateral posterior. B) Esquema que muestra una vista lateral de un neuromasto maduro y los 3 tipos celulares hasta ahora descritos en los neuromastos: las células ciliadas mecanosensoriales (“hair cells”), las células del manto (“mantle cells”), y las células de soporte (“support cells”), además de las fibras nerviosas aferentes que se conectan con la base de las primeras. (imagen A modificada de Hass y cols, 2006, imagen B modificada de Ghysen y cols, 2004).

## 1.8. Células ciliadas mecanosensoriales

Las células ciliadas son mecanorreceptores especializados que transducen los estímulos mecánicos en señales eléctricas. Estas células poseen un kinocilio y numerosos estéreocilios que se proyectan desde su ápice hacia el exterior. Dependiendo de la dirección de movimiento del kinocilio, se produce la apertura/cierre de canales iónicos, que ocasionan cambios en el potencial de membrana de la célula ciliada, generando una señal eléctrica que se traslada al cerebro (Figura 9).



**Figura 9. Células ciliadas en vertebrados.** A) Macrofotografía electrónica de barrido de los cilios de una célula ciliada del oído interno del ratón. B) Esquema de una célula ciliada que muestra la relación entre los cilios y el cuerpo celular, y la innervación que llega a la parte basal de la célula. C) Esquema que ilustra el

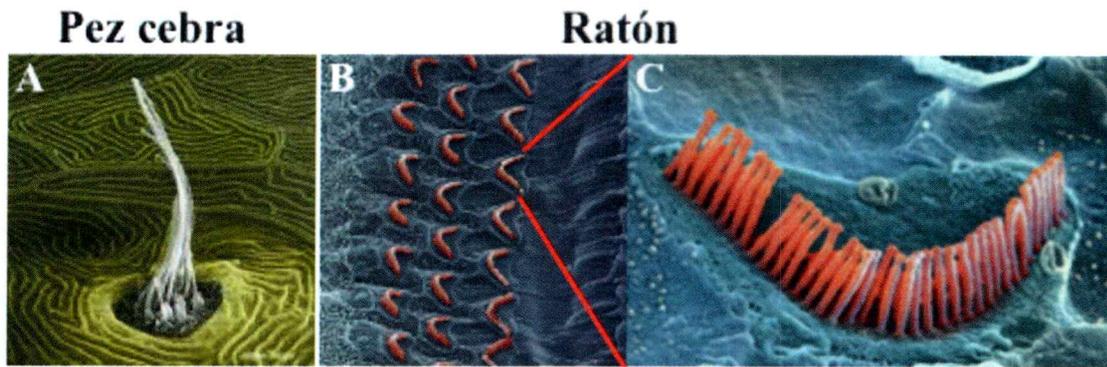
movimiento de los cilios que permite la apertura de canales iónicos y la despolarización de la membrana celular, generando el potencial de acción.

Las células ciliadas que se generan en los neuromastos son muy similares a las células ciliadas presentes en el oído de otros vertebrados (Figura 10); De su comparación resaltan los siguientes aspectos compartidos:

a) Programa genético, pues en todas las células ciliadas de embriones tempranos se expresan los genes *Sox2* y *atoh1a* (*atoh1a*) (revisado ampliamente en Cotanche y cols., 2010).

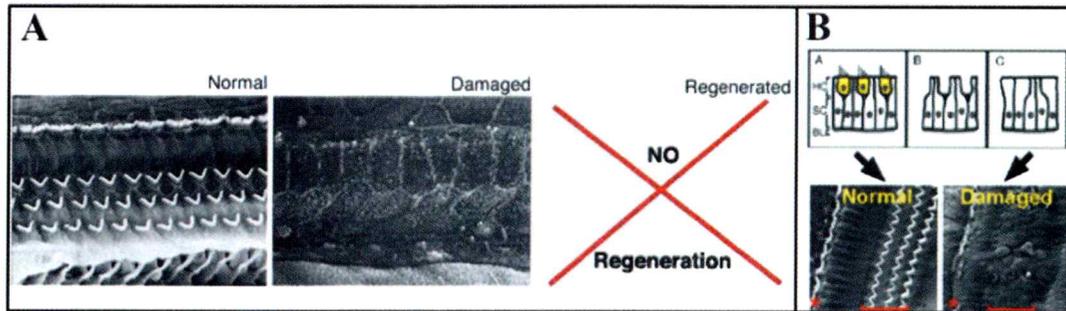
b) Características morfológicas, ya que ambos grupos de células ciliadas poseen un gran núcleo y tienen largos cilios que se prolongan hacia el exterior (Figuras 9 y 10).

c) Características fisiológicas, pues las células de ambos organismos son sensibles al mismo tipo de compuestos, como lo son los antibióticos, que bloquean los canales iónicos de los cilios (Selimoglu E., 2007; Harris y cols., 2003).



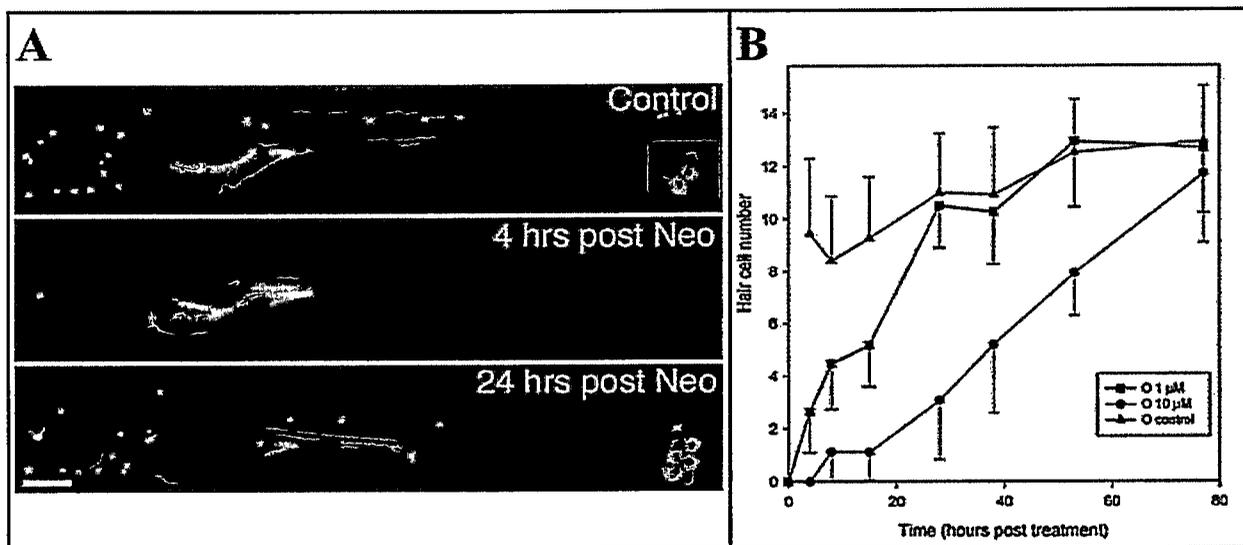
**Figura 10. Células ciliadas en el neuromasto de pez cebra y oído del ratón.** A) célula ciliada de un neuromasto, donde se aprecian los largos kinocilios mecanosensoriales que emergen desde la superficie del pez a través de un agujero en la epidermis. B) células ciliadas del órgano de Corti del ratón, C) detalle de las células ciliadas del ratón, donde se aprecian los cilios mecanosensoriales emergiendo de la superficie. (Imagen A adaptada de Nicolson y cols., 1998; imagen B y C modificadas de Science Photo Library/Scanpix).

Una de las principales diferencias entre los distintos tipos de células ciliadas mecanosensoriales en vertebrados radica en que las células ciliadas perdidas en mamíferos por toxicidad u otros tipo de daño no son reemplazadas, llevando a una deficiencia auditiva irreparable (Figura 11; Chardin y Roman, 1995, Kwan y cols., 2009). Si bien se ha visto proliferación en el epitelio vestibular de ratones luego de un daño en sus células ciliadas, se cree que las células que se dividen (posibles progenitores), solo forman células de soporte no sensoriales (Rubel y cols., 1995). Sin embargo, ha sido posible obtener células desde la cóclea del oído interno de ratón y, luego de cultivarlas *in vitro*, regenerar células ciliadas a partir de ellas (Li y cols. 2003). Además, la transfección de un vector viral que expresa *atoh1a* en embriones de cobayo carentes de células ciliadas, puede recuperar la audición en estos animales (Kawamoto y cols., 2003).



**Figura 11. Ausencia de regeneración de células ciliadas en mamíferos.** La pérdida de las células ciliadas en la cóclea de los mamíferos es permanente. A) se muestra el epitelio del órgano de Corti de rata que contiene las células ciliadas en estado normal, las que luego de un daño, no regeneran (adaptado de Lenoir M, 2004). B) Se observa que las células ciliadas, presentes en el epitelio coclear de ratones, posterior a un daño no regeneran y solo se aprecia una reparación del tejido superficial (adaptado de Kwan y cols., 2009).

Sin embargo, se ha visto que las células ciliadas de otros vertebrados, como las del oído y de la línea lateral del pez cebra, regeneran luego de un daño inducido por antibióticos o metales pesados (Figura 12; Harris y cols., 2003; Hernández y cols., 2006, 2007) recuperándose estructural y funcionalmente.

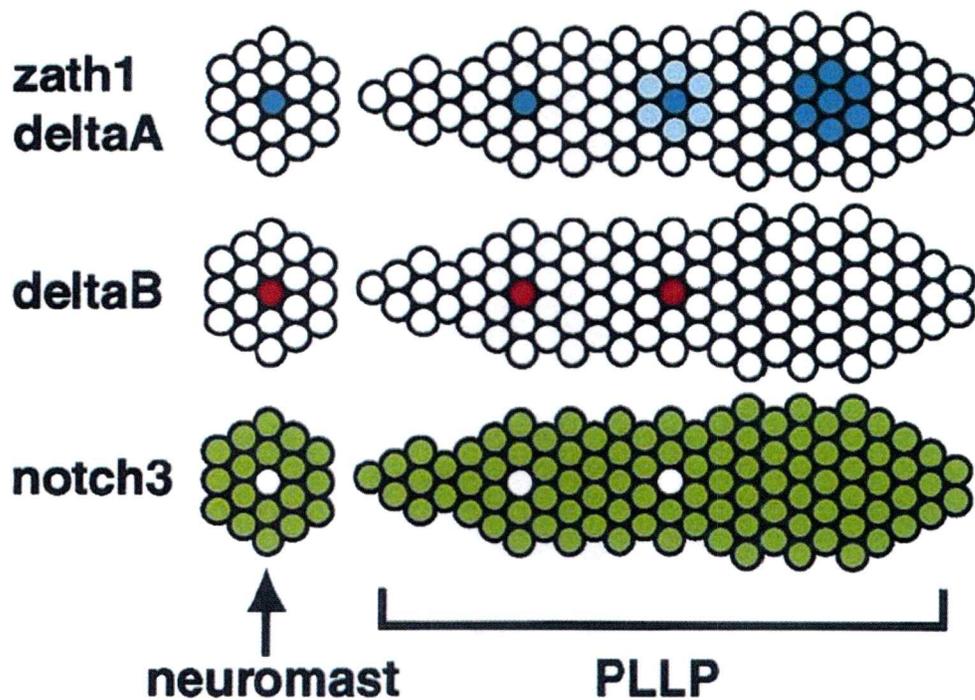


**Figura 12. Regeneración de células ciliadas en la línea lateral.** En el pez cebra se ha observado una robusta regeneración de sus células ciliadas. Se puede observar en (A) larvas controles con las células ciliadas marcadas con DiAsp (imagen superior), otras tratadas 4 horas con Neomicina lo que provoca la pérdida de la marca (imagen del medio), y 24 horas post tratamiento (imagen inferior) donde se observa la recuperación de la marca y por ende de las células ciliadas. (adaptado de Harris y cols., 2003). En (B) se graficó el número de células ciliadas en neuromastos de larvas control y tratadas con 1  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$ . Se observa la cinética de regeneración, la cual, dependiendo de la concentración de cobre utilizada, alcanza valores similares a los del grupo control de 24-28 horas para 1  $\mu\text{M}$ , y de dos días para 10  $\mu\text{M}$  (adaptado de Hernández y cols., 2007).

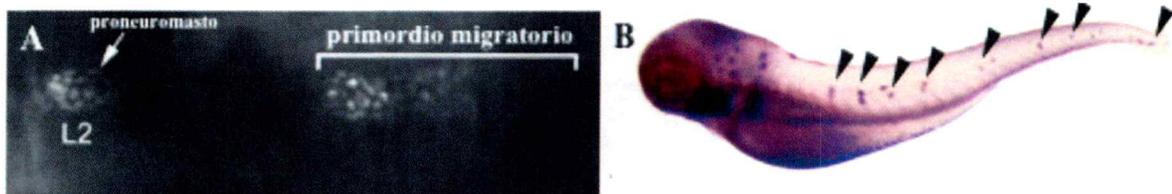
Por lo tanto, los antecedentes publicados sugieren que en la línea lateral del pez cebra deben existir células progenitoras, presumiblemente mezcladas con las accesorias, que serían capaces de auto-renovarse y de producir nuevas células ciliadas. Sin embargo, los progenitores que estarían presentes en este sistema no han sido aún caracterizados en el pez cebra.

## 1.9. Genes Proneurales en la línea lateral del pez cebra

En el pez cebra, como en otros vertebrados, el desarrollo de las placodas ectodérmicas y sus derivados están bajo el control de genes proneurales. El gen *neurogenina1* (*ngn1*), está involucrado en el desarrollo de las neuronas del ganglio que inerva la línea lateral posterior, pero no parece estar involucrado en la diferenciación de las células ciliadas (Anderman y cols., 2002). A su vez se ha descrito la participación de la vía *Notch-Delta* en la activación de los precursores de estas células, pues perturbaciones en esta vía provocan una sobreproducción de células ciliadas en los neuromastos de la LLP (Itoh y cols., 2001). En nuestro laboratorio se ha demostrado que en el proceso de diferenciación de las células ciliadas participan otros dos genes proneurales, como son *neuroD* (*nrd*) y *atona1 homolog1* (*ath1*). Tanto los genes proneurales como los neurogénicos se expresan durante la migración del primordio migratorio, previo al depósito de los proneuromastos (Sarrazin y cols., 2006 y esquematizado en Figura 13). Por otro lado, el gen marcador de células progenitoras neurales, Sox2, también se expresa en el primordio migratorio y en células basales y periféricas en los neuromastos de la LLP (Figura 14; Rauch y cols., 2003; Hernández y cols., 2007). Finalmente, las células Sox2 positivas presentes en los neuromastos proliferan durante la regeneración que ocurre luego de un daño en las células ciliadas (Hernández y cols., 2007).



**Figura 13. Genes proneurales y neurogénicos en la línea lateral posterior.** Esquema que muestra la expresión de los genes proneurales y neurogénicos *atoh1a* (*zath1*), *deltaA*, *deltaB* y *notch3* en el primordio migratorio y neuromastos de la LLP. PLLP: Primordio de la línea lateral posterior. (modificado de Itoh y cols., 2001).



**Figura 14. Expresión de Sox2 en la línea lateral.** A) Inmunohistoquímica de Sox2 en un embrión de 35 hpf, donde se observa la expresión en el primordio migratorio y el proneuromasto L2 recién depositado. B) Hibridación *in situ* de un embrión de 72 hpf utilizando una sonda específica para *sox2* y que muestra marca en neuromastos maduros tanto de la línea lateral anterior (alrededor de la cabeza), como de la línea lateral posterior (puntas de flecha en tronco y cola). (adaptado de Hernández y cols., 2007).

Los antecedentes indican que en la línea lateral del pez cebra existen células progenitoras que comparten las características clásicas de progenitoras neurales, tal como se ha observado en el oído de mamíferos. La identificación de estas células progenitoras, con propiedades troncales, en la línea lateral, ofrecería nuevas alternativas para el estudio de la diferenciación y regeneración de células ciliadas asociadas a órganos sensoriales.

## **II. HIPOTESIS**

Durante el desarrollo de la línea lateral del pez cebra, se genera una población de progenitores neurales multipotentes, que permanece en neuromastos y que participan en la regeneración de células ciliadas cuando estas son dañadas.

## **III. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo General**

Caracterizar *in vivo* las células progenitoras neurales involucradas en los procesos de desarrollo y regeneración de la línea lateral en larvas de pez cebra.

### **3.2. Objetivos Específicos**

**1.- Identificar con marcadores específicos las células progenitoras neurales presentes en:**

- a) El primordio que da origen a la línea lateral posterior.
- b) Los neuromastos funcionales ya depositados.

**2.- Verificar *in vivo* en los neuromastos de la línea lateral posterior, la presencia de células que presenten características de progenitoras neurales, a saber:**

a) Capacidad de auto-renovación, es decir, células que se puedan mantener como progenitoras en un lugar específico y en un número estable.

b) Características de multipotentes, es decir, pueden dar origen a más de un linaje celular.

## IV. MATERIALES Y METODOS

### 4.1 Material Biológico

Para esta tesis se utilizaron embriones del pez cebra (*Danio rerio*) silvestre de la línea AB (ZFIN). También se utilizaron las siguientes líneas transgénicas (se indica el tipo celular y el tipo de marca de cada uno en la Tabla 2):

- ***Tg(brn3c:gap43-GFP)***, en adelante en esta tesis ***brn3c:mGFP*** (Xiao y cols., 2005, obtenida del laboratorio del Dr. Herwig Baier, UCSF, Estados Unidos),
- ***Et(krt4:EGFP)sqetca4***, en adelante en esta tesis ***Et4:GFP*** (Parinov y cols., 2004, Williams y cols., 2010, obtenidos del laboratorio del Dr. Vladimir Korzh, IMCB, Singapur),
- ***Bglobin/SOX3hs7:GFP***, en adelante en esta tesis ***Sox3h7:GFP*** (Navratilova y cols., 2009, obtenida del laboratorio del Dr. Thomas Becker, Sars Centre for marine Molecular Biology, Noruega),
- ***Tg(atoh1a:dTomato)***, en adelante en esta tesis ***atoh1a:Tom*** (Kani y cols., 2010, obtenida del laboratorio del Dr. Shin-ichi Higashijima, Okasaki Institute for Integrative Bioscience, Japón),
- ***Tg(NFkB:EGFP)***, en adelante en esta tesis ***NFkB:GFP*** (Kanther y cols., 2001, obtenida del laboratorio del Dr. Kanther, Universidad de Carolina del Norte, Estados Unidos),
- ***Tg(-8.0cldnb:lynEGFP)***, en adelante en esta tesis ***cldnb:mGFP*** (Hass y

Gilmore, 2006, obtenida del laboratorio del Dr. Darren Gilmour, EMBL Heidelberg, Alemania),

**Tabla 2. Líneas transgénicas del pez cebra utilizadas en esta tesis, tipos celulares marcados y ubicación de la marca.**

<b>Líneas transgénicas</b>	<b>Células marcadas</b>	<b>Tipo de marca</b>
<b><i>brn3c:mGFP</i></b>	Células ciliadas	Membrana citoplasmática
<b><i>Et4:GFP</i></b>	Células ciliadas	Citoplasma
<b><i>sox3h7:GFP</i></b>	Células de soporte	Citoplasma
<b><i>pNFkB:GFP</i></b>	Células del manto	Citoplasma
<b><i>atoh1a:TOM</i></b>	Células precursoras de células ciliadas	Citoplasma
<b><i>cldnb:GFP</i></b>	Todas las células del neuromasto	Membrana citoplasmática
<b><i>sox3h7:GFP/brn3c:mGFP</i></b>	Células de soporte y células ciliadas	Citoplasma y membrana citoplasmática
<b><i>sox3h7:GFP/atoh1a:Tom</i></b>	Células de soporte y células precursoras de células ciliadas	citoplasma
<b><i>atoh1a:Tom/brn3c:mGFP</i></b>	Células precursoras de células ciliadas y células ciliadas	Citoplasma y membrana citoplasmática

Además, en el transcurso de esta tesis, fueron generadas en nuestro laboratorio las siguientes líneas transgénicas dobles:

- ***Bglobin/SOX3hs7:GFP x Tg(brn3c:gap43-GFP)***, en adelante en esta tesis ***sox3h7:GFP/brn3c:mGFP***.
- ***Bglobin/SOX3hs7:GFP x Tg(atoh1a:dTomato)***, en adelante en esta tesis ***sox3h7:GFP/atoh1a:Tom***.
- ***Tg(atoh1a:dTomato) x Tg(brn3c:gap43-GFP)***, en adelante en esta tesis ***atoh1a:Tom/brn3c:mGFP***.

Los peces adultos se mantienen en acuarios con agua recirculante a 28°C, con ciclos de luz y oscuridad de 14/10 horas y de acuerdo a protocolos establecidos de alimentación y cuidado (Westerfield, 1994). Los embriones fueron obtenidos por cruces espontáneos en cámaras de doble fondo y mantenidos en medio E3 (5 mM NaCl, 0,17 mM KCL, 0,33 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,3 mM MgSO<sub>4</sub> y 0,1 % de Azul de Metileno). Los estadios se expresan en horas post fecundación (hpf) y días post fecundación (dpf) según nomenclatura de Kimmel y cols., 1995.

#### **4.2 Tratamientos con Sulfato de Cobre**

Para dañar los distintos tipos celulares presentes en la línea lateral del pez cebra se incubaron las larvas en distintas concentraciones de CuSO<sub>4</sub> (Merck), disuelto en agua sin nucleasas (Winckler). Para las distintas concentraciones utilizadas se hicieron diluciones de un stock de 10 mM en medio E3. Las larvas a tratar, se descorionaron e incubaron en las distintas concentraciones de CuSO<sub>4</sub> en

placas Petri, por distintos tiempos a 28°C. Posteriormente fueron lavadas 3 veces con medio E3 seguido de tratamientos posteriores o para ser fijadas en paraformaldehído a 4°C toda la noche.

Para los experimentos de ciclos de regeneración, se usaron larvas transgénicas *brn3c:mGFP* y se hicieron incubaciones sucesivas con 10 µM de CuSO<sub>4</sub> por 1 hora contando las células ciliadas regeneradas luego de 24 horas de regeneración. El tratamiento se repitió durante 4 ciclos independientes de daño y regeneración.

### **4.3 Inmunofluorescencia**

Las inmunohistoquímicas de larvas completas se realizó según el siguiente protocolo: Larvas de distintos estadios fueron fijadas en paraformaldehído a 4°C durante una noche, luego lavadas con PBST (PBS 1X y Tween20 al 0,5%) e incubadas en la solución de bloqueo (2% Suero de cabra, 1% BSA, 1% DMSO, 0,1% Triton X100). Posteriormente las larvas fueron incubadas con el anticuerpo primario disuelto en la misma solución de bloqueo, durante una noche a 4°C, al otro día fueron lavadas 3 veces por 20 minutos con PBST e incubadas en el anticuerpo secundario, también disuelto en la solución de bloqueo descrita, a 4°C durante una noche y lavadas posteriormente con PBST 3 veces por 20 minutos.

Para las inmunofluorescencias con dos anticuerpos primarios, se realizó el tratamiento descrito antes con el 1<sup>er</sup> anticuerpo primario, y luego del último lavado con el anticuerpo secundario, se agregó el 2<sup>o</sup> anticuerpo primario, se incubó toda

la noche a 4°C, se lavó con PBST 3 veces por 20 minutos, se agregó el 2° anticuerpo secundario a las larvas, y se incubaron nuevamente toda la noche a 4°C para al día siguiente lavar 3 veces por 20 minutos con PBST.

En esta tesis se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios, adquiridos comercialmente o donados por los investigadores mencionados y a las concentraciones indicadas para cada uno: Sox2 (Chemicon, 1/200), Sox3 (Dr. Steve Wilson, UCL, Londres; 1/200), Pan-Sox (Dr. Hisato Kondoh, Japon; 1/500), BrdU (Dako, 1/500), PH3 (Sigma, 1/1000), Tubulina Acetilada (Sigma, 1/1000); además de los siguientes anticuerpos secundarios: Mouse IgG-Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, 1/500), Mouse-IgG-Alexa Fluor 594 (Molecular Probes, 1/500), Rabbit IgG-Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, 1/500), Rabbit IgG-Alexa Fluor 596 (Molecular Probes, 1/500) y Rabbit IgG-Alexa Fluor 633 (Molecular Probes, 1/500).

#### **4.4 Hibridaciones in situ (ISH)**

Para la transcripción de las sondas utilizadas en esta tesis, se digirieron los ADN plasmidiales con la enzima de restricción apropiada y se utilizaron las RNA polimerasas adecuadas para cada una (Tabla 3). Luego, 1µg de estos productos, se incubó por 2 horas a 37°C con 2 µl de RNA polimerasa (SP6, T3 o T7), 2 µl de buffer de transcripción, 8 µl de mezcla de NTP digoxigenina, 1 µl DTT 0,1 M, y H<sub>2</sub>O sin nucleasas hasta completar 20 µl, luego de ese tiempo, se incubaron con 2 µl de DNAsa por 30 minutos más. Posteriormente se agregó 30 µl de agua sin nucleasas y se incubó por otros 30 minutos para luego añadir otros 30 µl de agua

sin nucleasas y se precipitó agregando 2  $\mu$ l de LiCl 10 M y 200  $\mu$ l de etanol 100% a -20°C toda la noche. Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 30 minutos y el precipitado obtenido fue lavado con etanol 70%, resuspendiendo en 50  $\mu$ l de agua sin nucleasas y 950  $\mu$ l de buffer de hibridación.

**Tabla 3. RNAs polimerasas y enzimas de restricción utilizadas en la síntesis de las sondas empleadas en esta tesis.**

Nombre de la sonda	RNA polimerasa	Enzima de restricción
<i>sox2</i>	SP6	NotI
<i>sox3</i>	T7	HindIII
<i>oct4</i>	T7	KpnI
<i>neogenina1 (neo1)</i>	SP6	Apal

Las ISH para embriones completos en los estadios deseados fueron realizadas según Thisse y cols. (2008). Los embriones fueron fijados durante una noche a 4°C con paraformaldehído (4% p/v), y almacenados en metanol. Luego fueron hidratados mediante lavados por 5 minutos en distintos porcentajes de metanol/PBST (75%/25%, 50%/50% y 25%/75%, v/v) y lavados 3X 5 minutos en PBST. Luego los embriones fueron permeabilizados con Proteinasa K (10  $\mu$ g/ml) por 45 minutos a temperatura ambiente y fijados inmediatamente con paraformaldehído a 4% por 20 minutos. Luego de este tiempo fueron lavados con PBST 5X 5 minutos y prehibridados en buffer de hibridación a 65°C por 4 horas para posteriormente incubar con la sonda respectiva toda la noche a 65°C. Al otro día se lavaron en formamida a concentraciones decrecientes de 50% y 25% en

SSC 2X, para luego lavar solo con SSC 0,2X e incubados con la misma solución de bloqueo descrita previamente para la inmunohistoquímica, y dejados toda la noche con el anticuerpo anti-digoxigenina (1/4000) previa incubación en la misma solución de bloqueo. Al tercer día se lavaron los embriones con PBST 4X por 20 minutos, luego con solución AP fresca (NaCl 100 mM, Tris 100 mM pH 9.5, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, Tween 20 al 0.1%) 3X por 5 minutos y se revelaron incubando en NBT/BCIP en oscuridad hasta percibir la marca de la sonda y detener la reacción mediante lavados con PBST.

#### **4.5 Incorporación de BrdU**

Para marcar la células en estadio S del ciclo celular, se utilizó la técnica de incorporación de BrdU con tiempos de caza ajustados según el objetivo del experimento. Para determinar la concentración adecuada en la cual el BrdU pueda incorporarse en todas las células que estén proliferando, larvas de 3 dpf fueron incubadas en medio E3 conteniendo 1, 5 y 10 mM de BrdU (Merck) por 1 hora a 28°C. Los pulsos utilizados en experimentos posteriores fueron realizadas con incubaciones de 10 mM de BrdU por 1, 3 y 24 horas siempre a 28°C, luego fueron incubados en medio E3 fresco al menos por 1 hora y fijados en paraformaldehído por toda una noche a 4°C. Al día siguiente fueron lavados 3 veces con PBST, incubados en HCL 2N por 45 minutos a temperatura ambiente, lavados nuevamente con PBST e incubados con anti-BrdU para su detección mediante inmunofluorescencia.

#### **4.6 Marcación Nuclear**

Para marcar los núcleos, las larvas procesadas para inmunofluorescencias fueron teñidas con el colorante DAPI (2  $\mu\text{g/ml}$  en PBST) por 5 minutos y lavadas 3 veces en PBST. Para la marcación de núcleos *in vivo*, las larvas se incubaron en medio E3 con DAPI (2  $\mu\text{g/ml}$ ) por 5 minutos y lavadas 3 veces con medio E3.

#### **4.7 Muerte Celular**

Para la detección de células apoptóticas se utilizó la tinción de Anaranjado de Acridina. Las larvas a analizar fueron descorionadas e incubadas en 1ml de solución de Anaranjado de Acridina en medio E3 fresco (1  $\mu\text{g/ml}$ ) por 5 minutos a 28°C, lavadas 3 veces con medio E3 y observadas inmediatamente o después de ser fijadas en PFA a 4°C toda la noche.

#### **4.8 Microscopia, *time-lapse in vivo*, obtención y procesamiento de imágenes**

Para la obtención de imágenes de microscopía, larvas fijadas fueron montadas sobre cubreobjetos con una gota de medio y observadas bajo microscopía confocal (LSM 510, Zeiss) y/o de epifluorescencia (Axiovert 200, Zeiss); otras larvas, también fijadas, fueron montadas entre dos cubreobjetos en medio 80% PBST-20% Glicerina, sellados los bordes con esmalte de uñas y observadas bajo microscopia confocal y/o de epifluorescencia.

Para los experimentos de *time-lapse in vivo*, las larvas fueron anestesiadas con tricafina (0,016% v/v, Sigma) y montadas en gotas de agarosa de bajo punto de fusión (1,5% p/v, Sigma) en placas pequeñas con cubreobjeto en el fondo; se esperó la solidificación de la agarosa y se agregó a la placa medio E3 con tricafina. Posteriormente, las imágenes obtenidas fueron procesadas y analizadas con el software ImageJ64 (v.1.3 y posteriores) y java 1.6.0\_29 a 64-bit.

#### **4.9 Estadística y análisis**

Para la comparación de tratamientos distintos y/o conteo del número de los distintos tipos celulares presentes en los neuromastos, se realizó el test de ANOVA de una vía para análisis estadístico y de significancia, utilizando el programa Prism 5.0 (GraphPad Prism Software, Inc., USA) y Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

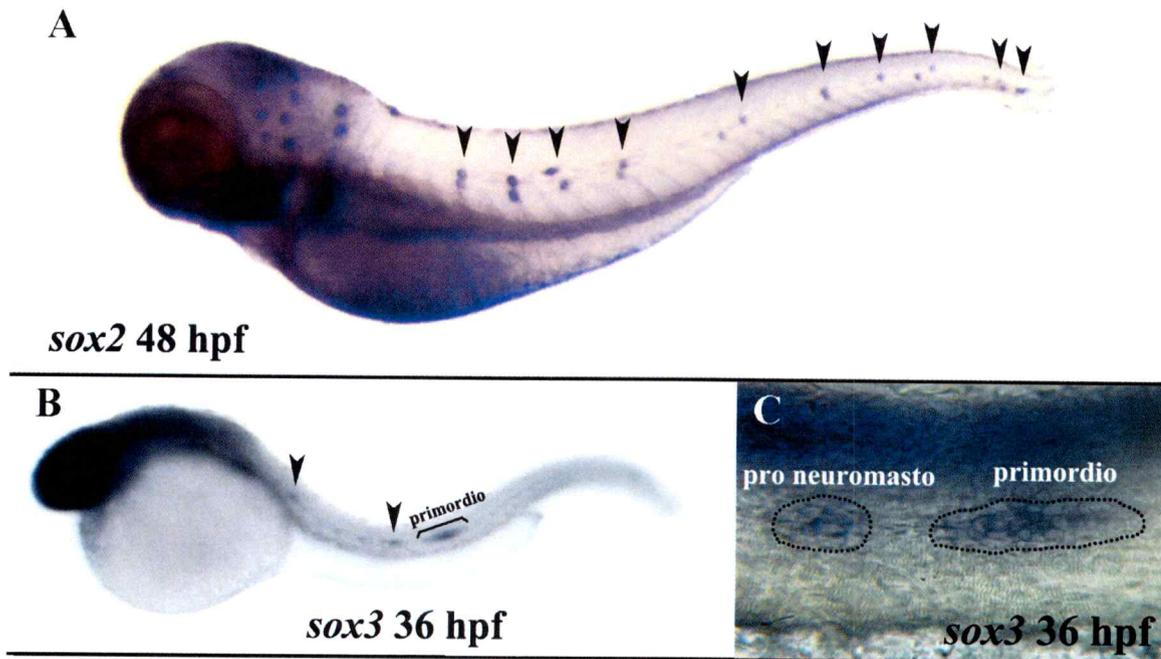
## V. RESULTADOS

**5.1 Identificar con marcadores específicos las células progenitoras neurales presentes a) en el primordio que da origen a la línea lateral posterior y b) en los neuromastos ya depositados.**

Con respecto a este objetivo, se caracterizó una población celular en el primordio migratorio y en los neuromastos, que podría corresponder a las células progenitoras presentes en la línea lateral diferenciada y que explicarían la regeneración de las células ciliadas observada post daño.

### **5.1.1 Hibridaciones *in situ*.**

A partir de los antecedentes previos de otros organismos vertebrados, se realizó una búsqueda de genes candidatos a encontrarse en células progenitoras neurales y se analizó su expresión en el pez cebra mediante hibridación *in situ*. Entre los genes que se expresaron en el primordio migratorio (estadios tempranos entre 28 y 36 hpf) y en neuromastos de larvas (estadios más tardíos de 48 hpf) se encuentran los genes *sox2* y *sox3* (Figura 15). En el transcurso de esta y otros trabajos realizadas por tesisistas del área de biología del desarrollo, se encontraron vía hibridaciones *in situ* otros marcadores, que se muestran y analizan en el Anexo 1, al final de esta tesis.



**Figura 15. Expresión de genes de la familia Soxb1 en embriones de pez cebra.** A) Expresión de *sox2* en un embrión de 48 hpf, en los neuromastos de la línea lateral anterior (alrededor de la cabeza), y línea lateral posterior (a través del tronco y señalados con puntas de flechas) (Hernández y cols., 2006). B) Expresión del gen *sox3* en un embrión de 36 hpf, en los pro-neuromastos recién depositados (puntas de flechas) y en el primordio migratorio de la línea lateral posterior. C) Detalle de la expresión de *sox3* en los pro-neuromastos y en el primordio de la LLP.

Sin embargo, se consideró que la hibridación *in situ* no es una técnica que permita alcanzar un nivel adecuado de resolución como para distinguir claramente células específicas ni para hacer colocalización con otros marcadores. Se efectuó una búsqueda en fuentes comerciales y en la literatura de anticuerpos específicos para estos genes, lo que permitiría obtener mejor resolución en el análisis de las poblaciones celulares específicas que expresan estos genes. Además, es posible combinar las inmunotinciones con la marca fluorescente (*Green Fluorescent Protein*, *Tomato*, entre otras) presente en las

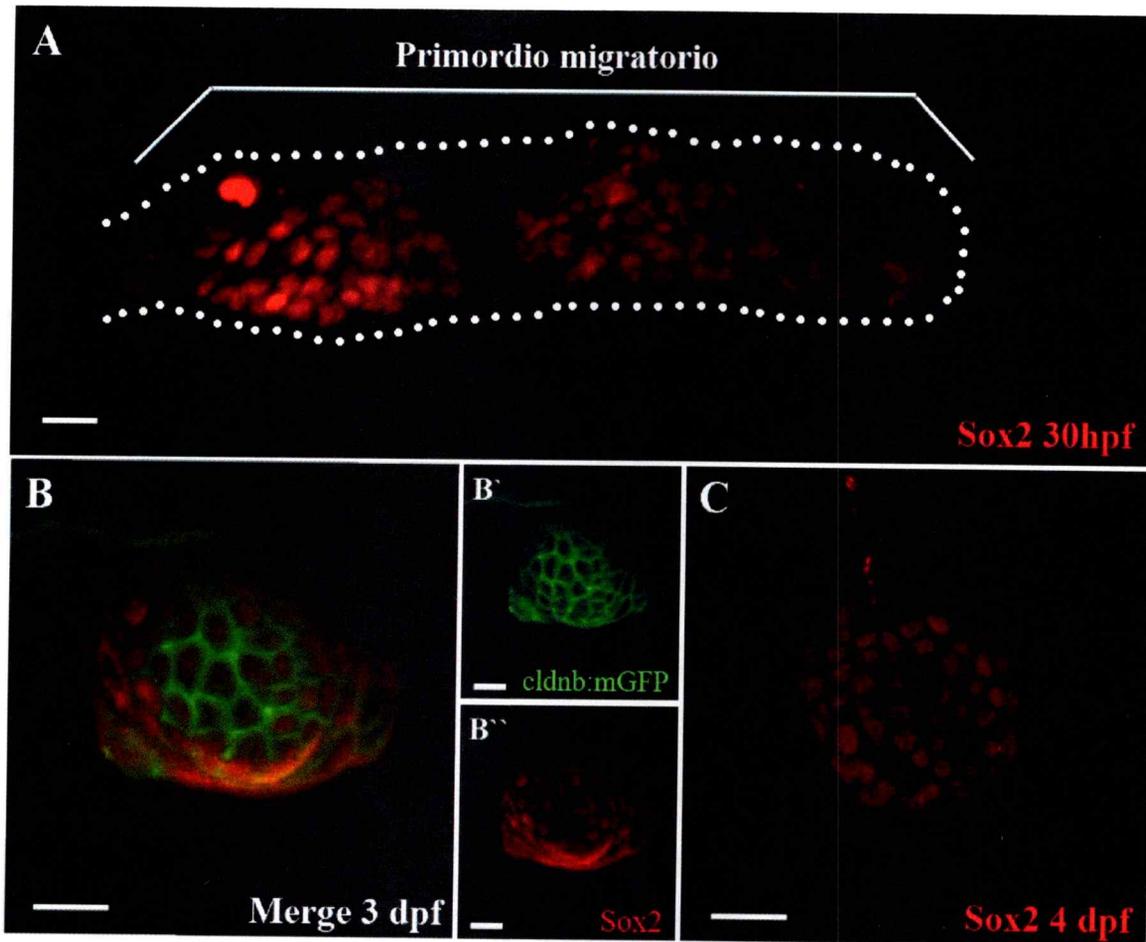
diversas líneas transgénicas disponibles, y que marcan distintos tipos celulares del primordio y de los neuromastos. También es posible combinar los anticuerpos con marcadores nucleares como DAPI para distinguir inequívocamente cada una de las células que se quiere describir en las estructuras en estudio.

Los marcadores de mayor utilidad usados en esta tesis corresponden a anticuerpos que detectan las proteínas de la familia Soxb1. Los anticuerpos específicos utilizados fueron dirigidos hacia las proteínas Sox2, Sox3 y Pan-Sox de mamífero, aunque demostraron reaccionar contra las proteínas del pez cebra respectivas. El anticuerpo anti-Pan-Sox ha sido descrito como capaz de detectar las tres proteínas de la familia Soxb1. Los peces transgénicos utilizados fueron: *sox3h7:GFP*, que expresa la proteína fluorescente verde (GFP) bajo un enhancer humano del gen *sox3*; *atoh1a:Tom*, que expresa la proteína fluorescente roja Tomato bajo el control de elementos reguladores del gen *atoh1a*, y *pNFkB:GFP*, que expresa la proteína fluorescente verde bajo el control de elementos de respuesta del gen NFkB.

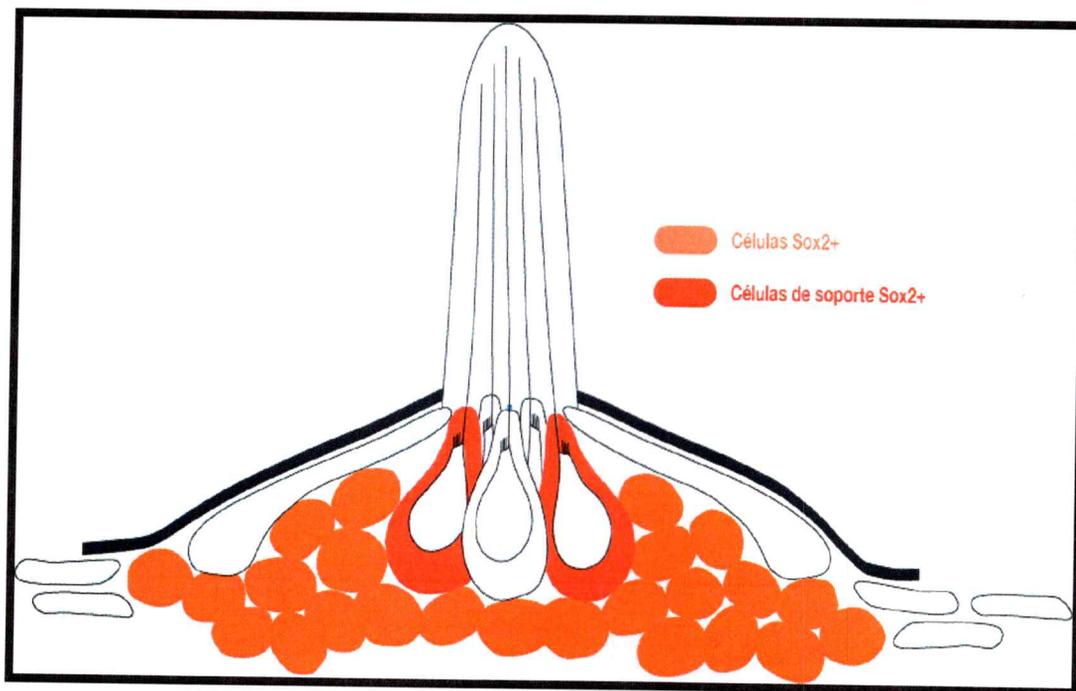
La caracterización de los distintos tipos celulares de la línea lateral se realizó analizando combinadamente los patrones de expresión de los marcadores anteriormente mencionados vía inmunofluorescencia, en conjunto con las marcas de GFP/RFP expresadas por las líneas transgénicas utilizadas en esta tesis (Tabla 1), y que nos muestran la localización de las células presentes en el primordio migratorio y en los neuromastos funcionales, y en algunos tipos celulares específicos, como las células ciliadas y de soporte, presentes también en los neuromastos.

### **5.1.2 Expresión de Sox-2 en la línea lateral del pez cebra**

La expresión del mRNA de *sox2* y de la proteína respectiva había sido descrito anteriormente en nuestro laboratorio (Hernández y cols., 2008), aunque este análisis no incluyó la ubicación precisa de las poblaciones celulares que expresan la proteína en el neuromasto, ni la colocalización del marcador con otros genes o proteínas. Con técnicas de inmunofluorescencia y microscopía, se pudo determinar la presencia de esta proteína en núcleos de células ubicadas alrededor y por debajo de las células ciliadas y de soporte (Figura 16), incluso colocalizando algunas veces con estas últimas (ver más adelante en Figura 24). La distribución en este tipo celular se puede apreciar en el esquema de un neuromasto elaborado especialmente para describir los tipos celulares encontrados y caracterizados en esta tesis (Figura 17).



**Figura 16. Expresión de Sox2 en primordio y neuromastos de la LLP en larvas de pez cebra.** A) Inmunofluorescencia de Sox2 en una larva silvestre de 30 hpf, donde se aprecia la expresión de esta proteína en el núcleo de células en el primordio migratorio. B) Vista apical de una inmunofluorescencia que muestra la distribución nuclear de Sox2 en un neuromasto de una larva transgénica *cldnb:mGFP* de 3 dpf. B) expresión del canal verde (GFP en B) en las membranas de las células del neuromasto. B'') expresión de Sox2 (canal rojo en B) en los núcleos de células del neuromasto. C) vista de un corte basal en un neuromasto de la LLP, que muestra una inmunofluorescencia contra Sox2 en una larva de 4 dpf. Barra = 10  $\mu$ m.

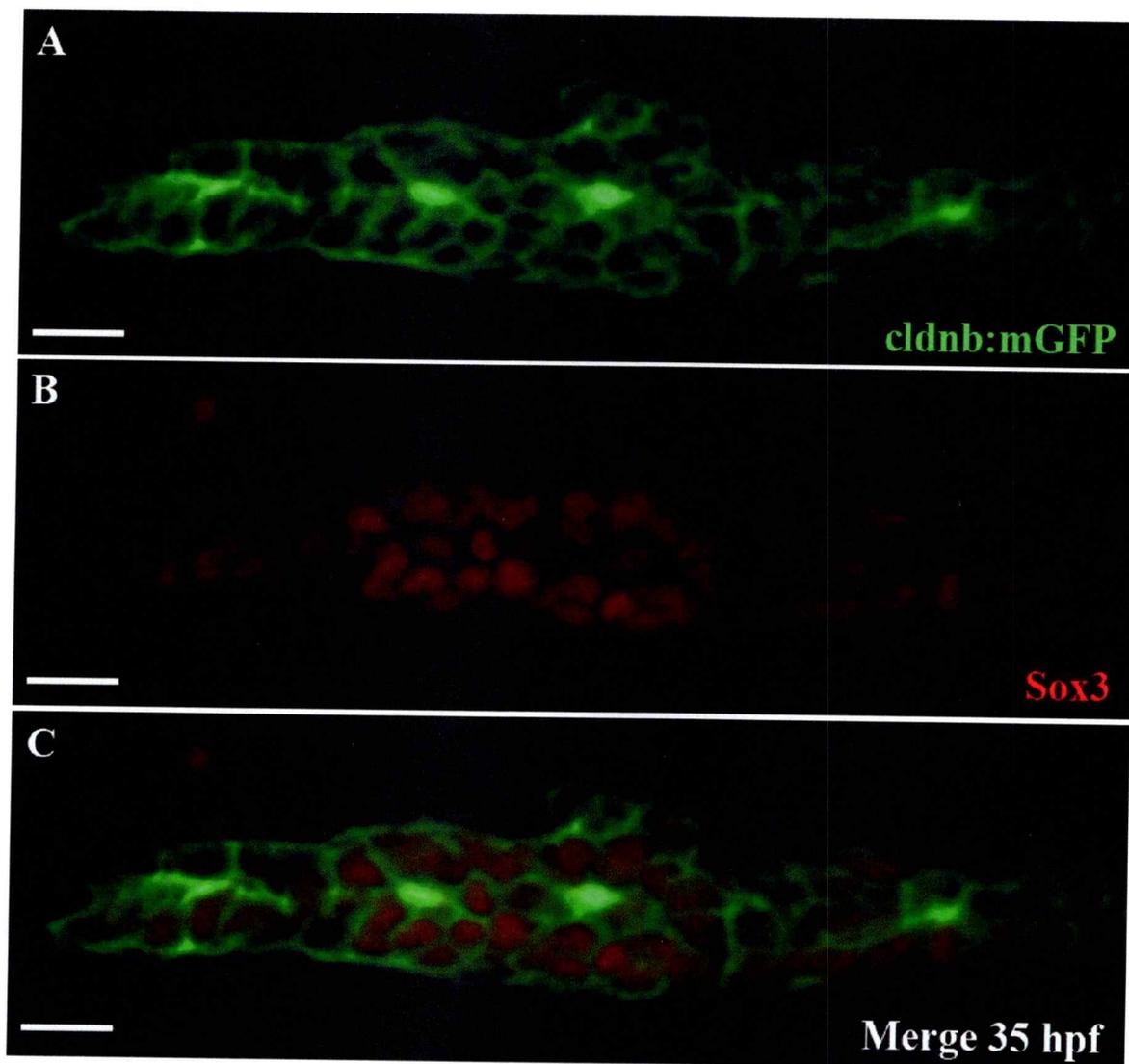


**Figura 17. Células Sox2 en un neuromasto de la LLP.** Esquema que muestra la ubicación de las células que expresan la proteína Sox2 en un neuromasto maduro de la LLP de una larva de pez cebra. Se puede apreciar que algunas células de soporte son Sox2(+).

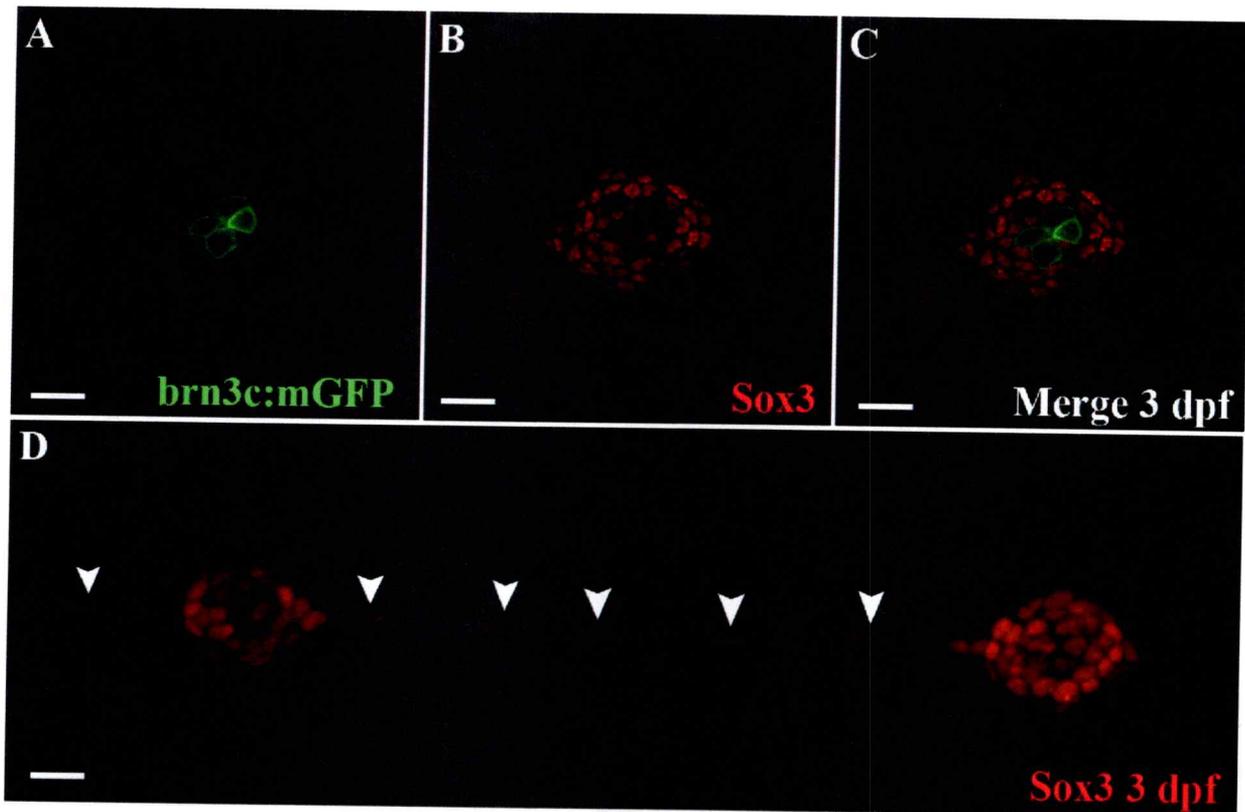
### 5.1.3 Expresión de Sox-3 en la línea lateral del pez cebra

Para detectar la expresión de este gen en la línea lateral posterior del pez cebra, se utilizaron dos métodos: (a) inmunohistoquímicas contra Sox3 utilizando un anticuerpo obtenido en el laboratorio del Dr. Mike Klymkowsky (University of Colorado), y (b) análisis del transgénico *sox3h7:GFP* (Navratilova y cols., 2009) el cual contiene un *enhancer* del gen *sox3* humano dirigiendo la expresión de GFP, y que muestra una robusta expresión en la línea lateral del pez cebra.

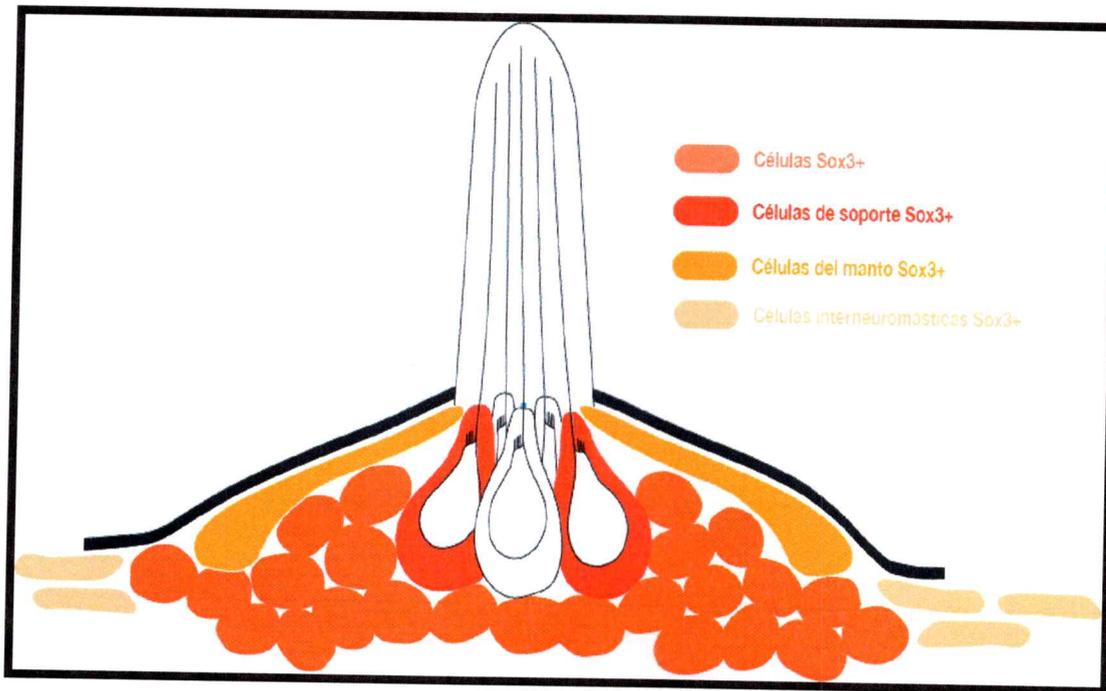
En estadíos tempranos del desarrollo, la inmunofluorescencia contra Sox3 indica que esta proteína se expresa en casi todas las células que forman el primordio migratorio en niveles similares (Figura 18). Al observar neuromastos maduros de la LLP en larvas sobre 3 dpf, observamos que la expresión de Sox3 es similar a la de Sox2, expresándose también en células que están por debajo y alrededor de las células ciliadas (Figura 19A). También se encontró coexpresión con algunas células de soporte (ver Figura 24). Al hacer el análisis a lo largo de la línea lateral posterior, se encontró que también hay expresión de este gen en las células interneuromásticas presentes en el desarrollo de este sistema (Figura 19D).



**Figura 18. Expresión de Sox3 en el primordio de la LLP (35 hpf).** A) larva transgénica *cldnb:mGFP* donde se ve la expresión de GFP en la membrana de las células del primordio. B) Canal rojo donde se ve la expresión de Sox3 en los núcleos de las células del primordio. C) Inmunofluorescencia de Sox3 en larvas transgénicas *cldnb:mGFP*, donde se aprecia la expresión de este gen en los núcleos de todas las células del primordio migratorio. Barra = 10  $\mu$ m.



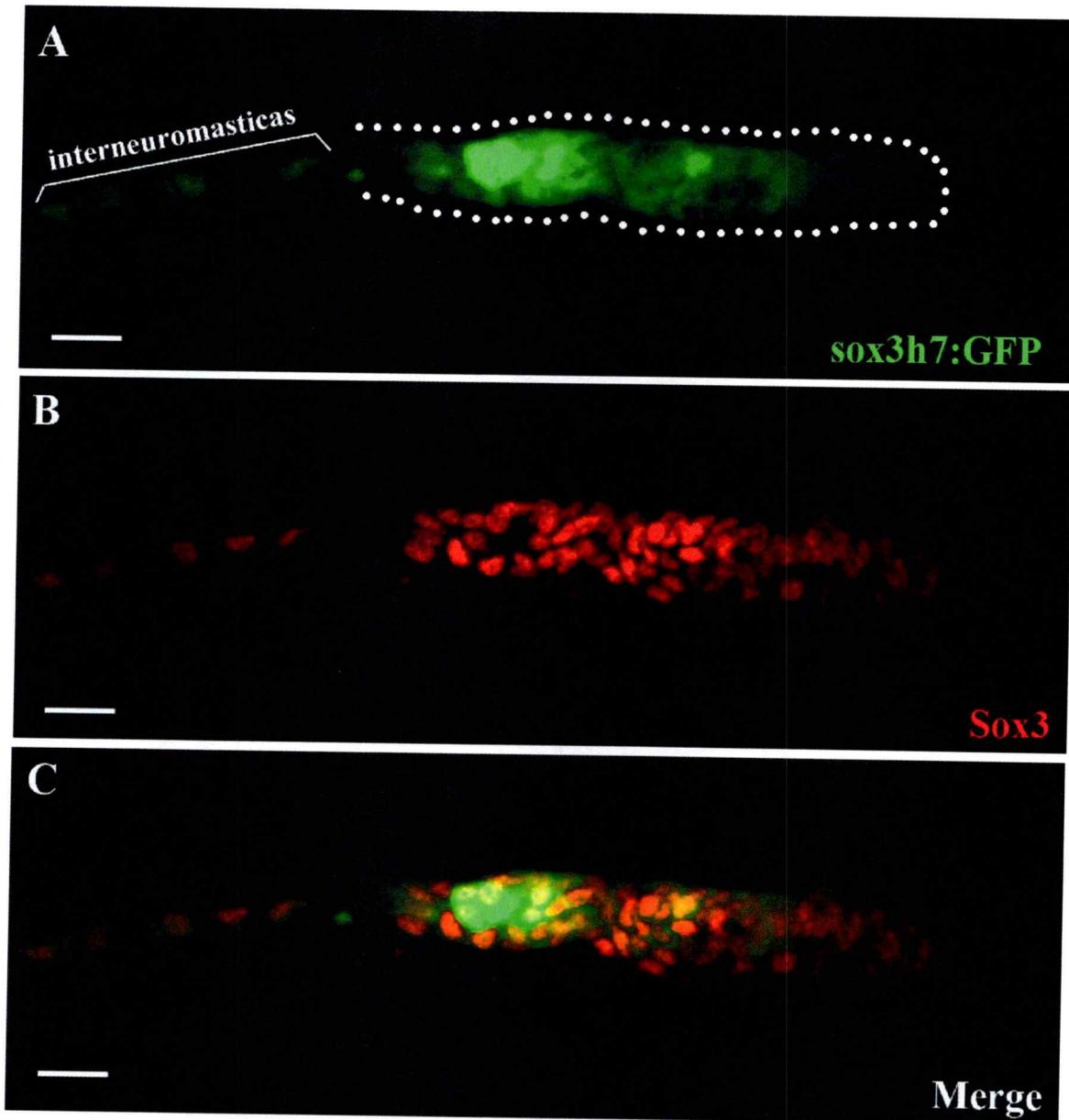
**Figura 19. Inmunofluorescencia de Sox3 en larvas Transgénicas *brn3c:mGFP* de 3 dpf.** A) Canal verde del transgénico *brn3c:mGFP* que marca con GFP la membranas de las células ciliadas maduras. B) Canal rojo de la inmunofluorescencia contra Sox3 en el mismo neuromasto. C) Vista apical de un neuromasto donde no se aprecian células ciliadas que coexpresen Sox3. D) Vista lateral de 2 neuromastos de la línea lateral posterior donde se observa la expresión de Sox3 en núcleos de células de dos neuromastos contiguos y en las células interneurómicas (puntas de flechas). Barra = 10  $\mu$ m.



**Figura 20. Células Sox3 en neuromasto de la LLP.** Diagrama que muestra la ubicación de las células Sox3(+) y su expresión en los diversos tipos celulares de un neuromasto.

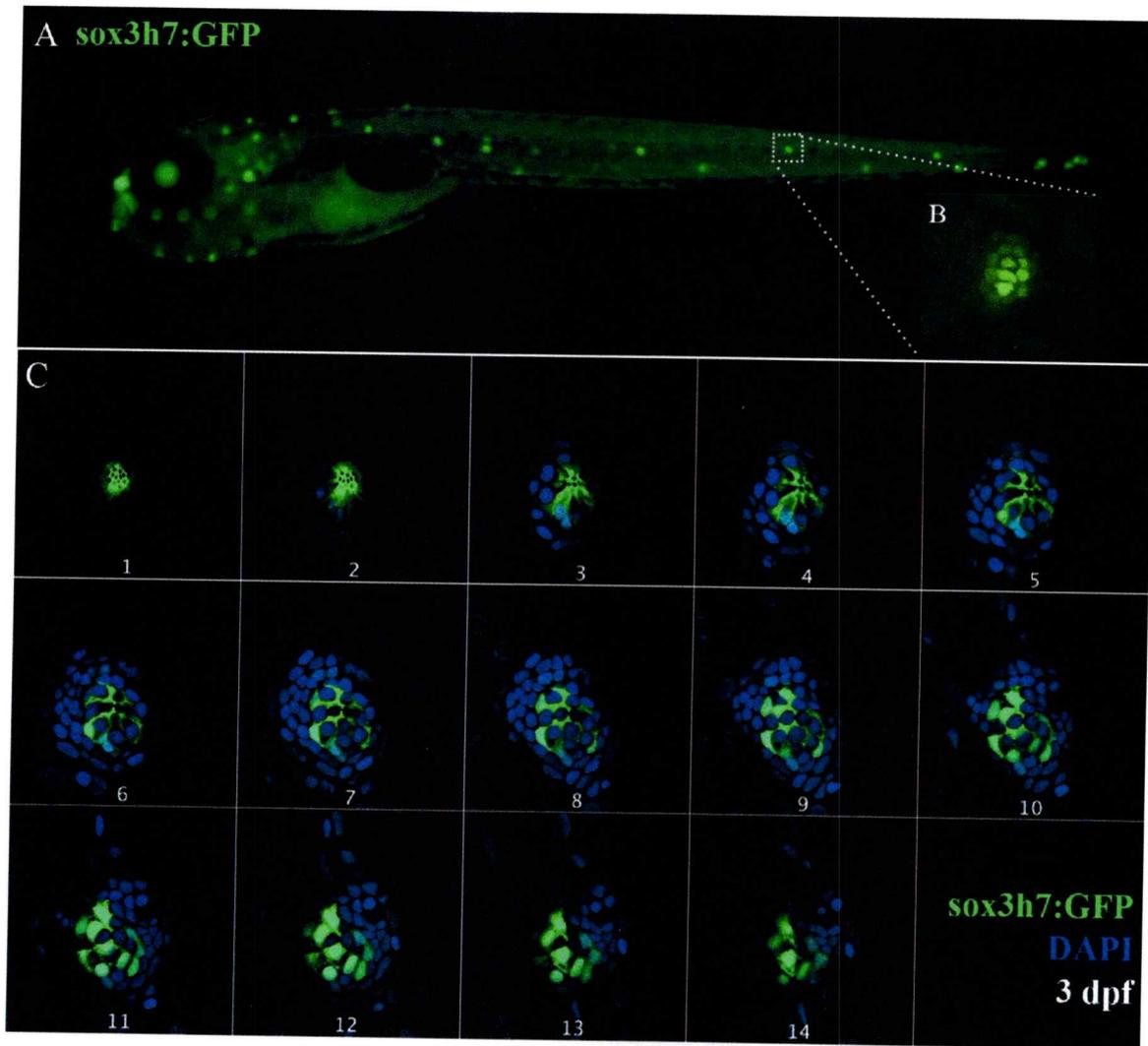
#### 5.1.4 Análisis del transgénico *sox3h7:GFP*

El pez transgénico *sox3h7:GFP* expresa GFP en algunas células del primordio migratorio de la larva (Figura 21). Estas células están ubicadas en la parte posterior del primordio, en la zona donde se forman las rosetas, desde las cuales se originan los proneuromastos que se depositan posteriormente. También hay expresión de GFP, más débil que la observada en el primordio, en las células interneuromásticas, coincidiendo también con las que expresan la proteína Sox3 (Figura 21).

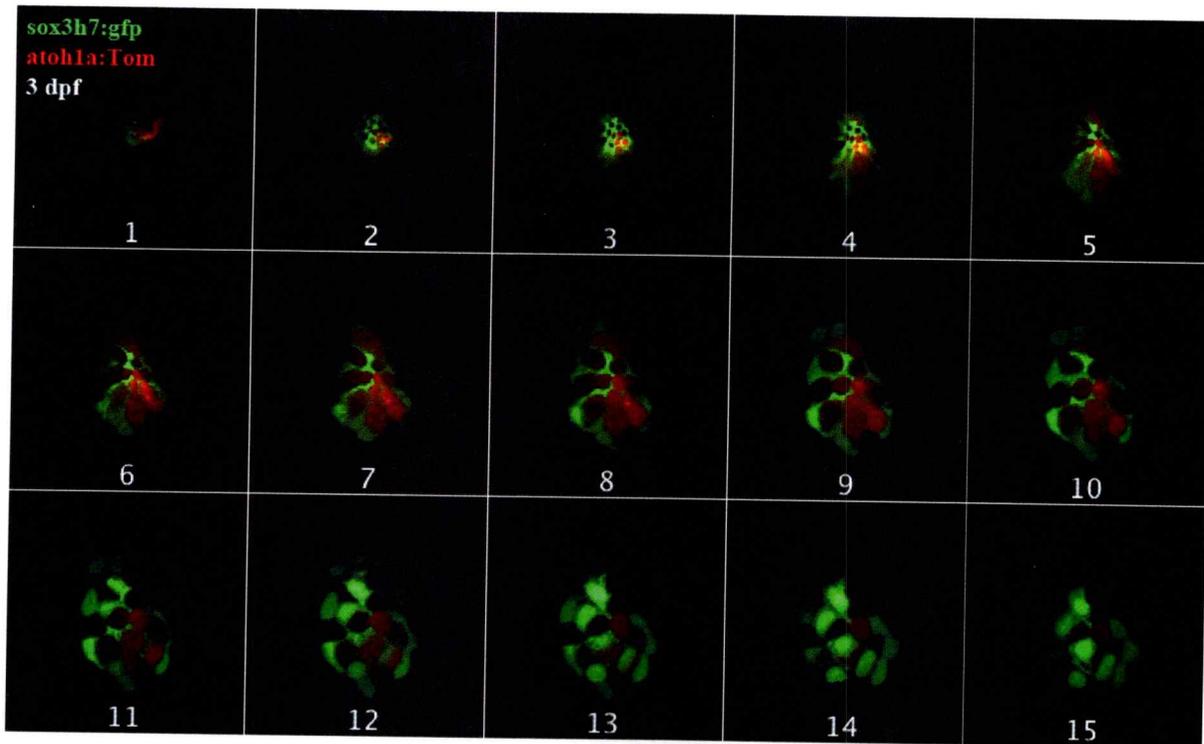


**Figura 21. Colocalización de la proteína Sox3 en el transgénico *sox3h7:GFP*.** A) Canal verde indicando la expresión de GFP en el transgénico *sox3h7:GFP*. B) Canal rojo de la inmunohistoquímica para Sox3. C) Inmunofluorescencia de Sox3 en embriones transgénicos de 32 hpf, donde se observa la colocalización de GFP y de Sox3 en algunas células posteriores del primordio. Además, se observa coexpresión de ambos marcadores en las células interneuromásticas. Barra = 10  $\mu$ m.

Posterior al análisis de la expresión de GFP en el primordio migratorio y en neuromastos depositados, examinamos la expresión de GFP en larvas transgénicas de 4 dpf, encontrando que hay una fuerte expresión en los neuromastos maduros, tanto de la línea lateral anterior como posterior (Figura 22, A). Al analizar con mas detalle los neuromastos en este estadio, se observó que la expresión de GFP se ubica en células centrales del neuromasto (Figura 22, B). Al marcar los núcleos de las células con DAPI, podemos observar claramente que las células GFP+ rodean a otras células centrales cuyos núcleos se marcan con DAPI, posiblemente correspondiendo a células ciliadas (Figura 22, C). Para confirmar esta suposición, se realizó el cruce de dos transgénicos: *sox3h7:GFP* con *atoh1a:Tom*. Este último marca células ciliadas y sus precursores. Al analizar el doble transgénico, se confirmó que las células GFP(+) centrales rodean a las células ciliadas de los neuromastos de la línea lateral (Figura 23).

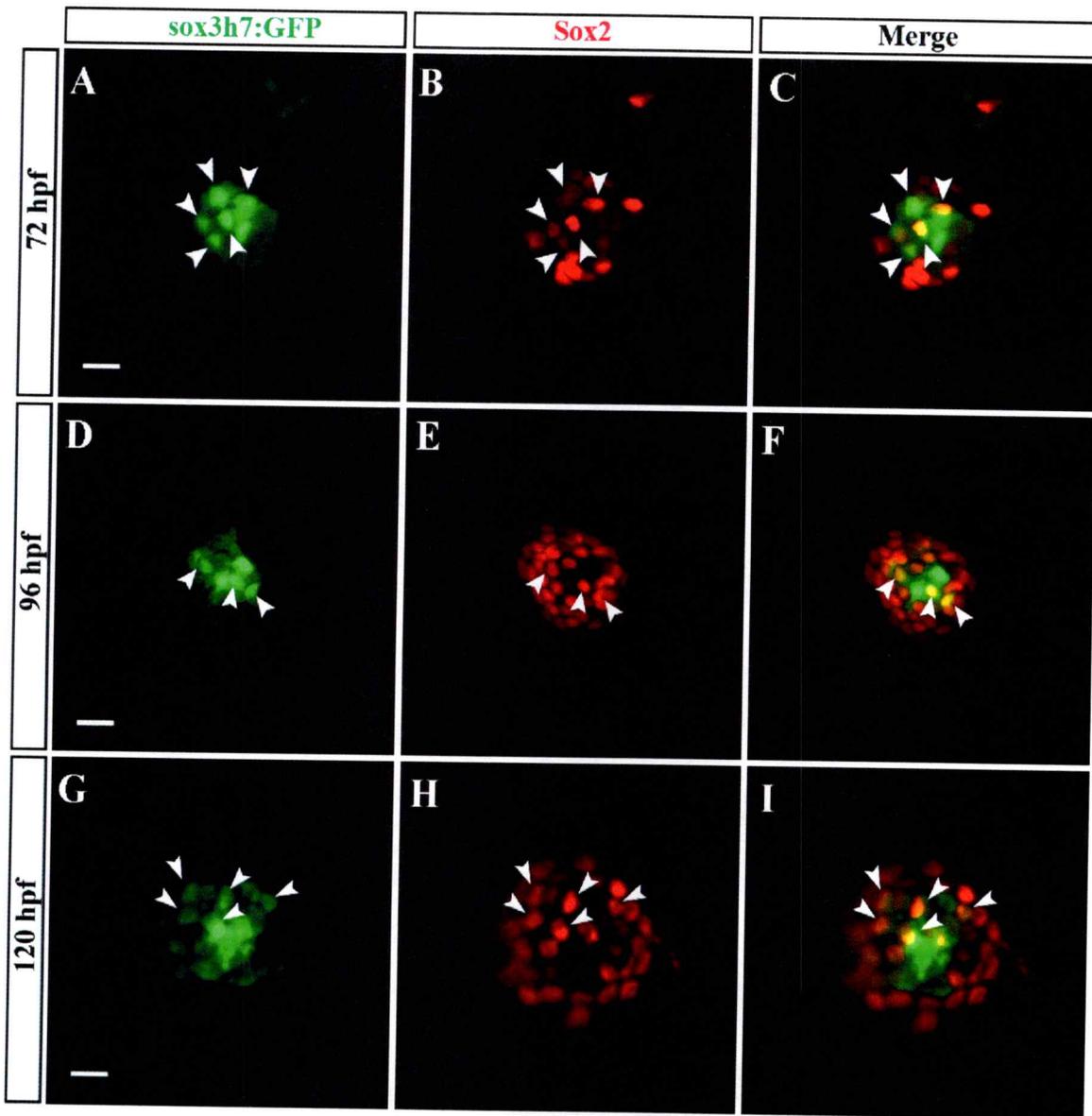


**Figura 22. Expresión de GFP en el transgénico *sox3h7:GFP*.** A) Larva transgénica de 3 dpf donde se aprecia la marca de GFP en los neuromastos de la línea lateral anterior y posterior. B) detalle de un neuromasto de la LLP que muestra la localización central de la marca de GFP. C) Secuencia de cortes ópticos de microscopía confocal, desde un nivel apical (foto1) a uno basal (foto 14). Se muestra un neuromasto de la larva transgénica *sox3h7:GFP* de 3dpf con sus núcleos marcados con DAPI, donde se observa que las células fluorescentes, GFP(+), rodean a otras células centrales, posiblemente ciliadas.



**Figura 23. Doble Transgénico *atoh1a:Tom/sox3h7:GFP*.** A) Cortes ópticos de microscopía confocal de un neuromasto desde apical (foto 1) a basal (foto 15). Se muestra como las células GFP(+) del transgénico *sox3h7:GFP*, rodean claramente a las células ciliadas y sus precursores Tom(+) del transgénico *atoh1a:Tom* en los neuromastos.

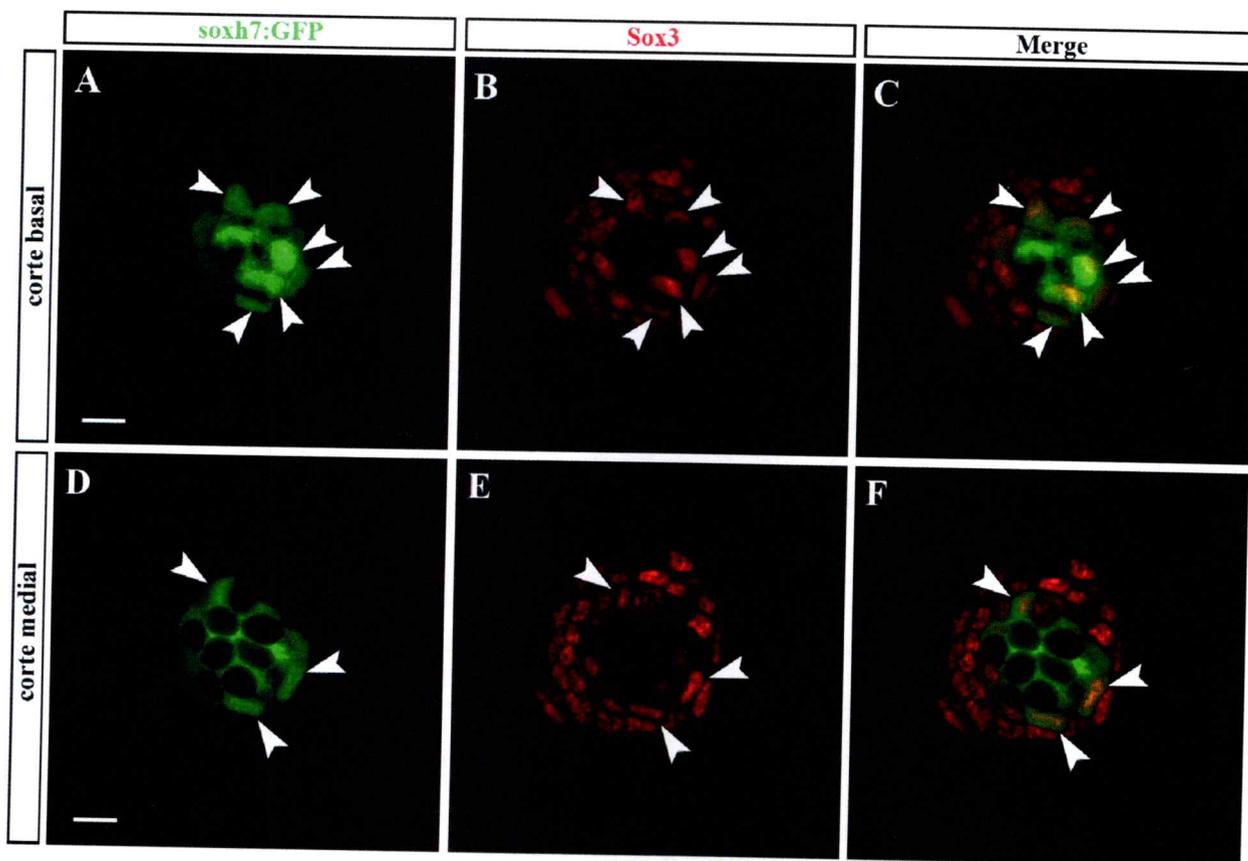
Nos interesó determinar si existe colocalización del marcador GFP del transgénico *sox3h7:GFP* con la proteína Sox2, previamente detectadas por separado. Se encontró colocalizaciones de GFP en algunas células centrales con la marca de Sox2 en varios estadios analizados (Figura 24).



**Figura 24. Expresión de Sox2 en larvas transgénicas *sox3h7:GFP* en distintos estadios.** A), D) y G) expresión de GFP en el transgénico *sox3h7:GFP* en distintos estadios. B), E) y H) inmunofluorescencias de Sox2 en distintos estadios. C), F) e I) Inmunohistoquímica de Sox2 (rojo) en larva *sox3h7:GFP* (verde) de 72 hpf donde se aprecia la colocalización de ambas marcas (puntas de flecha) en algunas células centrales del neuromasto a distintos estadios post fecundación. Barra = 10  $\mu$ m.

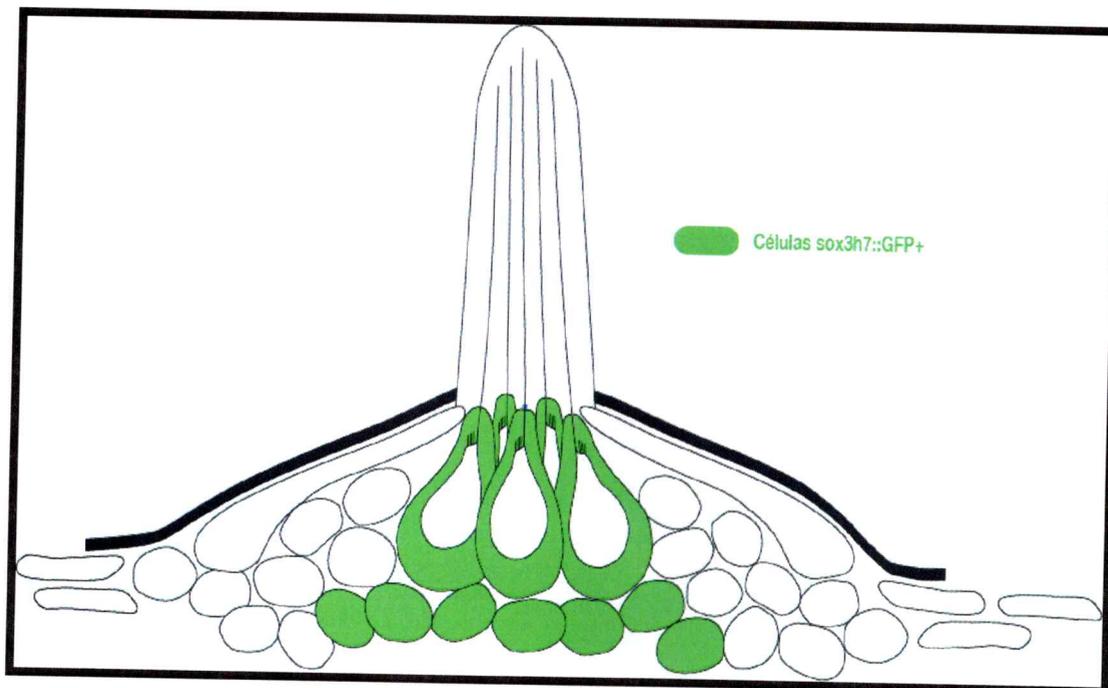
Un patrón similar de colocalización de la marca GFP(+) del transgénico *sox3h7:GFP* con la marca Sox2(+), se observó al hacer la

immunohistoquímica de Sox3 en este mismo transgénico. En este experimento, se ve claramente en cortes tanto por la región central como basal del neuromasto, que en algunas células hay colocación de la marca de Sox3 con la señal de GFP del transgénico (Figura 25). Sin embargo, mientras la mayor parte de las células marcadas con GFP son centrales, las células que expresan Sox3 son periféricas.



**Figura 25. Expresión de Sox3 en larvas transgénicas *sox3h7:GFP* de 3 dpf.** A-C) Corte por la región basal de un neuromasto, que muestra la distribución nuclear de Sox3 (inmunofluorescencia roja, B) y de GFP (verde, A), donde se observa la colocación de ambos marcadores (puntas de flechas, C). D-F) Corte por la región central del mismo neuromasto, donde se observan células que presentan colocación de ambos marcadores (puntas de flechas) y los espacios en el centro del neuromasto dejados por las células GFP(+) donde se encuentran las células ciliadas. Barra = 10  $\mu$ m.

Este análisis permitió determinar que la expresión de GFP en el transgénico *sox3h7::GFP* está acotada principal, pero no exclusivamente, a las células de soporte que rodean a las células ciliadas de la línea lateral, lo que se puede apreciar mejor en el esquema de la figura 26.

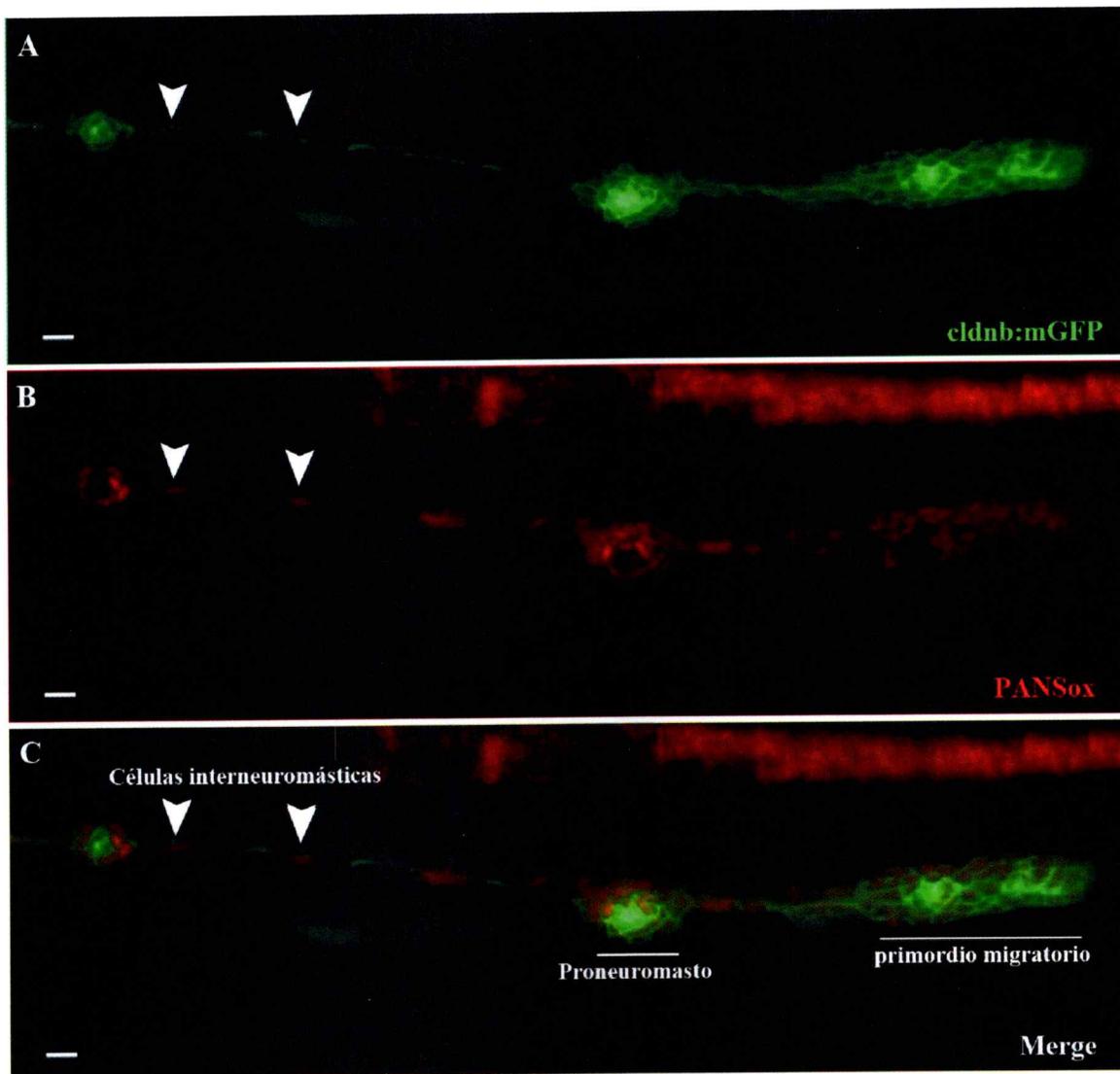


**Figura 26. Células *sox3h7::GFP* en un neuromasto de la LLP.** Diagrama que muestra la ubicación de células que expresan GFP en la línea transgénica *sox3h7::GFP*, en el cual se aprecia que estas células rodean completamente a las células ciliadas y que podrían ser descritas como las auténticas células de soporte de los neuromastos.

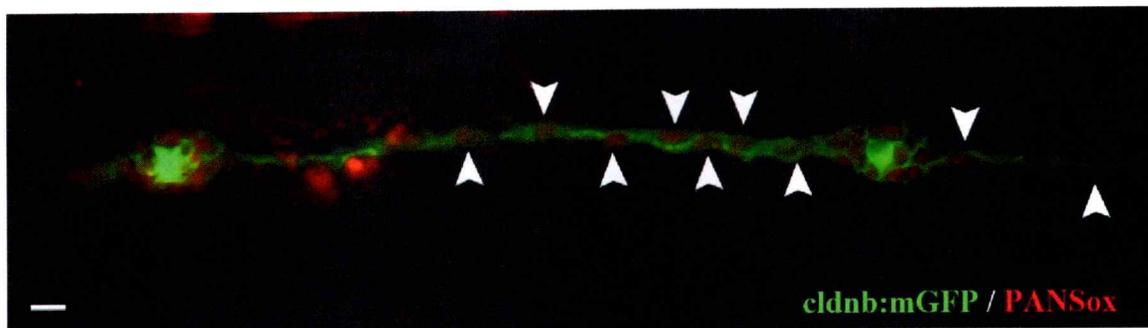
#### 5.1.5 Marca del anticuerpo PAN-Sox en la línea lateral del pez cebra

En el transcurso de esta tesis tuvimos acceso a un anticuerpo desarrollado en el laboratorio del Dr. Hisato Kondoh (Universidad de Osaka, Japon), y facilitado por la Dra. V. Palma, el cual reconoce un epítipo presente en

los 3 integrantes de la familia Soxb1, es decir, permite reconocer las proteínas Sox1, Sox2 y Sox3, y que fue nombrado como anti-PAN-Sox. Al analizar la inmunodetección generada con este anticuerpo en estadíos tempranos, podemos ver claramente que la marca se detecta en el primordio migratorio, en los neuromastos recién depositados (proneuromastos) y en las células interneuromásticas, también recién depositadas (Figura 27). Esta expresión se mantiene tanto en los neuromastos maduros como en células interneuromásticas de larvas de estadíos más avanzados (Figura 28).

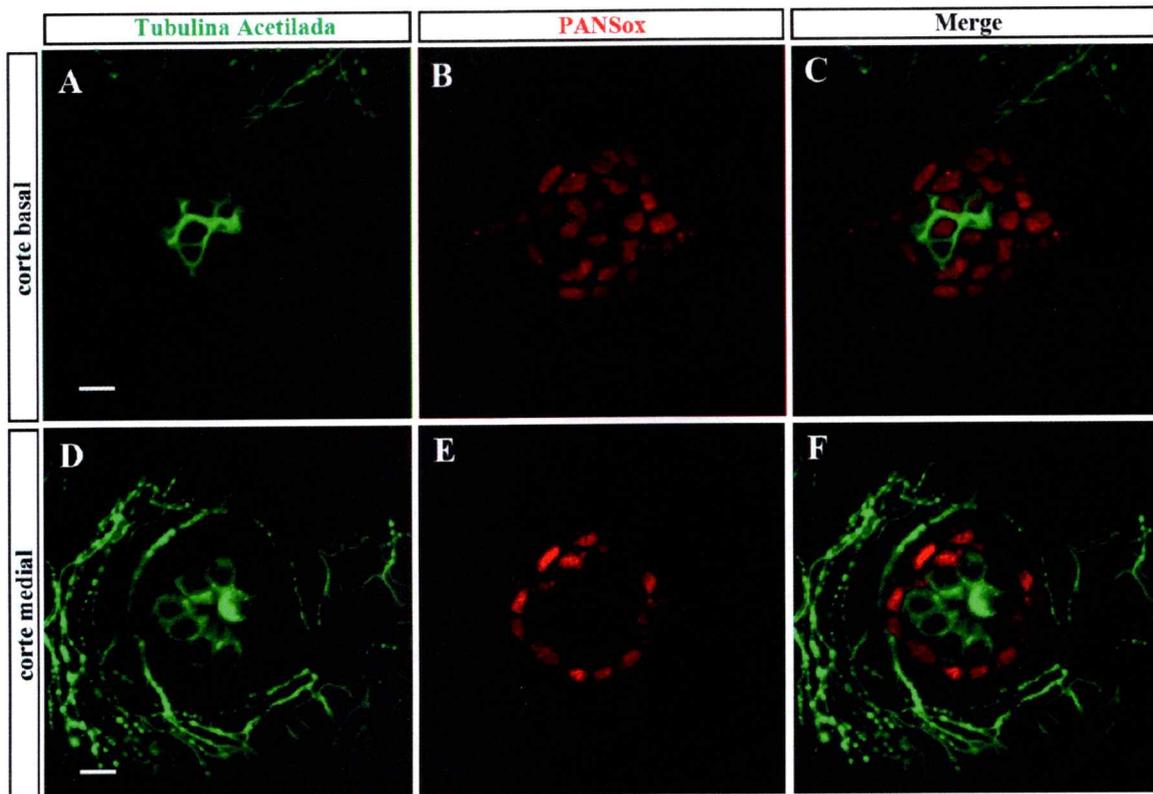


**Figura 27. Detección de la marca de PANSox en larvas de 34 hpf.** Immunohistoquímica de PANSox (rojo, B) en peces transgénicos *cldnb:mGFP* (verde, A), donde se aprecia la inmunodetección de este marcador tanto en el primordio migratorio como en los proneuromastos y células interneuromásticas recién depositados (puntas de flechas, C). Barra = 10  $\mu$ m.



**Figura 28. Expresión de proteínas SoxB1 en larvas transgénicas de 48 hpf.** La expresión del marcador PAN-Sox (rojo) se mantiene en los núcleos de células de neuromastos maduros y en los núcleos de células interneuromásticas (puntas de flechas). El transgénico *cldnb:GFP* expresa GFP en las membranas, tanto de las células en los neuromastos, como en las células interneuromásticas. Barra = 10  $\mu$ m.

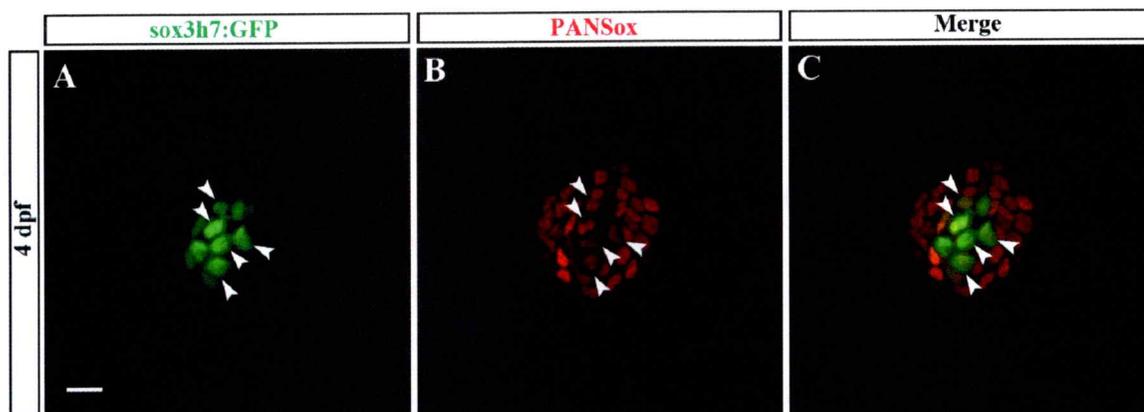
El análisis de la tinción generada por el anticuerpo PANSox con un segundo anticuerpo contra Tubulina Acetilada nos permitió observar que ninguna de las proteínas de la familia SoxB1 se expresan en las células ciliadas (Figura 29). Aunque no se encontraron células donde colocalicen ambas marcas, se observó que los nervios basales que inervan a las células ciliadas, siguen una ruta que las lleva alrededor de las células basales marcadas con el anticuerpo PANSox (Figura 29, C).



**Figura 29. Doble inmunohistoquímicas para PANSox y Tubulina Acetilada en larvas de 4 dpf.** A-C) Corte óptico de microscopía confocal de la región basal de un neuromasto donde se observa la marca nuclear de PANSox (inmunotinción en rojo, B) en casi la totalidad de las células del neuromasto en esta región, y el nervio de la LLP por entre estas células basales (inmunotinción en verde, A). D-F) Corte óptico de la región medial del mismo neuromasto, donde se aprecian las células ciliadas centrales y la red de nervios alrededor del neuromasto (marcadas con Tubulina Acetilada en verde, D), y los núcleos de células marcadas con la inmunotinción de PANSox (en rojo, E). No se observa la colocalización de ambas señales en ninguna célula. Barra = 10  $\mu$ m.

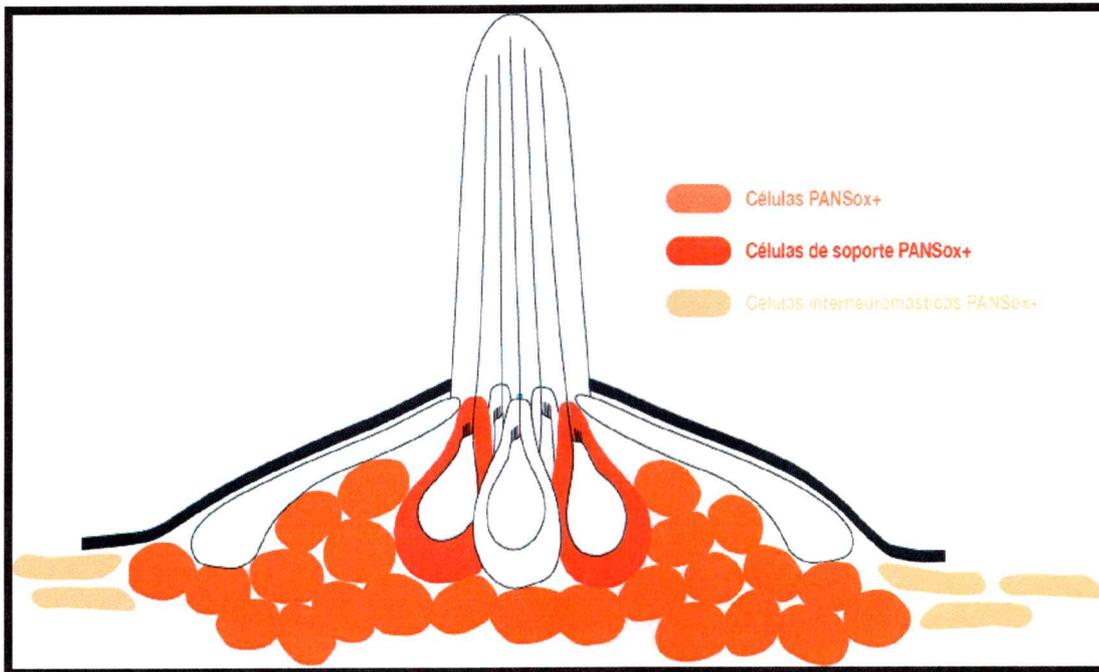
Se estudió la tinción obtenida con el anticuerpo PANSox en larvas transgénicas *sox3h7:GFP* de 4 dpf, donde nuevamente se confirmó lo observado con los anticuerpos para Sox2 y Sox3, anteriormente utilizados. La coexpresión de ambos marcadores se detecta en un grupo de células centrales, además se

observan células periféricas marcadas sólo con el anticuerpo anti-PANSox (Figura 30).



**Figura 30. Expresión de PANSox en una larva transgénica *sox3h7:GFP* de 4dpf.** Corte óptico por la región basal de un neuromasto que muestra la distribución nuclear de PANSox (inmunotinción en rojo, B) en una larva *sox3h7:GFP* (verde, A). En algunas células del neuromasto se vé la codistribución de ambas marcas (puntas de flechas, C). Barra = 10  $\mu$ m.

Lamentablemente no se pudieron hacer experimentos de colocalización entre los tres anticuerpos que detectan las proteínas de la familia SoxB1, ya que los tres fueron producidos en el mismo hospedero. Sin embargo es posible generar un esquema de distribución de la marca detectada con el anticuerpo PANSox respecto a los tipos celulares encontrados en el neuromasto (Figura 31).



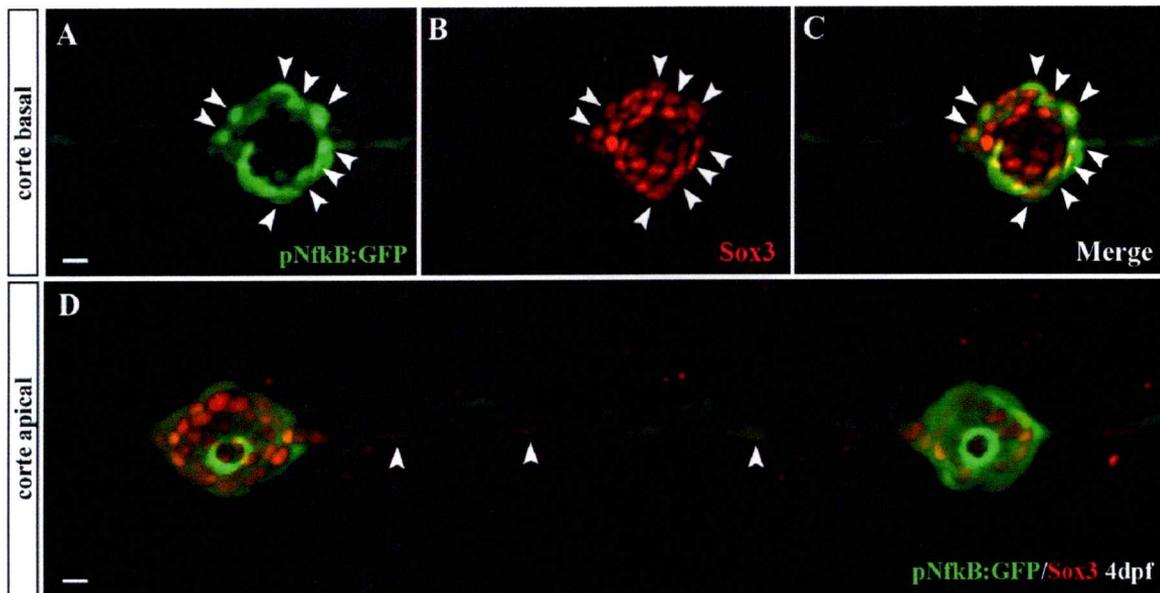
**Figura 31. Células marcadas con el anticuerpo PANSox en el neuromasto.** Diagrama que muestra la localización de las células marcadas con el anticuerpo PANSox, donde se aprecia su distribución en células basales y laterales del neuromasto y su presencia en algunas células de soporte.

### 5.1.6 Análisis de otros marcadores

Nos interesó conocer si las proteínas de la familia SoxB1 se expresan en las células del manto del neuromasto, células accesorias que se ubican en la región más periférica y superficial del órgano. Para ello, efectuamos inmunotinciones con el anticuerpo anti-Sox3 en larvas transgénicas *pnfkb:GFP* (Kanter y cols., 2011), la cual expresa GFP en las células del manto de los neuromatos maduros, y en células interneuromásticas.

Se observó presencia de la marca nuclear del anticuerpo anti-Sox2 en un subconjunto de las células marcadas con GFP (Figura 32 C, puntas de

flechas). También se observó la colocalización de ambas marcas en las células interneuromásticas (Figura 32 D, puntas de flechas).



**Figura 32. Análisis del transgénico *pNfkb:GFP*.** A) Inmunofluorescencia de *Sox3* sobre transgénico *pNfkb:GFP* de 4dpf, donde se aprecia la colocalización de la totalidad de las células GFP(+) con el marcador *Sox3*, tanto en el neuromasto (donde el transgénico marca claramente las células del manto), como en las células interneuromásticas (puntas de flecha en D). Barra = 10  $\mu$ m.

La búsqueda de otros marcadores que revelaran la presencia de tipos celulares adicionales en los neuromastos (como células gliales) no dieron resultados concluyentes (datos no mostrados). Sin embargo, la evidencia presentada nos permite concluir que existe una población de células en la región basal y periférica del neuromasto de la línea lateral que expresa proteínas de la familia SoxB1 (al menos Sox2 y Sox3) y que se distinguen de un grupo de células basales centrales que serían, por su morfología, las células de soporte. Considerando el rol de las proteínas SoxB1 en la mantención de las

características de célula troncal neural en el sistema nervioso, es posible postular que existen células de estas características en el neuromasto y que serían responsables de la capacidad regenerativa de este órgano.

## **5. 2.- Comprobar la presencia de células que presenten características de progenitoras neurales en los neuromastos de la línea lateral posterior.**

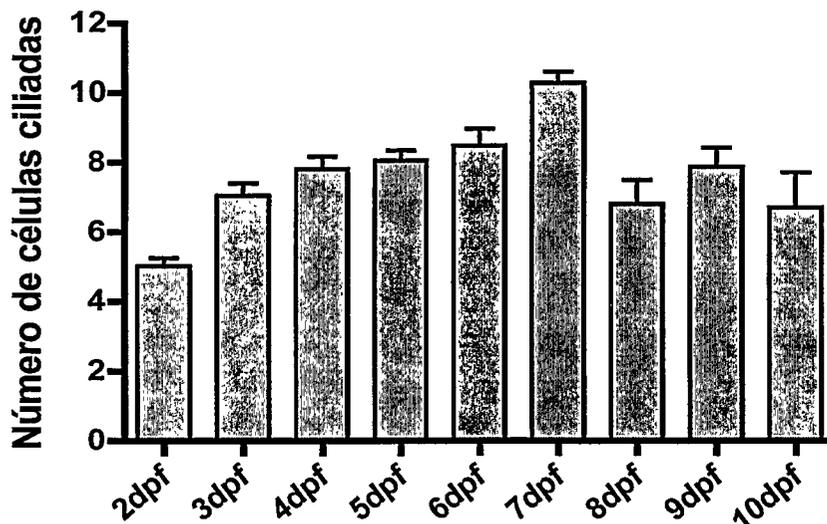
Con respecto a este objetivo, se propuso determinar la existencia de células con características que definan a las células progenitoras neurales en los neuromastos de la línea lateral del pez cebra. Estas células permitirían la regeneración de los distintos tipos celulares presentes en ese sistema sensorial. Estos progenitores deben poseer dos características básicas. La primera es tener la capacidad de auto renovarse en el tiempo vía divisiones simétricas o asimétricas, requisito necesario para mantener una población adecuada de progenitores que permitan renovaciones sucesivas y por toda la vida del animal. La segunda cualidad es la de poder regenerar los diferentes tipos celulares requeridos y reconstituir el órgano dañado, manteniendo las características estructurales y funcionales originales.

### **5.2.1. Ciclos de regeneración sucesivos en el neuromasto.**

Para determinar si la regeneración observada en la línea lateral del pez cebra es limitada en cuanto a la capacidad de generar nuevas células ciliadas, se realizaron experimentos de varios ciclos de daño y regeneración, utilizando el protocolo de exposición breve a  $\text{CuSO}_4$  previamente estandarizado en nuestro laboratorio (Hernández y cols., 2006).

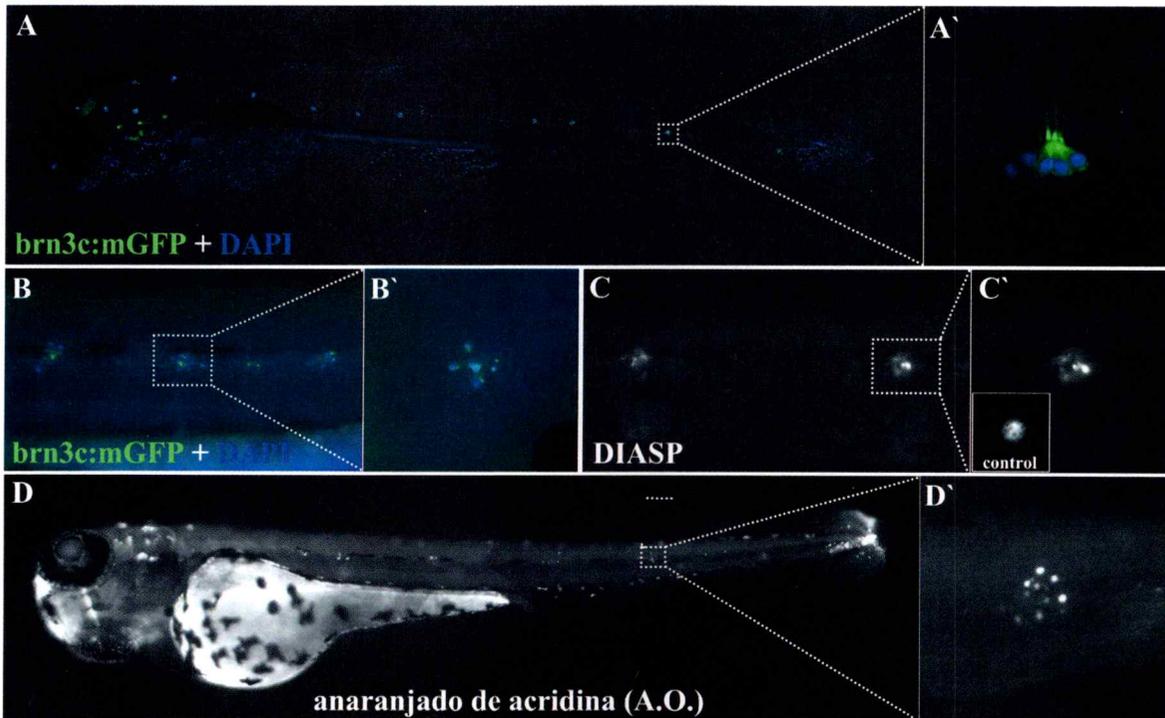
Primero se determinó el número de células ciliadas en uno de los neuromastos de la LLP de peces del tipo silvestre (el neuromasto L1) en distintos

estadios del desarrollo y sin ningún tratamiento (Figura 33), para poder comparar estos datos con los obtenidos posteriormente en los ciclos de regeneración.



**Figura 33. Número de células ciliadas en el neuromastos L1 de larvas controles.** Utilizando peces transgénicos *brn3c:mGFP* se contaron las células ciliadas presentes en el neuromasto L1 en distintos estadios del desarrollo. El número aumenta progresivamente hasta el día 7, momento en el cuál las larvas se trasladan a contenedores (maternidades) donde comienzan a alimentarse, lo que genera cierto daño en las células ciliadas de la línea lateral.

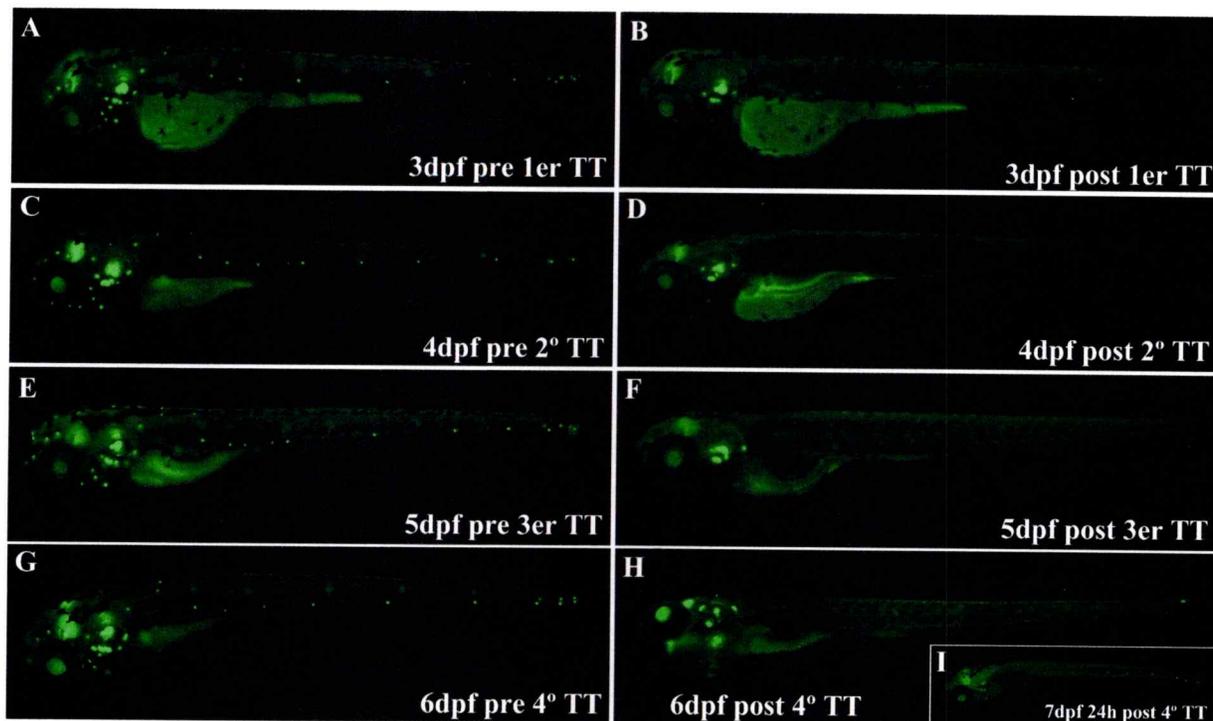
Para los experimentos de ciclos de regeneración incubamos larvas de 3 dpf en 10  $\mu$ M de  $\text{CuSO}_4$  por 1 h, y confirmamos, con diversos métodos, el daño específico en las células ciliadas de los neuromastos, como se muestra en la Figura 34.



**Figura 34. Daño a las células ciliadas de los neuromastos de la línea lateral mediante tratamientos con  $\text{CuSO}_4$ .** A) Larva transgénica *brn3c:mGFP* de 3 dpf, donde se observan los núcleos de las células ciliadas teñidos *in vivo* con DAPI, se observa en A' un detalle de las células ciliadas marcadas con GFP y la marca de sus núcleos por el DAPI. B) detalle de la misma larva post daño con  $\text{CuSO}_4$ , mayor aumento en B'. C) El daño inducido por el cobre en las células ciliadas se puede apreciar también al marcarlas con la tinción vital DIASP. Comparar un neuromasto tratado en C' con un neuromasto control en el recuadro. D) Larvas posterior al daño con cobre fueron incubadas en Anaranjado de Acridina (A.O.), se observa en D' la marca de A.O. en uno de los neuromastos de la línea lateral posterior lo que indica muerte celular en esa región.

Para el experimento de regeneración de células ciliadas por más de 1 ciclo, se incubaron larvas *brn3c:mGFP* de 3 dpf en  $10 \mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  por 1 hora para eliminar las células ciliadas de la LLP, se esperó hasta constatar la regeneración de las células ciliadas a las 24 horas post incubación, y se volvieron a incubar en  $10 \mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  por 1 hora para nuevamente eliminar las células ciliadas, en este

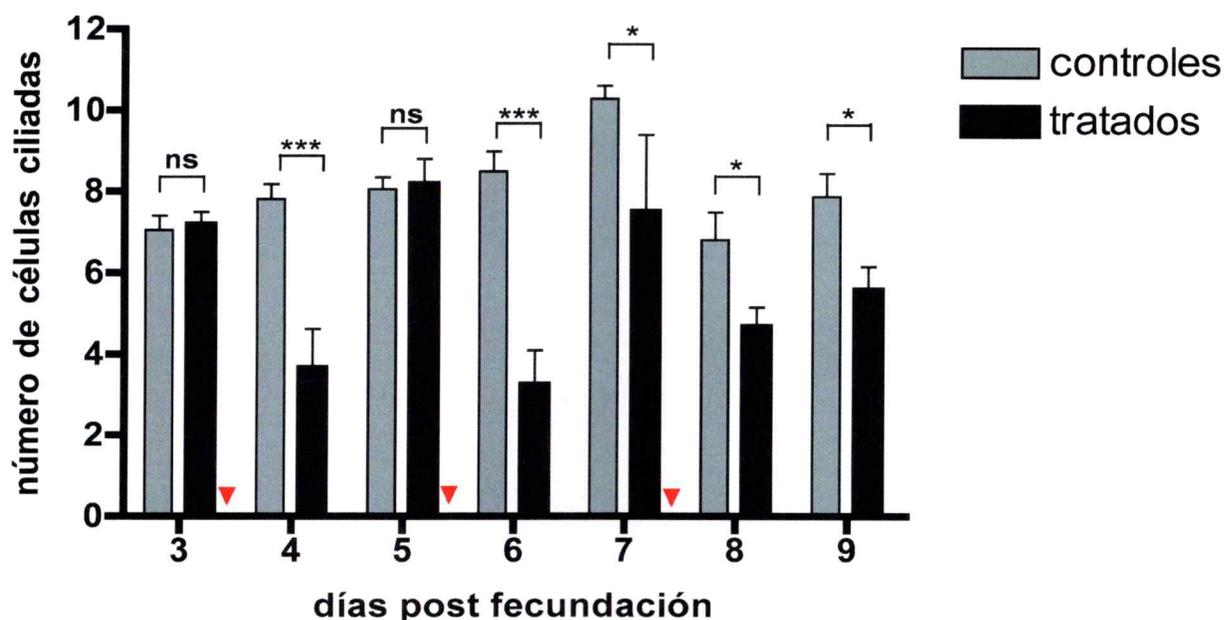
caso regeneradas. Se repitió el proceso por 4 ciclos enteros de incubación y regeneración consecutivos (Figura 35).



**Figura 35. Ciclos de regeneración en larvas transgénicas *brn3c:mGFP*.** Se observa en A una larva de 3 dpf previo al primer tratamiento. En B, D, F y H se aprecia la completa eliminación de las células ciliadas post daño luego de cada ronda de tratamiento con cobre; En C, E, G e I se observa la regeneración de nuevas células ciliadas 24 horas después de cada tratamiento. TT= Tratamiento.

Para obtener un análisis cuantitativo del proceso regenerativo tras reiterados ciclos de daño y restauración de células ciliadas, repetimos el experimento contando el número de células ciliadas que regeneran en cada ciclo. Sin embargo, para tener una regeneración mas robusta y para alcanzar un número de células ciliadas estables, se esperó por 48 horas después de cada incubación con  $\text{CuSO}_4$  para realizar su recuento (Figura 36). Se estableció que luego de la primera ronda de regeneración se alcanzó un número de células ciliadas similar a

los controles luego de 48 horas de recuperación (5 dpf), pero en las siguientes rondas de regeneración, si bien se recuperan células ciliadas, estas no alcanzan a llegar al número de células que tienen los controles en los mismos estadios.



**Figura 36. Número de células ciliadas en ciclos reiterativos de regeneración.** Experimento similar al de la Figura 35 en que se usa el transgénico *bm3c:mGFP* para contabilizar las células ciliadas diariamente efectuándose tratamientos con  $\text{CuSO}_4$  cada 48 horas los días 3, 5 y 7 post fecundación (se indican en el gráfico los tiempos de tratamientos con puntas de flecha roja). Se aprecia una recuperación parcial a las 24 horas después del primer tratamiento y una recuperación total al cabo de 48 horas (5 dpf); no ocurre así en los siguientes tratamientos donde, si bien hay una regeneración de células ciliadas, no se alcanzan valores iguales al control en el lapso de 48 horas (7 y 9 dpf).

### 5.2.2. Proliferación celular

La robusta regeneración observada en los neuromastos sugiere un proceso de diferenciación continua a partir de progenitores para la regeneración de nuevas células ciliadas. Sin embargo, es posible también que la aparición de nuevas células ciliadas luego de los tratamientos con sulfato de cobre se deban a eventos

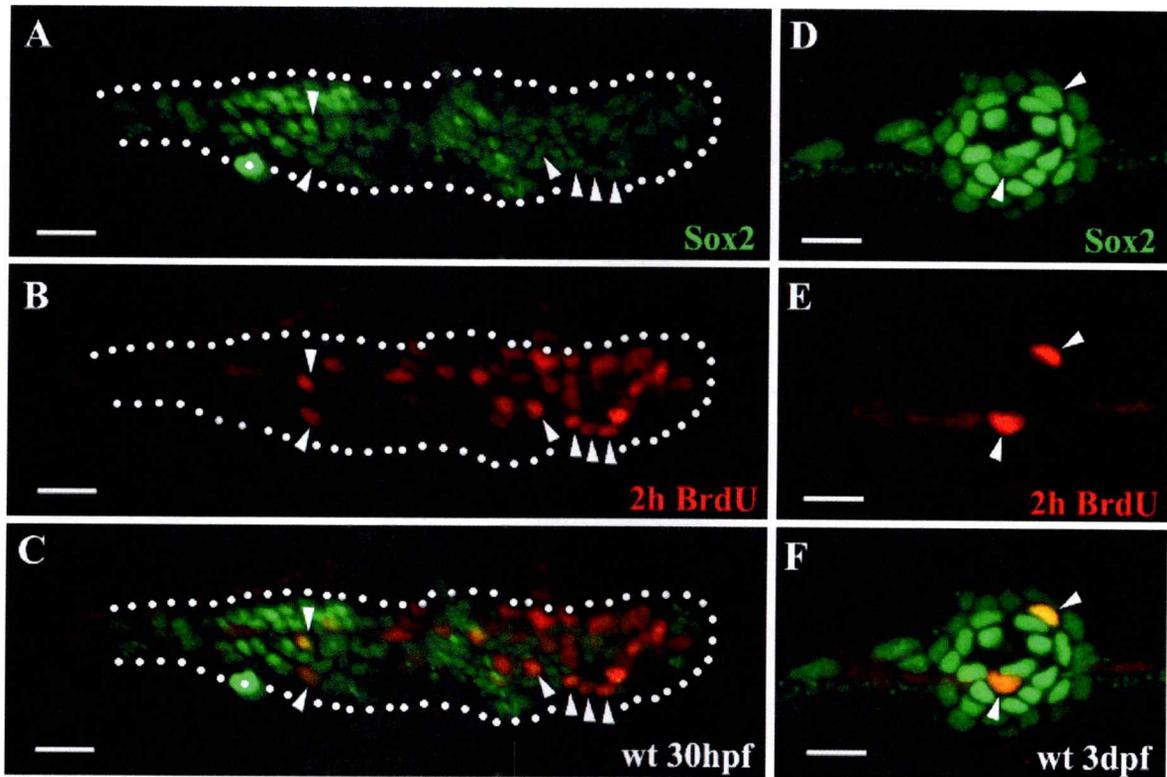
de transdiferenciación. Una de las formas de distinguir ambos procesos es establecer si existe proliferación celular en el neuromasto y además determinar que células proliferan durante los procesos regenerativos.

Para marcar las células en estado S del ciclo celular y caracterizar la proliferación celular en los neuromastos de la línea lateral del pez cebra, larvas de distintos estadios se incubaron con BrdU, aplicando pulsos y cazas de distintas extensiones, dependiendo del experimento específico. En primer término se determinó la concentración de BrdU adecuada a utilizar en los experimentos a realizar. Para esto, larvas de 3 dpf se incubaron en 1 mM, 5 mM, 10 mM y 15 mM de BrdU por 2 horas, encontrándose que la menor concentración en la cual se llega a una marca detectable con certeza, es la de 10 mM. Por lo tanto todas las incubaciones realizadas en el contexto de esta tesis son usando 10 mM de BrdU.

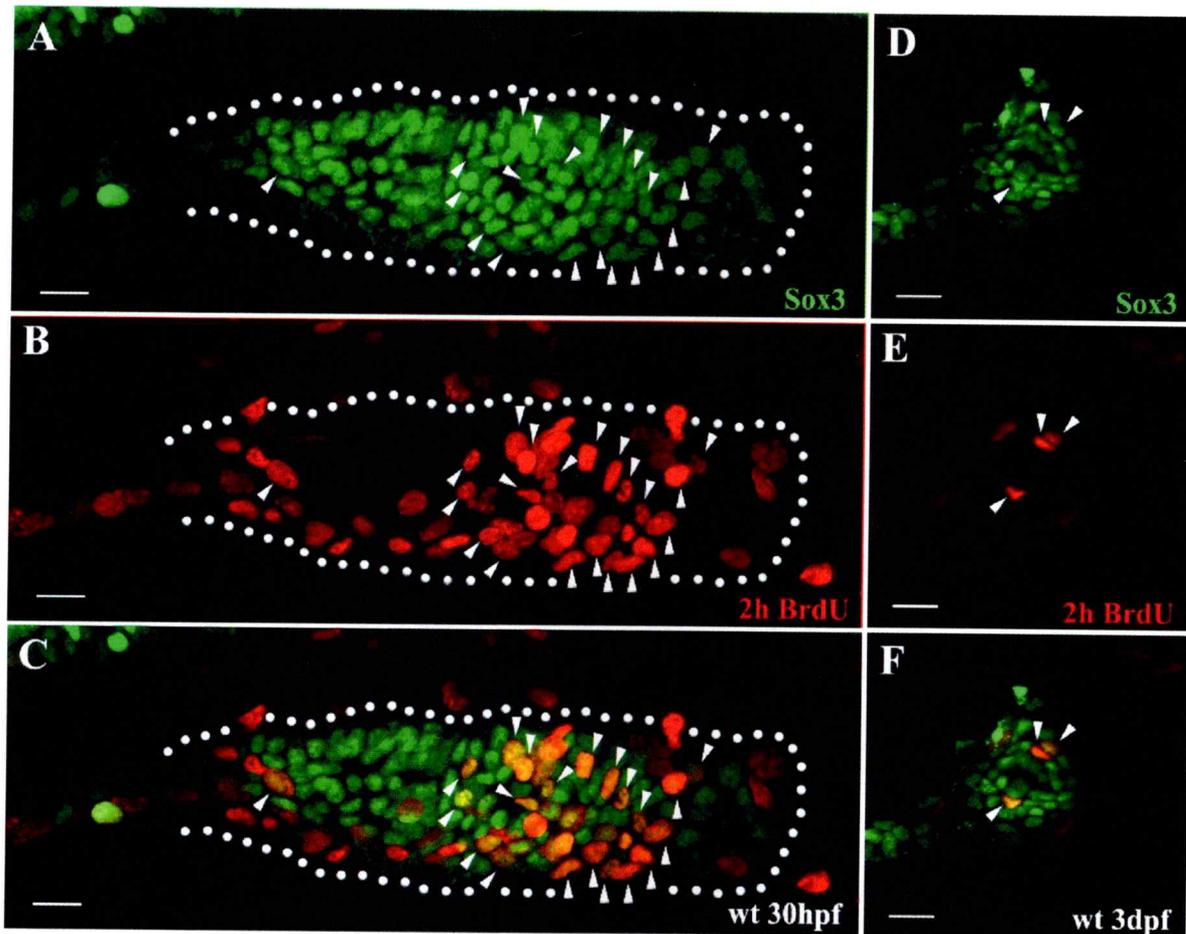
### **5.2.3. Proliferación de células positivas para marcadores de progenitores neurales**

Nos interesó determinar si las posibles células progenitoras neurales presentes en la línea lateral, que expresan proteínas de la familia SoxB1, proliferan. Se usaron larvas de 30 hpf y 3 dpf, y se les aplicaron pulsos de 2 horas de BrdU 10 mM luego de lo cual fueron fijados inmediatamente. Se observó que, las células que expresan Sox2 (Figura 37), Sox3 (Figura 38) y PANSox (Figura 39) así como aquellas que expresan GFP en el transgénico *sox3h7:GFP* (Figura 40), incorporan el análogo BrdU, tanto en el primordio migratorio de embriones de 30 hpf, así como en los neuromastos maduros de larvas de 3 dpf. Se examinó también la proliferación en neuromastos de larvas transgénicas *sox3h7:GFP*, en

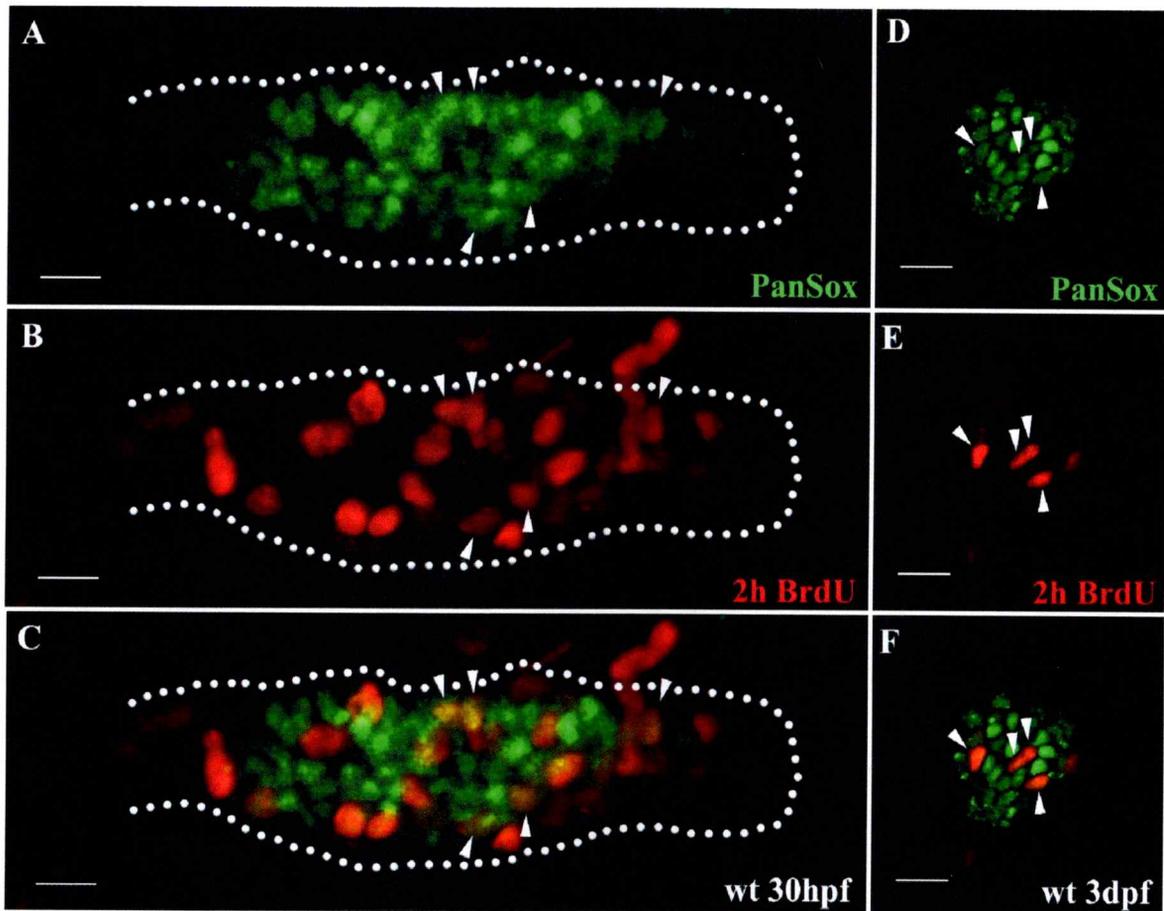
las cuales se efectuaron pulsos de 4 y 5 horas (Figura 40). Los neuromastos analizados y fotografiados fueron siempre los ubicados en la línea lateral posterior, desde detrás del oído (neuromasto n°1) hasta el nivel del ano (neuromasto n° 4-5).



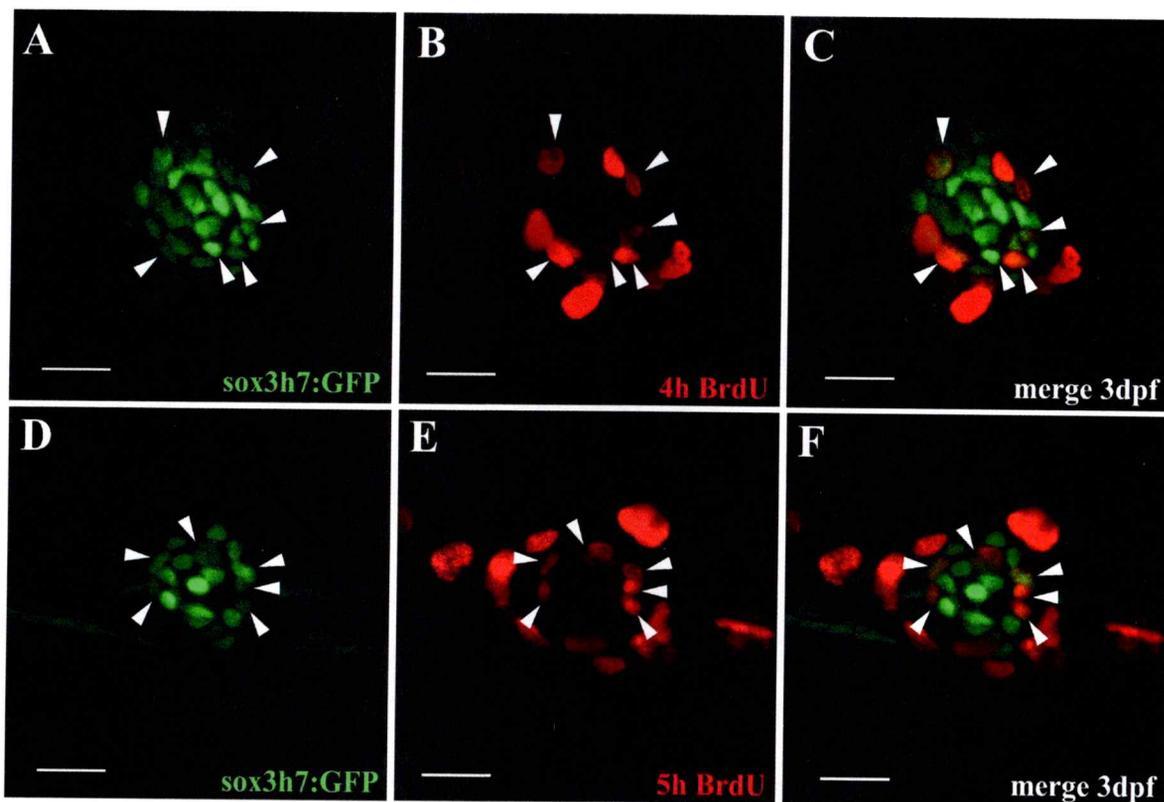
**Figura 37. Proliferación de células que expresan Sox2.** Larvas silvestres de 30 hpf y 3 dpf se incubaron 2 horas en 10 mM de BrdU y luego se realizó una inmunofluorescencia doble para detectar el BrdU (en rojo) y las células Sox2+ (en verde). Se observan células Sox2+ que incorporaron BrdU en el primordio (C), y los neuromastos maduros (F). A) y D) canal verde de inmunofluorescencia para Sox2. B) y E) canal rojo de inmunofluorescencia para BrdU. Barra = 10  $\mu$ m.



**Figura 38. Proliferación de células que expresan Sox3.** Larvas silvestres de 30 hpf y 3 dpf se incubaron 2 horas en 10 mM de BrdU, luego se realizó una inmunofluorescencia doble para detectar el BrdU (en rojo, B y E) y las células Sox3+ (en verde, A y D). Se observan células que expresan Sox3 que han incorporado BrdU, tanto en el primordio (C), como en un neuromasto (F). A) y D) canal verde de inmunofluorescencia de Sox3. B) y E) canal rojo de inmunofluorescencia de BrdU. Barra = 10  $\mu$ m.



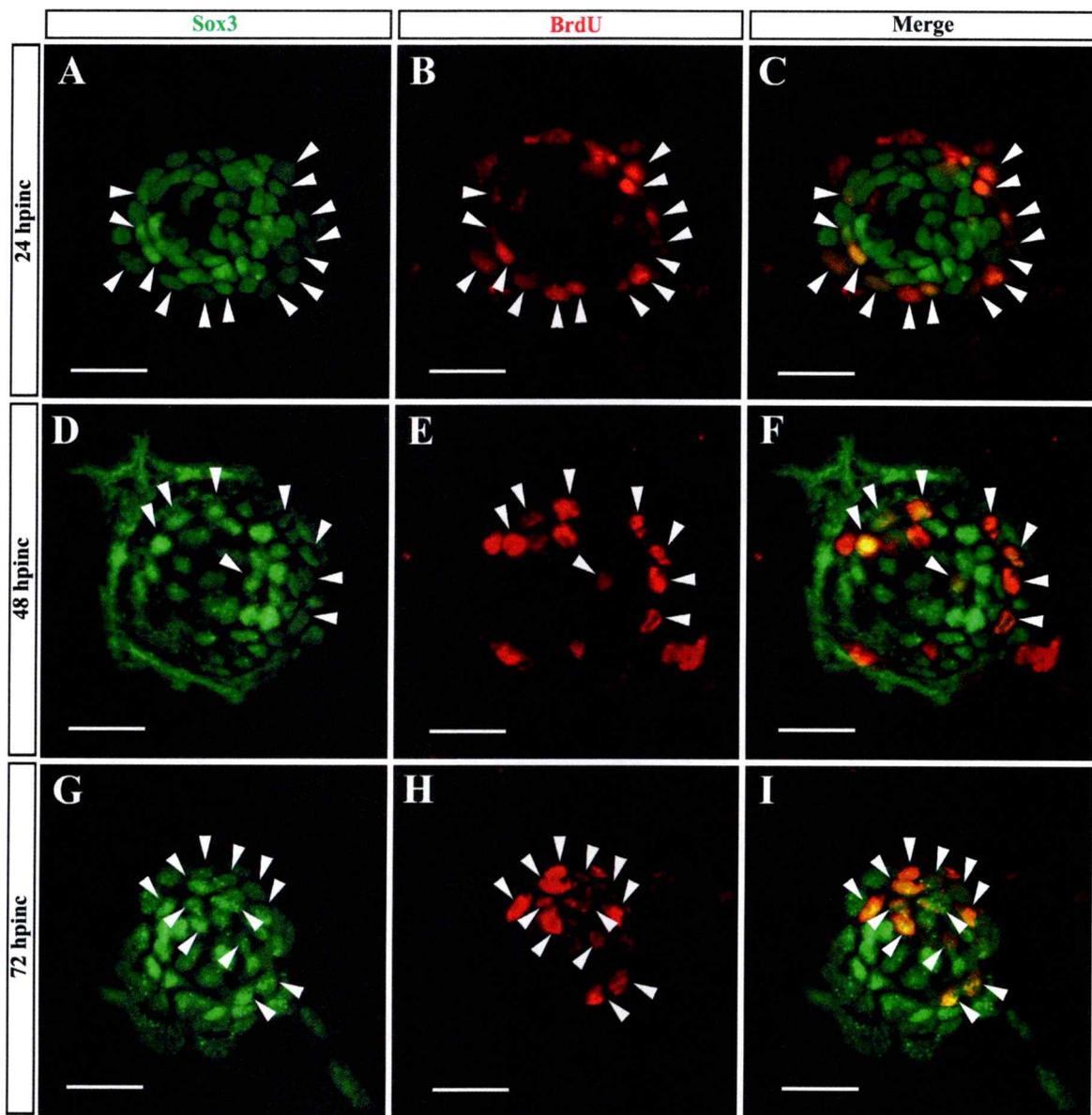
**Figura 39. Proliferación en células que expresan proteínas de la familia SoxB1 (PANSox+).** Larvas silvestres de 30 hpf y 3 dpf se incubaron 2 horas en 10 mM de BrdU, luego se realizó una inmunofluorescencia doble para detectar el BrdU (en rojo) y las células PANSox+ (en verde). A) y D) canal rojo de inmunohistoquímicas de BrdU. B) y E) canal verde de inmunohistoquímicas de PANSox. C) Se observan células PANSox+/BrdU+ en el primordio y en un neuromasto (F). Barra = 10  $\mu$ m.



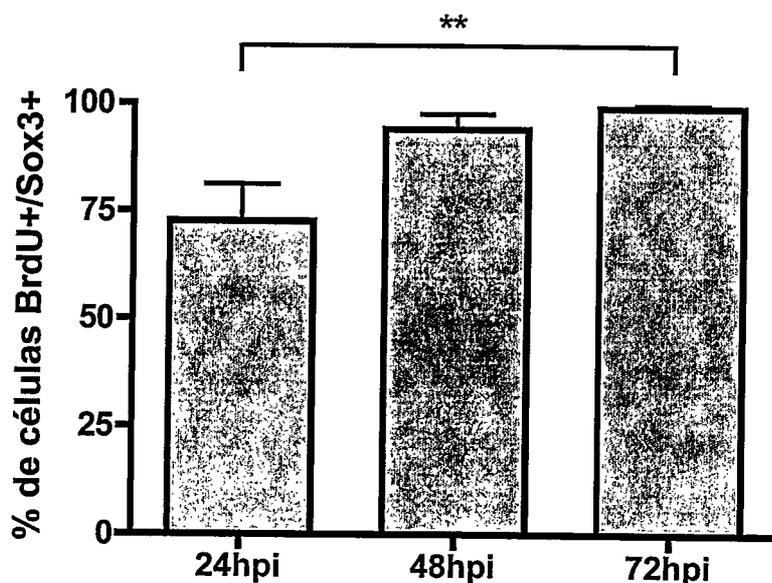
**Figura 40. Proliferación celular en neuromastos de larvas transgénicas *sox3h7:GFP*.** Larvas transgénicas de 3 dpf fueron incubadas en 10 mM de BrdU por 4 horas (fila superior, A, B y C) y 5 horas (fila inferior, D, E y F). Se observa incorporación de BrdU en células periféricas del neuromasto, algunas de las cuales coinciden con la marca de GFP. Barra = 10  $\mu$ m.

Debido a que observamos abundante proliferación en células que expresan marcadores de células troncales neurales en el primordio migratorio, decidimos evaluar si las células que incorporan BrdU en este grupo de células progenitoras se incorporan a los neuromastos. Para ello, larvas de 34 hpf, fueron sometidas a pulsos de 2 horas de BrdU 10 mM, con cazas de 24, 48 y 72 horas, y se realizó inmunohistoquímicas para detectar la proteína Sox3 y el análogo BrdU (Figura 41). Se puede observar que células Sox3<sup>+</sup> tienen marca de BrdU, incluso hasta 3 días después del pulso (Figura 41 G). También se puede observar que las células que proliferaron en el primordio se sitúan, 24 horas después del pulsos, en la periferia

de los neuromastos (Figura 41 C). En los días siguientes, se observa que las células que incorporan BrdU en el primordio, se sitúan en posiciones progresivamente más centrales (Figura 41 F e I). Cuantificamos el número de células BrdU+ respecto de las que expresan Sox3 y se detecta un aumento en la proporción de ellas en el neuromasto entre el primer y el tercer día de caza (Figura 42).



**Figura 41. Permanencia y ubicación de células proliferativas del primordio, en neuromastos maduros a distintos tiempos post pulsos de BrdU.** Larvas de 30 hpf se sometieron a pulsos de 4 horas con 10 mM de BrdU con cazas de 24, 48 y 72 horas (hpic). Se observan células Sox3+/BrdU+, a los 3 tiempos de caza, con una distribución aparentemente periférica de las células BrdU+ a las 24 horas post pulso (B), marca que luego se va centralizando en el neuromasto (E y H). Barra = 10  $\mu$ m.

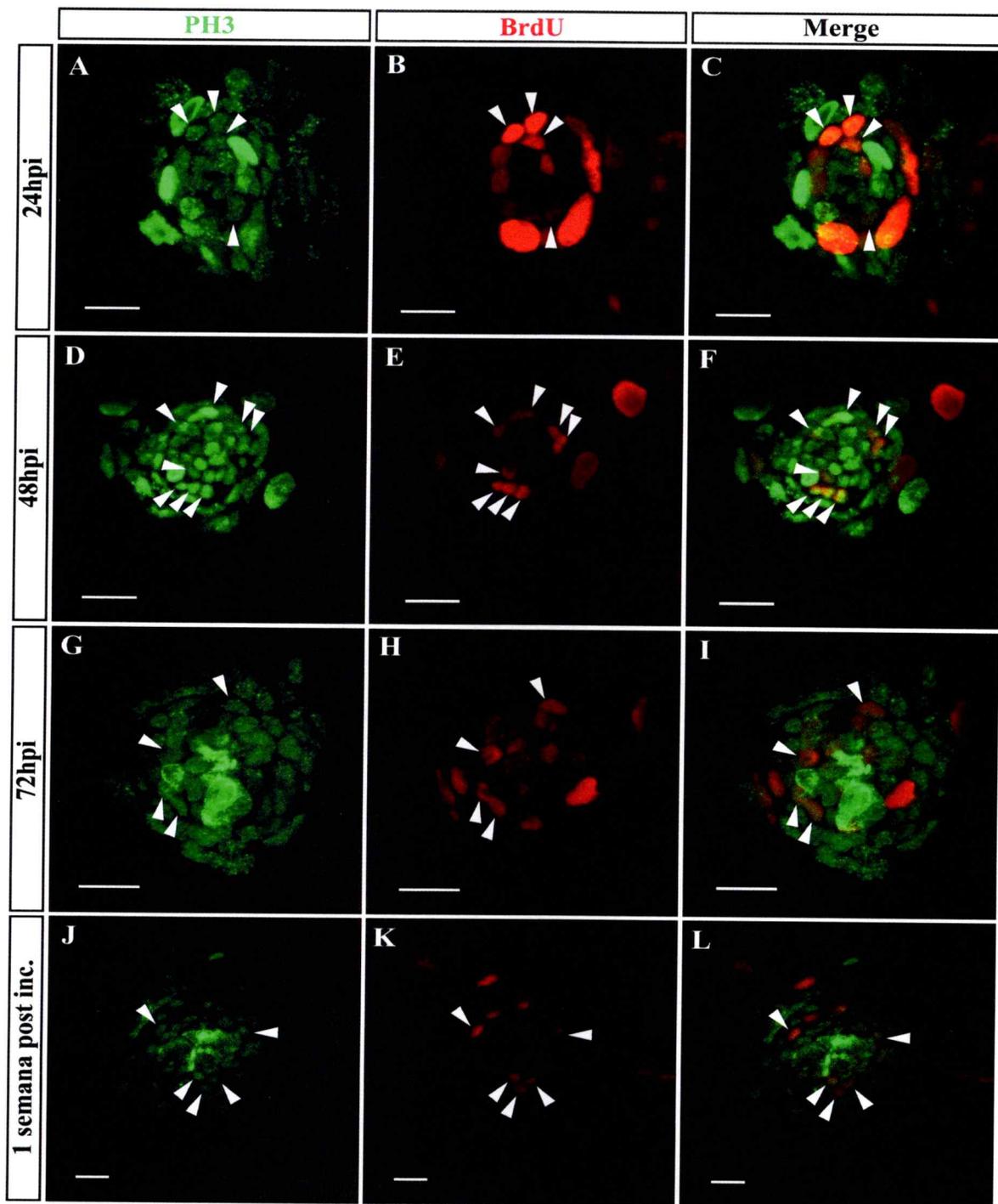


**Figura 42. Proporción de células BrdU+/Sox3+ en neuromastos post pulso de BrdU a 30 hpf y caza a distintos tiempos.** Larvas silvestres de 30 hpf se sometieron a pulsos de BrdU 10 mM por 2 horas y se fijaron para inmunofluorescencia contra Sox3 a 24, 48 y 72 horas post pulso. Se graficó la proporción de células BrdU+ que tienen marca de Sox3 en los distintos tiempos post incubación en BrdU, apreciándose un aumento significativo en el número de células que incorporaron BrdU+ en estadios tempranos (primordio) y que expresan el marcador Sox3 en neuromastos de tres días, versus un día de caza. ( $p > 0,01$ ).

#### 5.2.4. Autorenovación

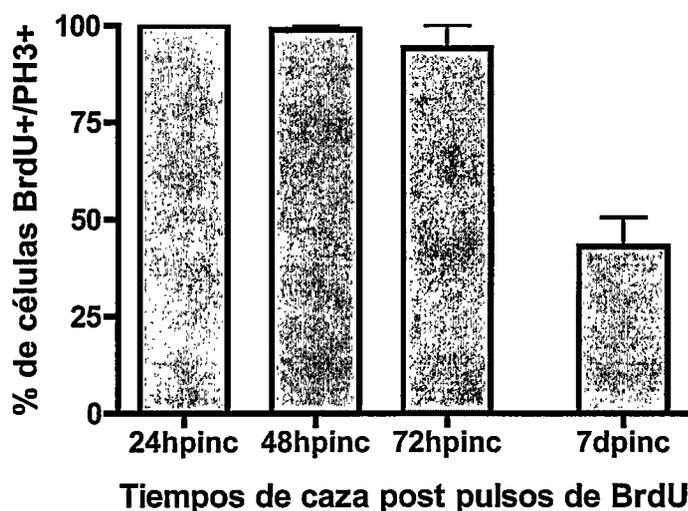
Una vez determinado que las células que expresan marcadores de progenitores neurales en el primordio migratorio y en los neuromastos maduros proliferan, se procedió a determinar si estas células poseían una de las

características claves de los progenitores neurales, la autorenovación. Para ello, larvas de 3 dpf se sometieron a: (a) pulsos de BrdU de 2 horas y caza a las 24, 48 y 72 horas después; y (b) pulsos de 24 horas y caza una semana después. Posteriormente se realizó inmunohistoquímica contra Fosfo-Histona 3 (PH3 por sus siglas en inglés, marcador de células en mitosis). De tal modo, se puede determinar si una célula progenitora que proliferó en una etapa temprana (primordio migratorio y observado mediante la expresión de la marca de BrdU), al mismo tiempo mantiene su estatus proliferativo (marca de PH3). En efecto, se observó la presencia de células que incorporaron BrdU y que son marcadas con el anticuerpo anti-PH3 en los distintos tiempos analizados (Figura 43).



**Figura 43. Incorporación de BrdU e inmunofluorescencias para PH3.** Larvas silvestres de 3 dpf fueron sometidas a un pulso de 2 horas en BrdU y a caza de 24, 48 y 72 horas (B, E y H), o a pulsos de 24 horas y caza de 1 semana (K). Posteriormente se realizó inmunohistoquímica para revelar el marcador de proliferación PH3 (A, D, G y J). Se indican con puntas de flechas las células que expresan ambos marcadores al realizar el la superposición de ambos canales (C, F, I y L). Barra = 10  $\mu$ m.

Al graficar la proporción de las células BrdU+ que tienen marca de PH3, se observa que en los tiempos de caza cortos (hasta 3 días post pulso de BrdU), cerca del 100% de las células que estaban proliferando al momento de los pulsos, sufren una nueva división. Este porcentaje baja a alrededor del 40% después de una caza de 1 semana (Figura 44).

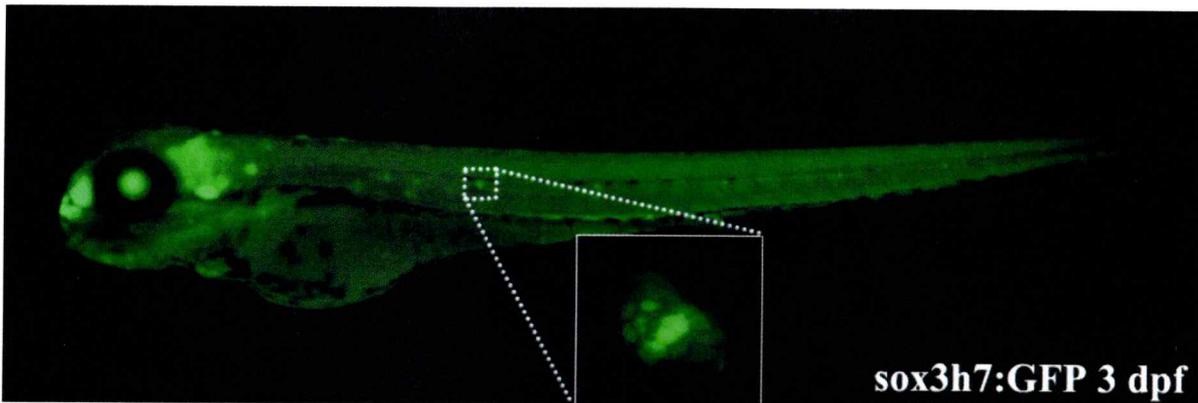


**Figura 44. Proporción de células que mantienen un estado proliferativo prolongado (BrdU+/PH3+).** Larvas silvestres de 3 dpf se sometieron a pulsos de BrdU de 2 horas y caza de 24, 48 y 72 horas post incubación (hpinc) y pulso de 24 horas y caza de 7 días post incubación. Se contabilizaron las células positivas para ambas marcas por separado y se graficó la proporción de células BrdU+ que tenían marca de PH3 (con respecto al total de células BrdU+) a los distintos tiempos de caza.

### 5.2.5. Multipotencialidad

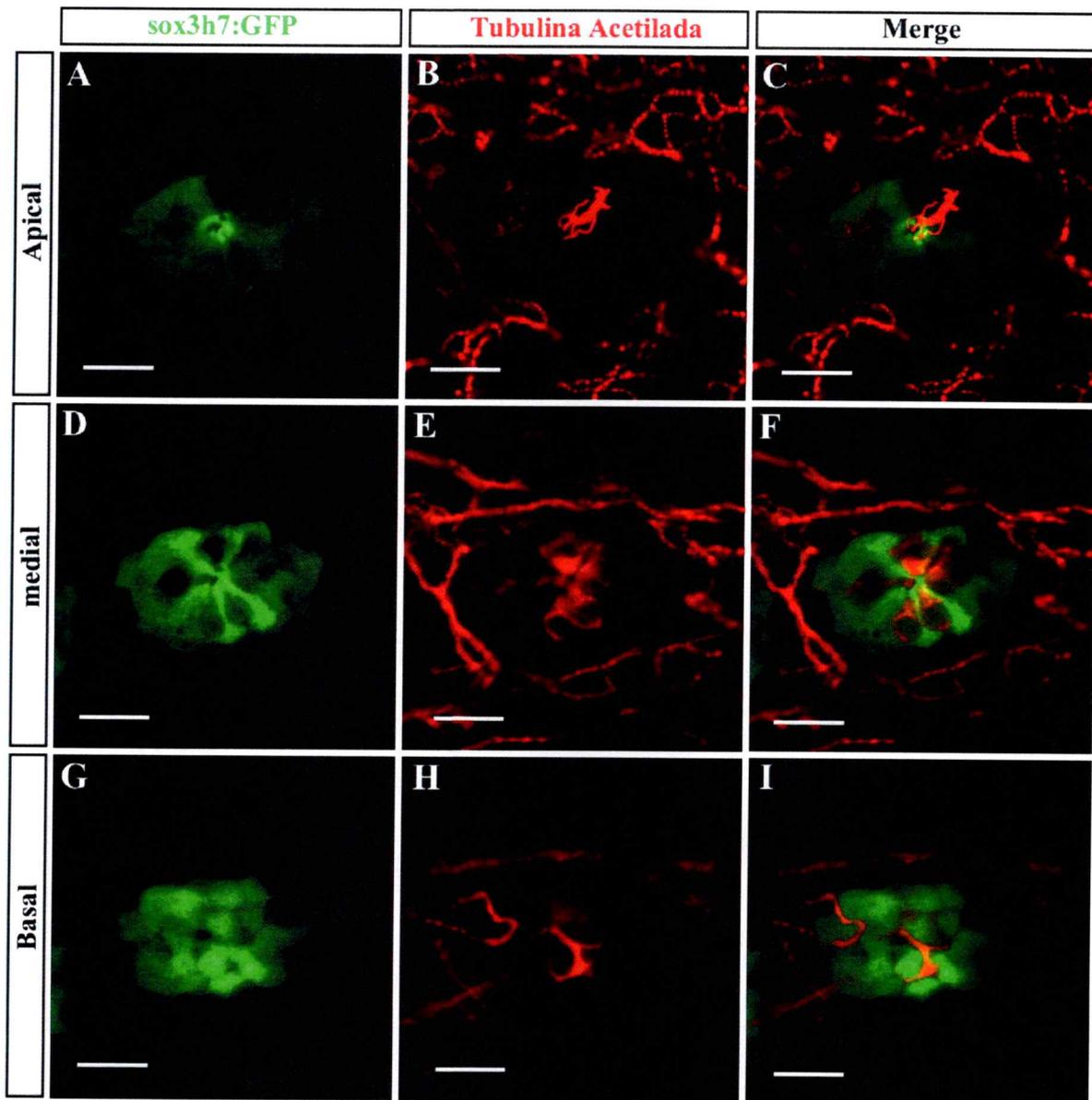
Una vez determinado que los neuromastos poseen una robusta capacidad de regeneración, y que los posibles progenitores proliferan y tienen la capacidad de autorenovarse, analizamos si estas células positivas para los marcadores de progenitores neurales encontrados en el Objetivo 1, poseen la importante característica de dar origen a uno o más de los tipos celulares diferenciados presentes en los neuromastos.

Usamos, en primer término, larvas transgénicas *sox3h7:GFP*, las que se trataron con 10  $\mu$ M de  $\text{CuSO}_4$  por 1 hora para eliminar tanto las células ciliadas como las de soporte. Dado que en esta línea transgénica se marcan las células de soporte, es posible determinar si existe regeneración de este tipo celular junto con la regeneración de células ciliadas. En la Figura 45 podemos observar la imagen de una larva inmediatamente luego del tratamiento con sulfato de cobre, donde se observa la pérdida de la estructura de las células de soporte marcadas por este transgénico, aunque se mantiene la presencia de unas pocas células GFP positivas.



**Figura 45. El daño con sulfato de cobre destruye las células de soporte de los neuromastos.** Larva transgénica *sox3h7:GFP* de 3 dpf inmediatamente después del tratamiento con  $\text{CuSO}_4$   $10 \mu\text{M}$  por 1 hora. Se observa aún marca de GFP en el costado de la larva, y en el recuadro ampliado de un neuromasto, el detalle de las células remanentes marcadas con GFP, y donde se aprecia la pérdida de la morfología de las células de soporte.

Al hacer un análisis 44 horas post tratamiento con sulfato de cobre y mediante cortes ópticos a distintos niveles en los neuromastos, podemos observar la regeneración de células de soporte (Figura 46, A, D y G) y células ciliadas maduras (Figura 46, B y E). También es posible observar el nervio de la LLP que inerva las células ciliadas, rodeando las células de soporte del neuromasto (Figura 46 H-I).

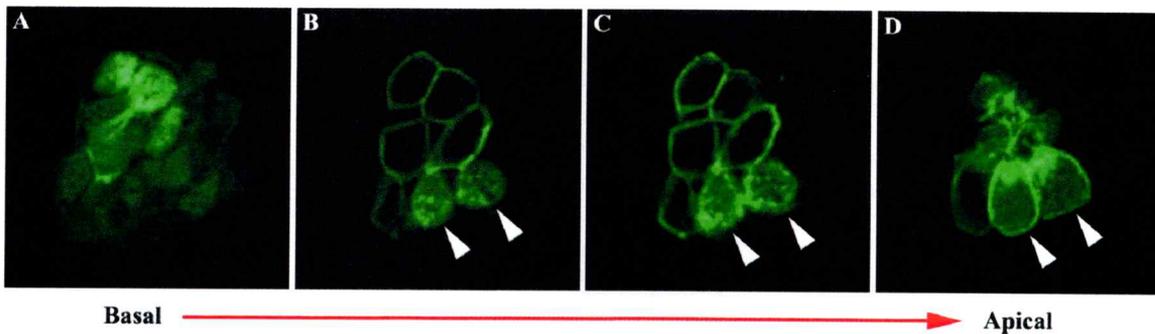


**Figura 46. Regeneración de dos tipos celulares en neuromastos 44 horas luego de un daño inducido por cobre.** Larvas *sox3h7:GFP* fueron tratadas con 10  $\mu$ M de  $\text{CuSO}_4$  por 1 hora y observadas 44 horas después. Se muestran cortes confocales apicales (A-C), mediales (D-F) y basales (G-I) de un mismo neuromasto, donde se observa la presencia de células ciliadas maduras y del nervio de la línea lateral (B, E y H) revelados ambos por inmunohistoquímica para Tubulina Acetilada, y de las células de soporte (A y D) detectadas por el GFP que expresan, así como un grupo de células más basales (G). Estas últimas, corresponden a parte de la población de progenitores que expresan proteínas de la familia SoxB1 y que expresan GFP en esta línea transgénica. Barra = 10  $\mu$ m.

El experimento anterior sugiere que la regeneración de las células de soporte ocurre a partir de las células progenitoras que expresan las proteínas Sox2 y Sox3 y que están marcadas con GFP en el pez transgénico *sox3h7:GFP*. Esto se puede deducir, por un lado, debido a la ubicación relativa de estas dos poblaciones (células de soporte centrales rodeadas de células SoxB1+) y por la permanencia de proteína GFP en las células de soporte. La estabilidad de la GFP es relativamente larga (1 día), lo que causa que células que han dejado de expresar Sox3 al diferenciarse, mantengan la marca fluorescente en el transgénico. Basados en esta hipótesis, podemos predecir que la diferenciación a células ciliadas a partir de estos progenitores también permitiría detectar GFP en ellas al momento de diferenciarse.

Para dilucidar esto realizamos varios experimentos; el primero fue originar larvas doble transgénicas *bm3c:mGFP/sox3h7:GFP* y tratarlas con 1  $\mu$ M de CuSO<sub>4</sub> por 2 horas, para eliminar solamente las células ciliadas y observar la regeneración de estas. Si bien ambos transgénicos expresan la proteína GFP, esta se encuentra distribuida de forma distinta en ambos transgénicos; en el transgénico *bm3c:mGFP*, el GFP se destina a la membrana celular, y en el *sox3h7:GFP* se ubica en el citoplasma celular. Esta característica, junto con el uso de microscopía confocal nos permitió diferenciar la expresión de GFP de ambos tipos celulares. El resultado del experimento de regeneración en esta línea doble transgénica se observa en la Figura 47. Efectuamos cortes ópticos a distintos niveles del neuromasto y es posible detectar a nivel basal la presencia de las células *sox3h7:GFP+* que expresan el fluoróforo en su citoplasma (Figura 47, A).

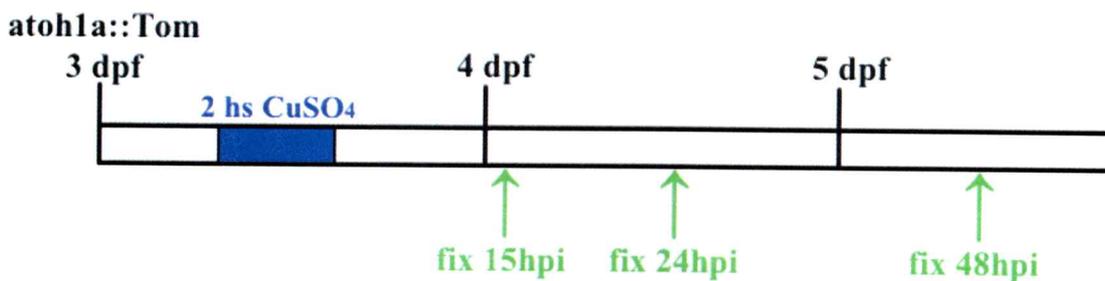
En cambio, cortes más apicales reflejan la presencia de células ciliadas que expresan GFP en su membrana (Figura 47, B-D). De manera importante se advierte la presencia de un par células ciliadas regeneradas que mantienen expresión de GFP en su citoplasma, indicándonos claramente su origen a partir de células *sox3h7:GFP+*.



**Figura 47. Regeneración de células ciliadas por transdiferenciación.** Larvas dobles transgénicas *brn3c:mGFP/sox3h7:GFP* de 72 hpf se trataron con 1  $\mu$ M de  $\text{CuSO}_4$  por 2 horas. Se observaron bajo microscopia confocal 24 horas post tratamiento, realizándose cortes ópticos a distintos niveles del neuromasto regenerado. A, corte basal donde se observan células *sox3h7:GFP+*. B, C, D, cortes sucesivamente más apicales en el neuromasto en los que se ven células ciliadas (*brn3c:mGFP* que expresan GFP de membrana). Dos de ellas (cabezas de flecha), presentan GFP en el citoplasma, lo que indica su origen a partir de células *sox3h7:GFP+*, vía transdiferenciación de estas células.

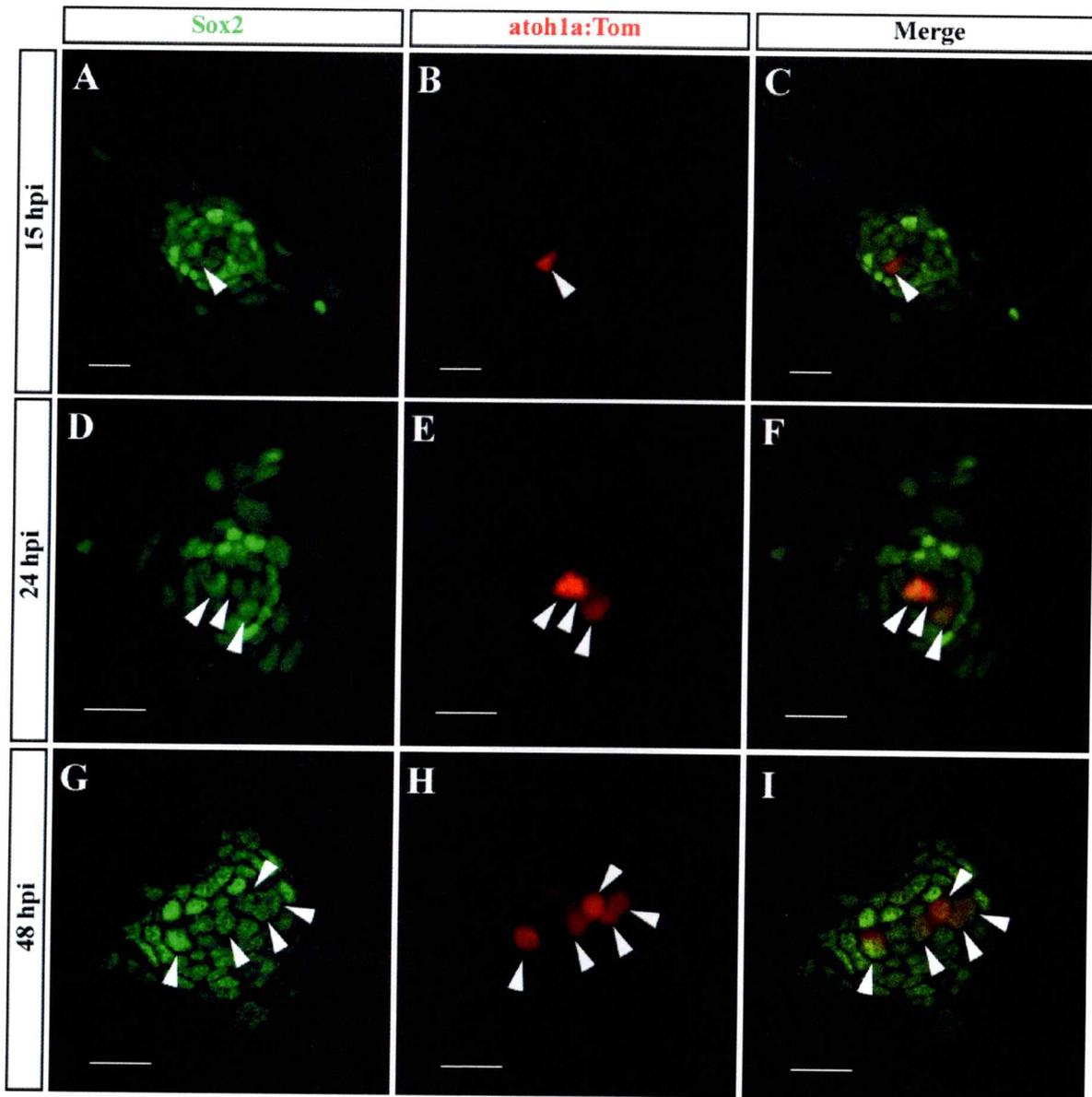
Por otro lado, se aprovechó la disponibilidad de la línea transgénica *atoh1a:Tomato*, que expresa la proteína fluorescente *Tomato* bajo el control de los enhancers del gen proneural específico de células ciliadas *atoh1a*. En esta línea, se marcaron con *Tomato* las células ciliadas desde un estado de compromiso final, incluso apareciendo la marca antes de la división del precursor final que genera dos células ciliadas tras su última mitosis (López-Schier y cols., 2006).

Larvas de la línea *atoh1a:Tom* de 3 dpf se incubaron en 10  $\mu$ M de  $\text{CuSO}_4$  por 2 horas, se esperó que regeneraran las células ciliadas y se fijaron a las 15, 24 y 48 horas post tratamiento para hacer inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-Sox2 (Figura 48). Como resultado se pudo observar que la mayoría de las células que expresan *Tomato*, y por tanto han adquirido el destino de célula ciliada, expresan también la proteína Sox2 (Figura 49).

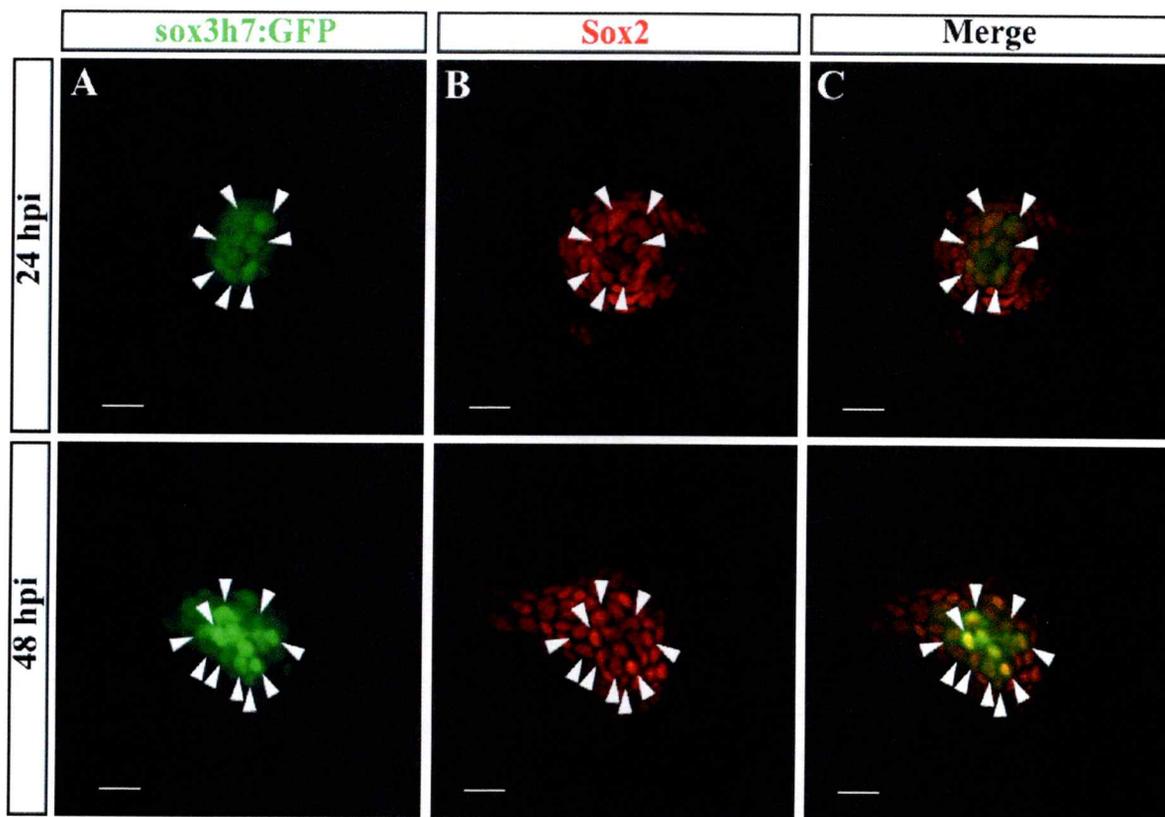


**Figura 48. Tratamiento de larvas *atoh1a:Tom*.** Esquema de incubaciones de las larvas transgénicas *atoh1a:Tom* de 3 dpf en 10  $\mu$ M de  $\text{CuSO}_4$  por 2 horas, y sus posteriores tiempos de fijación para análisis del marcador neural Sox2. fix: fijación. hpi: horas post incubación.

El mismo procedimiento se realizó con la línea transgénica *sox3h7:GFP*, en el cual larvas de 3 dpf se incubaron en 10  $\mu$ M de  $\text{CuSO}_4$  por 2 horas, se fijaron a las 24 y 48 horas post incubación y se realizó inmunohistoquímica para el marcador Sox2. Se observó la presencia de células con ambas marcas en el centro de los neuromastos que regeneraron (Figura 50).



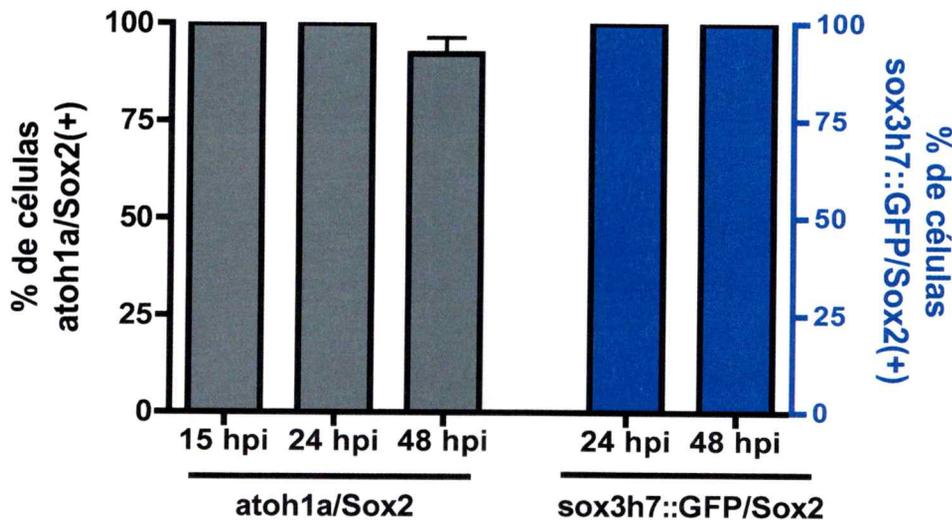
**Figura 49. Las células ciliadas regeneran a partir de progenitores que expresan proteínas SoxB1.** Larvas *atoh1a:Tom* de 3 dpf fueron incubadas en 10  $\mu$ M de  $\text{CuSO}_4$  por 2 horas, y fijadas a distintos tiempos (15, 24 y 48 horas post incubación, hpi) para posteriormente realizar inmunohistoquímica para Sox2. Las células que expresan ambos marcadores se indican con cabezas de flechas blancas. Barra = 10  $\mu$ m.



**Figura 50. Colocalización de la expresión de GFP y la proteína Sox2 en neuromastos de larvas *sox3h7:GFP*.** Larvas *sox3h7:GFP* de 3 dpf se incubaron en 10  $\mu$ M de Cobre por 2 horas, y se fijaron 24 y 48 horas después. Se efectuó inmunohistoquímica para Sox2 y se observó la presencia de células con doble marca (cabezas de flechas blancas). Barra = 10  $\mu$ m.

Para determinar el grado de colocalización de los marcadores *sox3h7:GFP* y *atoh1a:Tom* con la proteína Sox2 en células del neuromasto regenerado, se hizo una cuantificación de las células con doble marca en cada paso, respecto del total de células que expresan la proteína Sox2. El resultado (Figura 51) muestra que prácticamente la totalidad de las células *atoh1a:Tom* y *sox3h7:GFP* expresan la proteína Sox2 en los tiempos analizados. Esto reafirma la noción de que el origen de al menos dos estado celulares diferenciados en el neuromasto regenerado luego de un daño, provienen de la población de progenitores caracterizados por la

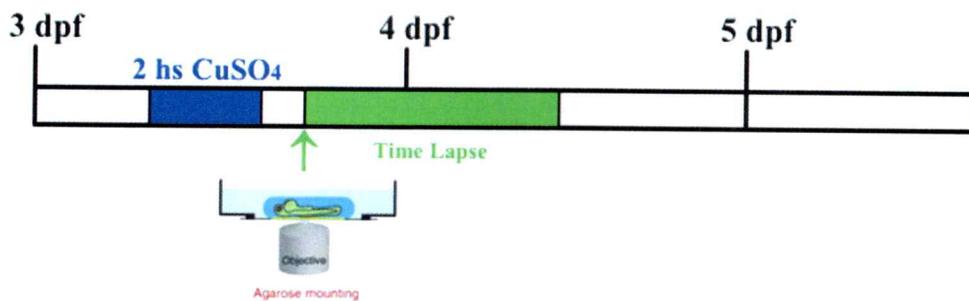
expresión de proteínas SoxB1. Es importante señalar que en un neuromasto no dañado (en una condición normal), se ve muy poca co-localización de estos marcadores, por lo que estamos en presencia de células que han transitado recientemente entre un estado y otro: progenitor (Sox2+) a soporte (*sox3h7::GFP+*) o progenitor (Sox2+) a ciliada (*atoh1a::Tom+*).



**Figura 51. Porcentaje de células *atoh1a+* y *sox3h7+* que expresan Sox2+ luego de un proceso regenerativo.** Larvas transgénicas *atoh1a::Tom* y *sox3h7::GFP* fueron tratadas con  $\text{CuSO}_4$  y procesadas para detectar la expresión del marcador Sox2 a distintos tiempos de recuperación. Se grafica el porcentaje de células que expresan *Tomato* (en larvas *atoh1a::Tom*; barras grises) o *GFP* (en larvas *sox3h7::GFP*; barras azules) respecto de las células marcadas con el anticuerpo anti-Sox2. hpi: horas post incubación. No se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de marca doble a ninguno de los tiempos analizados.

Debido a que todas las células ciliadas (*atoh1a+*) y aquellas marcadas con *GFP* en el transgénico *sox3h7::GFP* expresan Sox2, se procedió a efectuar experimentos de captura de imagen en tiempo extendido (*time lapse*) para poder evidenciar el momento en el cual se generan las transiciones y, por lo tanto,

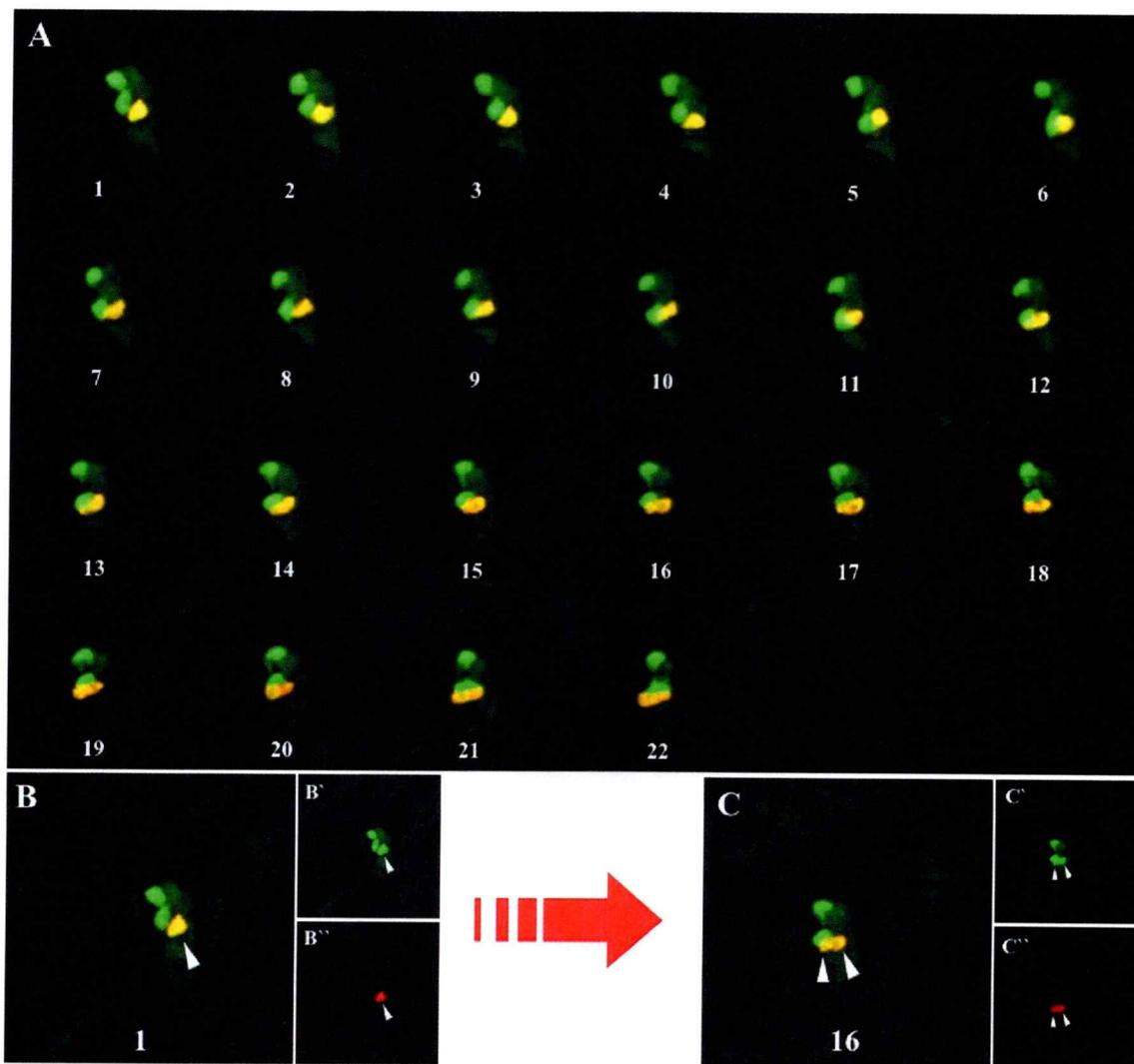
demostrar fehacientemente el origen de las nuevas células ciliadas. Para esto larvas de 3 dpf del doble transgénico *sox3h7:GFP/atoh1a:Tom* fueron incubadas en 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  y posteriormente montadas para observar la regeneración bajo microscopia confocal y captura “*time lapse*” (TL) (Figura 52).



**Figura 52. Esquema de experimentos de “Time Lapse”.** Larvas doble transgénicas de 3 dpf se incuban en  $\text{CuSO}_4$  por 2 horas, para luego montarlas en agarosa de bajo punto de fusión y observar bajo microscopia confocal utilizando la técnica de *time lapse*.

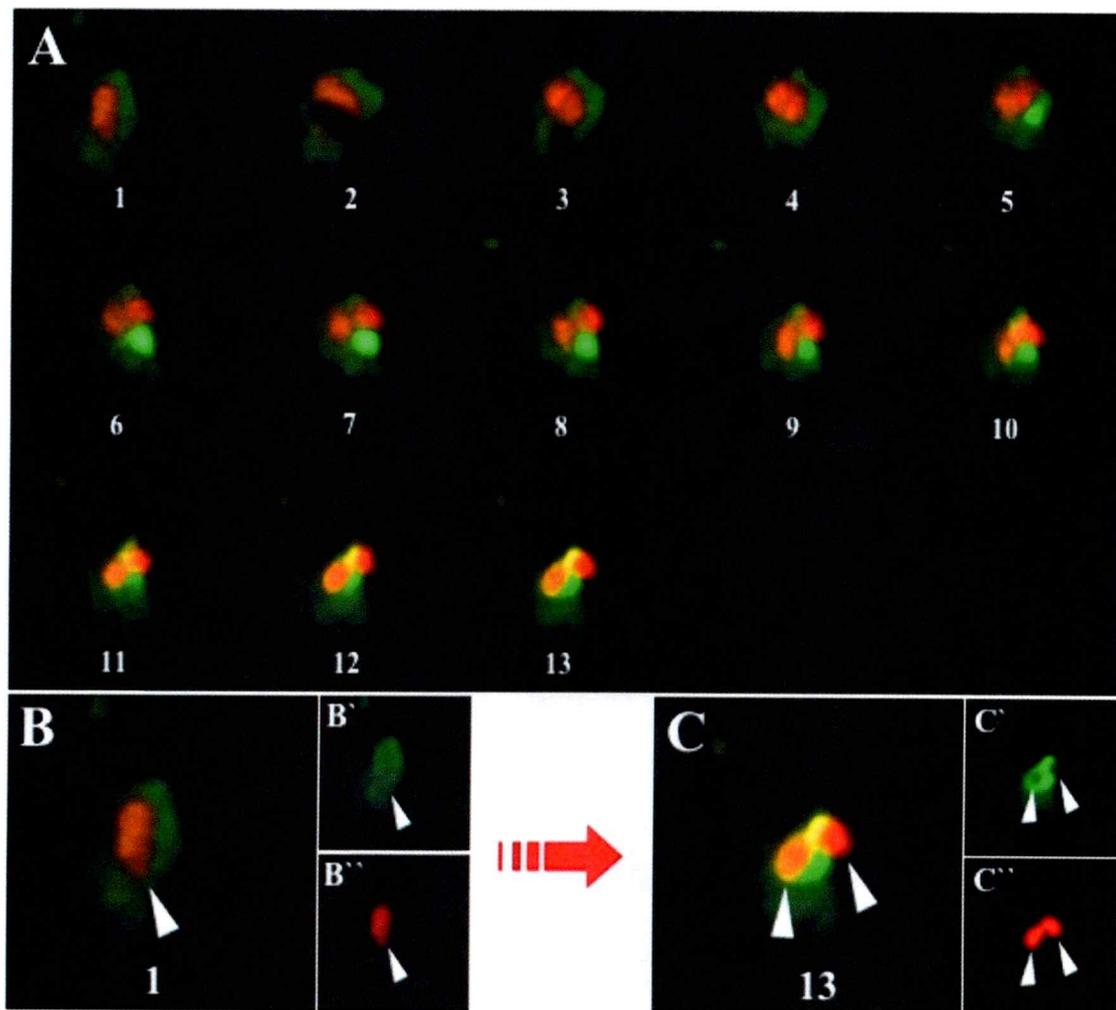
Como resultado de esta serie de experimentos de *time lapse*, se obtuvieron registros de varias de las transiciones que ocurren durante el proceso de regeneración de neuromastos, que se nombran y detallan a continuación:

1.- En una larva doble transgénica *sox3h7:GFP* y *atoh1a:Tomato* se detecta una célula con ambas marcas (GFP+/Tomato+), que se divide simétricamente produciendo 2 células que mantienen la expresión de ambos marcadores (Figura 53).



**Figura 53. División simétrica de un precursor que da origen a dos células ciliadas con persistencia del marcador del precursor.** Imágenes captadas de un neuromasto en una larva doble transgénica *sox3h7:GFP/atoh1a:Tomato* durante la regeneración. A) secuencia de imágenes del *time lapse*. B) primera imagen del TL donde se observa una célula que expresa ambos marcadores, GFP y Tomato. C) el seguimiento de la célula mostrada en (B) indica que se dividió simétricamente manteniendo la expresión de GFP y Tomato.

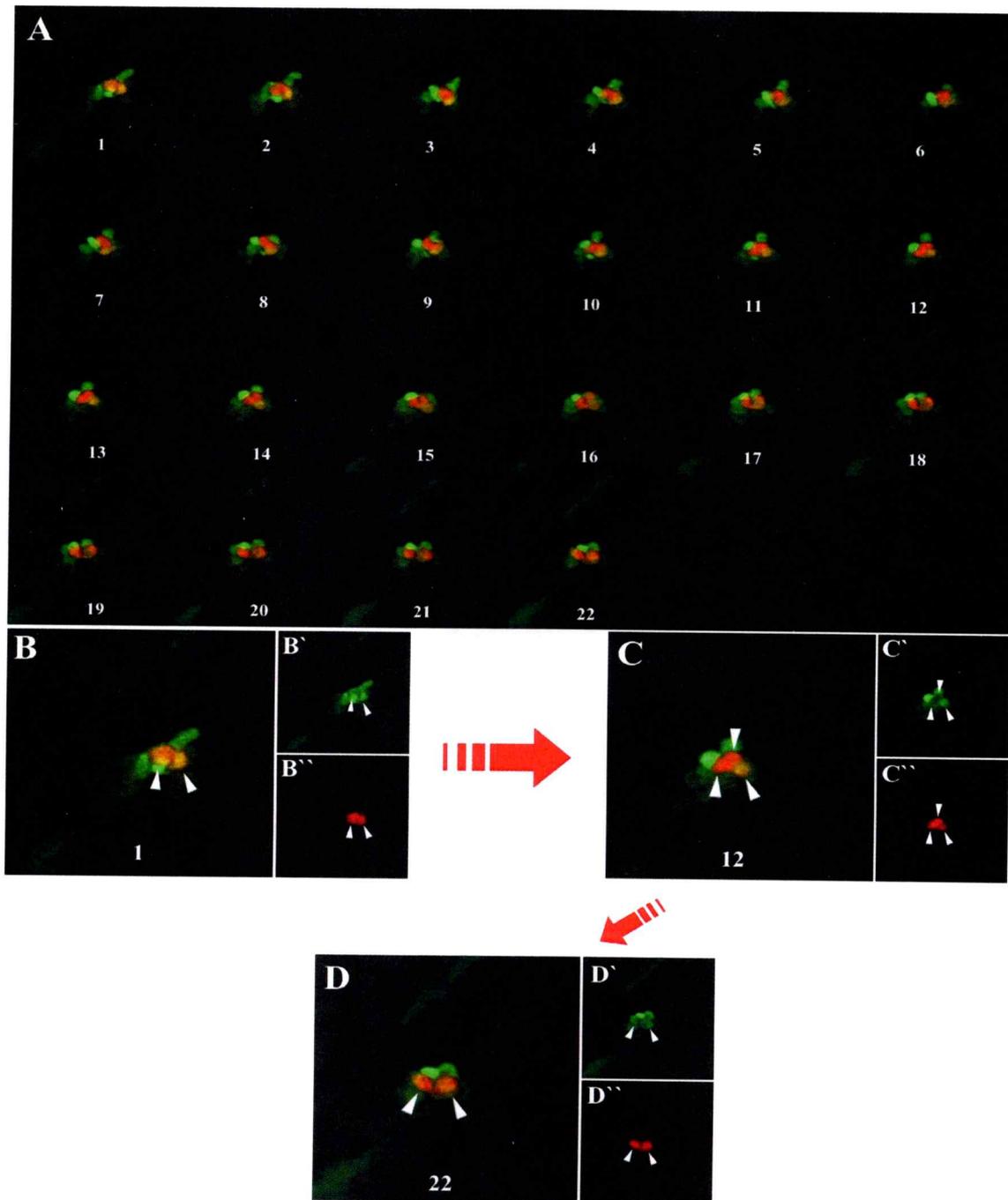
2.- En una larva doble transgénica *sox3h7:GFP* y *atoh1a:Tomato* se detecta una célula con ambas marcas (GFP+/Tomato+) que se divide simétricamente produciendo 2 células que pierden la expresión de GFP, solo expresan Tomato. Las células ciliadas son rodeadas por células GFP+, con morfología típica de las células de soporte GFP+ observadas en este transgénico (Figura 54).



**Figura 54. División simétrica de un precursor que da origen a dos células ciliadas con pérdida del marcador del precursor.** Imágenes captadas de un neuromasto en una larva doble transgénica *sox3h7:GFP/atoh1a:Tom* durante la regeneración. A) secuencia de imágenes del *time lapse*. B) primera imagen del TL donde se aprecia una célula que expresa ambos marcadores. C) la célula se ha dividido una vez y ha dejado de expresar GFP, manteniendo sus células hijas sólo

la marca de *Tomato*. Estas células *Tomato+* quedan rodeadas de células *GFP+* (posiblemente células de soporte).

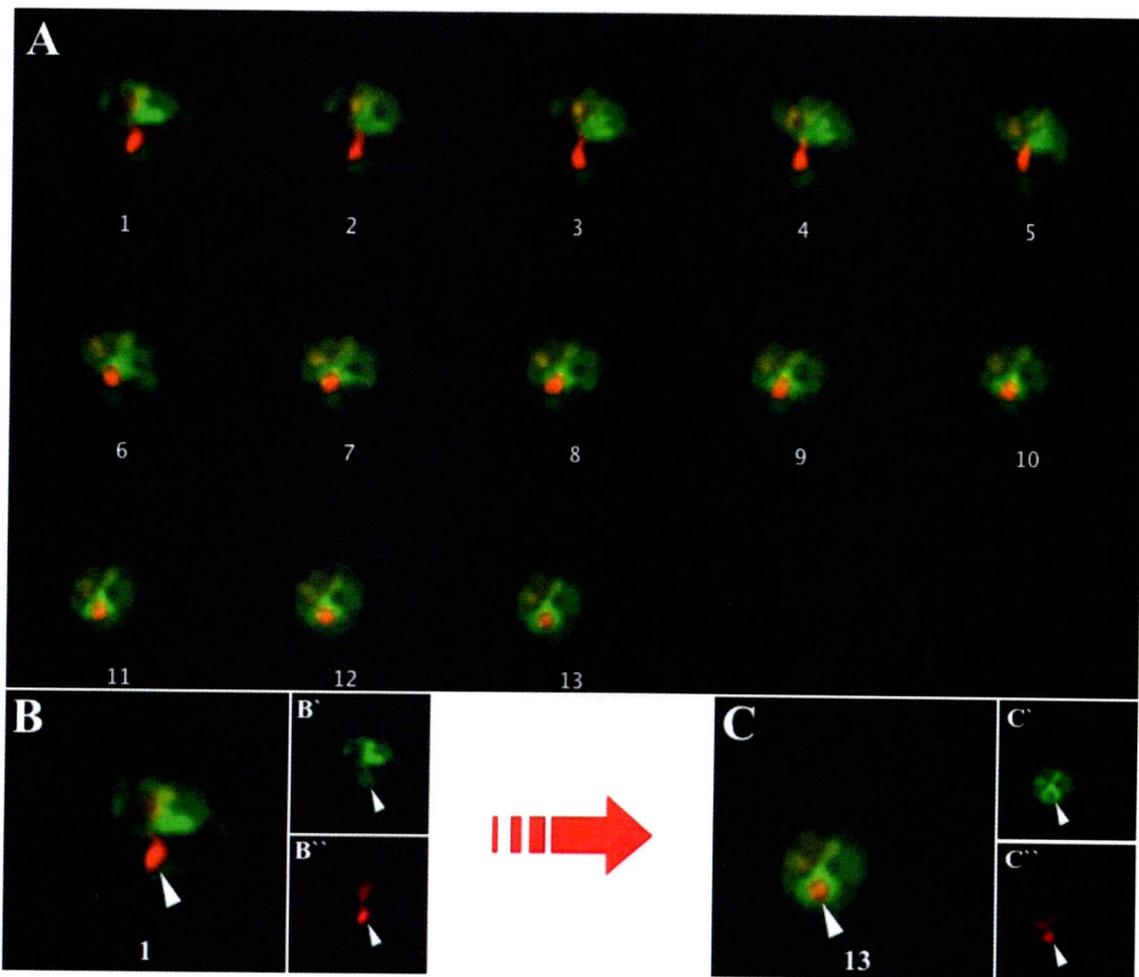
3.- En una larva doble transgénica *sox3h7:GFP* y *atoh1a:Tom* se detectan dos células con ambas marcas (*GFP+/Tomato+*). En la secuencia de imágenes (Figura 55), se observa la división simétrica de una de ellas mientras la otra permanece sin dividirse. La célula indivisa mantiene la expresión de *GFP* y *Tomato*, mientras las células que sufrieron la mitosis eventualmente pierden la expresión de *GFP*.



**Figura 55.** Los precursores de células ciliadas pueden dividirse simétricamente o permanecer indivisos durante la regeneración. Imágenes captadas de un neuromasto en una larva doble transgénica *sox3h7:GFP/atoh1a:Tom* durante la regeneración. A) secuencia de imágenes del *time lapse*. B) primera imagen del TL donde se observan dos células que expresan ambos marcadores (cabezas de flechas); C) una de ellas pierde paulatinamente la expresión de GFP, y se divide simétricamente; D) Estas células sólo expresan Tomato al final de la secuencia (cabezas de flechas). La célula indivisa mantiene

la expresión de ambos marcadores aunque no se visualiza completamente en este nivel pues adquiere una posición más basal.

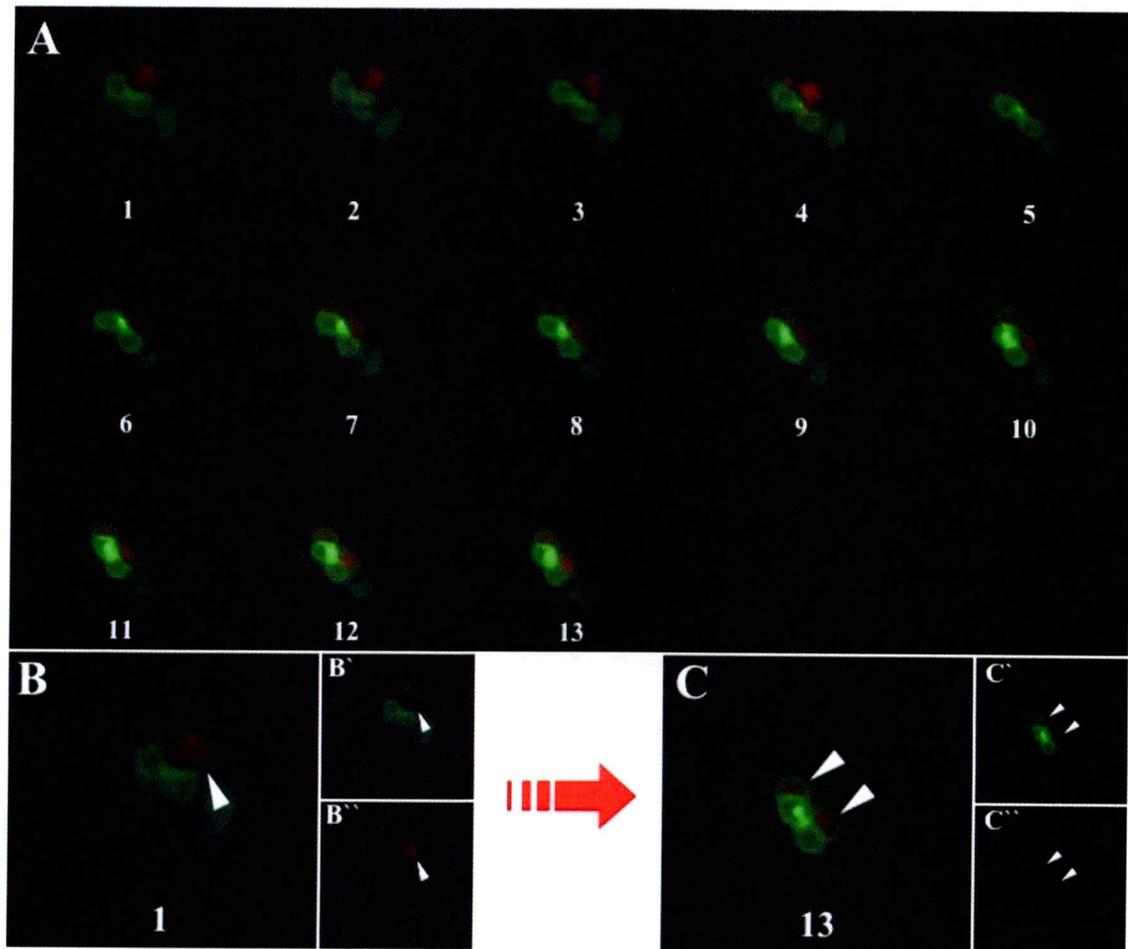
4.- Finalmente, se observó que un neuromasto de una larva doble transgénica *sox3h7:GFP* y *atoh1a:Tom* se detecta una célula Tomato+ solitaria que no se divide y que es rodeada por una célula GFP+, lo que sugiere que se esta diferenciando y asociando a una célula de soporte (Figura 56).



**Figura 56. Diferenciación de una célula ciliada y su asociación con una célula de soporte.** Imágenes captadas de un neuromasto en una larva doble transgénica *sox3h7:GFP/atoh1a:Tom* durante la regeneración. A) secuencia de imágenes del *time lapse*. B) primera imagen del TL donde se aprecia una célula Tomato+ aislada (cabeza de flecha). C) la célula ciliada no se divide y es rodeada

por una célula GFP+, adoptando la relación normal que se observa en el neuromasto intacto, con una célula de soporte rodeando una célula ciliada (cabeza de flecha en C).

El gen *atoh1a* se expresa en precursores inmediatos de células ciliadas, comenzando su expresión antes de la división simétrica final que lleva a la formación de dos células ciliadas (López-Schier y cols., ). Para confirmar que la marca de la proteína fluorescente Tomato en el transgénico *atoh1a:Tom* efectivamente se exprese en células que se diferencian como células ciliadas, generamos un doble transgénico, *brn3c:mGFP/atoh1a:RFP*. Larvas doble transgénicas de 3 dpf se incubaron en 10  $\mu$ M de CuSO<sub>4</sub> por 1 hora y se esperó ver la aparición de las primeras células Tomato+ para montarlas e iniciar el *time lapse*. Se observó que, a partir de 1 célula Tomato+ que se divide simétricamente, se obtienen dos células Tomato+, que adquieren paulatinamente expresión de GFP en sus membranas, y asume la morfología y posición de células ciliadas maduras (Figura 57).

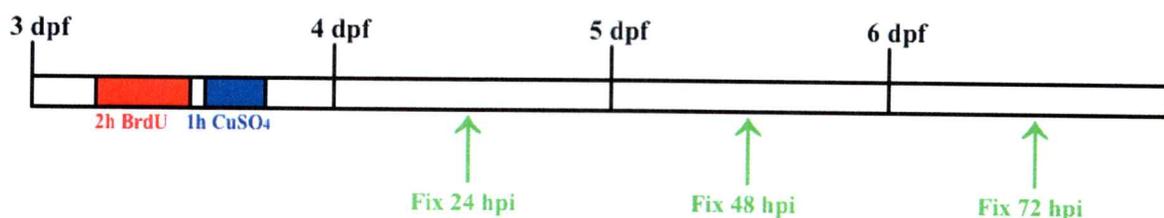


**Figura 57. Diferenciación de células ciliadas a partir de precursores premitóticos.** Imágenes captadas de un neuromasto en una larva doble transgénica *brn3c:mGFP/atoh1a:Tom* durante la regeneración. A) secuencia de imágenes del *time lapse*. B) primera imagen del TL que muestra una célula Tomato+ carente de marca de GFP, lo que indica que es un precursor no diferenciado (cabeza de flecha). C) este precursor se ha dividido y expresa GFP en su membrana, marca que indica que se han diferenciado como células ciliadas (cabezas de flechas).

### 5.3. Caracterización de células troncales que participan en la regeneración de la línea lateral.

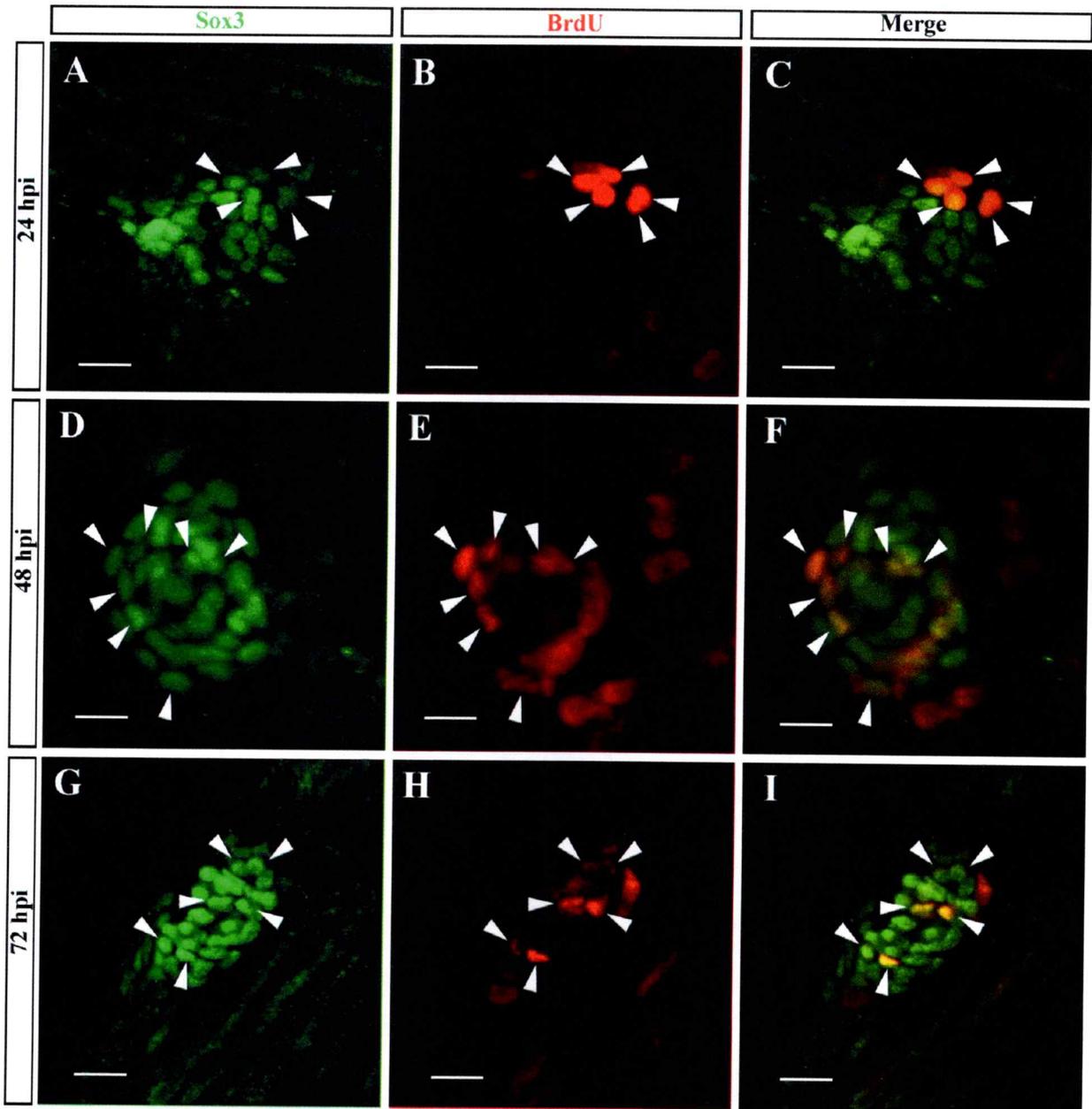
Para caracterizar de mejor forma el comportamiento y destino de las células proliferativas en el contexto de la regeneración de células en el neuromasto, se realizaron experimentos de marcaje de las células en proliferación y se sometieron a distintos tratamientos con  $\text{CuSO}_4$  para inducir regeneración de los distintos tipos celulares presentes en éste órgano. Posteriormente se realizó inmunohistoquímica para detectar los marcadores neurales Sox2 y Sox3 y relacionar a estos genes con la regeneración de este sistema sensorial.

Como primer experimento, se incubaron larvas silvestres de 3 dpf en 10 mM de BrdU por 2 horas y luego se trataron con 10  $\mu\text{M}$  de sulfato de cobre por 1 hora para eliminar las células ciliadas. Posteriormente se fijaron a 24, 48 y 72 horas post incubación (hpi) (Figura 58) y se realizó inmunohistoquímica contra Sox3 para determinar el comportamiento proliferativo de las células Sox3+ previo a un daño. El resultado de la inmunohistoquímica en los neuromastos fijados a distintos tiempos demuestran que existe una población relativamente estable de células Sox3+ que mantienen la marca de BrdU (Figura 59).



**Figura 58. Esquema de marcación con BrdU seguido de daño y regeneración de neuromastos.** Larvas silvestres de 3 dpf se incubaron 2 horas en BrdU 10 mM, luego

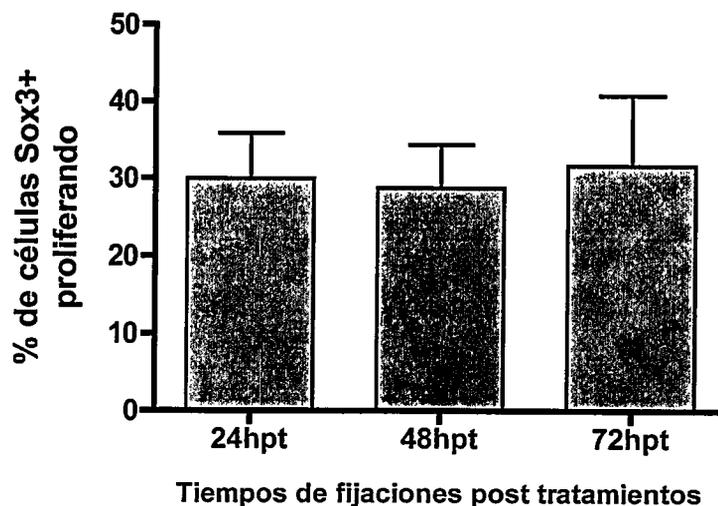
se trataron con 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{CuSO}_4$  por 1 hora, para luego fijar (fix) a 24, 48 y 72 horas post incubación (hpi).



**Figura 59. Estabilidad de progenitores en neuromastos luego de un proceso de daño y regeneración.** Larvas de 3 dpf se incubaron en BrdU 10 mM y luego en sulfato de cobre 10  $\mu\text{M}$  por 1 hora para eliminar las células ciliadas. Se fijaron a las 24, 48 y 72 horas post tratamiento y se sometieron a inmunohistoquímica para detectar BrdU y la proteína Sox3. Se aprecia que, células que proliferaron al momento del

pulso, siguen marcadas con el análogo y expresan la proteína Sox3 en los tres tiempos analizados (puntas de flecha). (horas post incubación = hpi). Barra = 10  $\mu$ m.

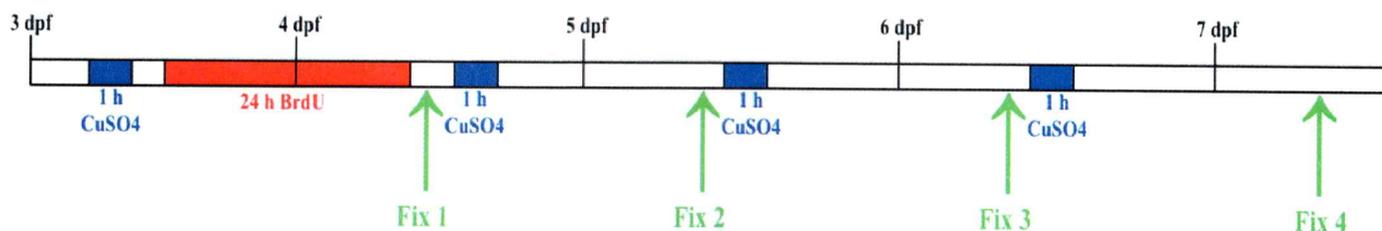
Al cuantificar el porcentaje de células Sox3+/BrdU+ (células Sox3 positivas y que tienen marca de BrdU), con respecto al total de células Sox3 positivas en los neuromastos, podemos apreciar que este porcentaje se mantiene relativamente constante (alrededor del 30%), sin encontrarse diferencias significativas entre las distintas horas de fijación (Figura 60). Este resultado nos indicaría que existe una población de progenitores en el neuromasto, que en condiciones normales proliferan, y que luego de un daño, ellas o sus hijas se mantienen como parte de esa población. Es decir, estas células sufren al menos una división y, al menos una de las células hijas no entra en el proceso de diferenciación que llevaría a la regeneración de los distintos tipos celulares del neuromasto.



**Figura 60. Existe una población de progenitores que se dividen en el neuromasto y mantienen ese estado aún luego de un proceso regenerativo.** Larvas silvestres se incubaron con BrdU y luego con CuSO<sub>4</sub>, se fijaron a distintas horas post tratamiento (hpt) y se les realizó inmunohistoquímica para detectar BrdU y el marcador Sox3. Se

contabilizaron las células BrdU+, Sox3+ y se calculó el porcentaje de células Sox3+ positivas para BrdU respecto al total de células marcadas con el anticuerpo anti-Sox3. Se observa que el porcentaje de estas células se mantiene durante los primeros tres días post daño. No se encontraron diferencias significativas entre los distintos tiempos luego de los tratamientos.

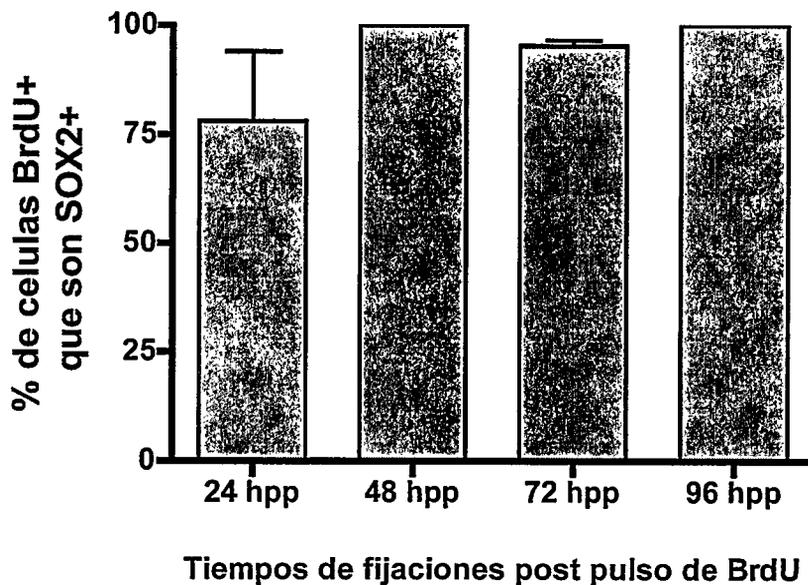
Para conocer la potencialidad proliferativa de las células progenitoras y el destino de las nuevas células producidas en un contexto de regeneración reiterada de las células ciliadas, se forzó al sistema a regenerar repetidas veces en periodos cortos de tiempo. Larvas *brn3c:mGFP* de 3 dpf se sometieron a un pulso de 1 hora con 10  $\mu$ M de CuSO<sub>4</sub> para eliminar las células ciliadas, se incubaron 24 horas en BrdU 10 mM para marcar aquellas células que proliferan post daño, y se fijó un grupo de larvas al finalizar el pulso (fix 1, 24 horas post pulso de BrdU, hpp). Para el resto de las larvas, se confirma la regeneración de células ciliadas al cabo de 24 horas, y nuevamente se someten a una ronda de daño con 10  $\mu$ M de CuSO<sub>4</sub> por 1 hora para eliminar estas células ciliadas regeneradas. Se espera 24 horas en un nuevo ciclo de regeneración y se fija un segundo grupo de larvas (fix 2, 48 horas post pulso de BrdU). Las restantes se procesan de la misma manera en una tercera y cuarta ronda de daño y regeneración fijando 24 horas después del tratamiento con cobre en cada paso. El esquema que describe los pasos seguidos en este experimento se ilustra la Figura 61.



**Figura 61. Esquema de experimentos de ciclos repetidos de daño y regeneración con incorporación de BrdU en el primer ciclo regenerativo.** Se somete a larvas transgénicas *brn3c:mGFP*, a varias rondas de daño con cobre, incubándose con BrdU durante el primer ciclo de regeneración. Grupos de larvas se fijaron (fix) 24 horas después de cada evento de daño.

Al analizar las imágenes de este experimento, se realizaron registros de las células ciliadas regeneradas (mediante la marca de GFP en el transgénico *brn3c:mGFP*), de las células BrdU<sup>+</sup> y de las células Sox2<sup>+</sup> (estas mediante las inmunohistoquímicas respectivas) para cada uno de los tiempos de fijación. Con estos datos se analizaron, contabilizaron y graficaron, primero, las células BrdU<sup>+</sup> que tienen expresión del marcador Sox2 para poder determinar qué proporción de las células que proliferaron posterior al primer daño con CuSO<sub>4</sub> mantienen la expresión del marcador de progenitores, y si esta proporción cambia en el tiempo (Figura 62). En el gráfico podemos observar que la gran mayoría de las células que proliferan luego del primer daño, expresan el marcador de progenitores neurales Sox2, en todos los tiempos analizados. No se observaron diferencias significativas en esta proporción, lo que indica que las células progenitoras que proliferan inicialmente, generan células hijas que se mantienen dentro de esta población (Figura 62). Dado que la marca de BrdU debería diluirse luego de sucesivas divisiones, su persistencia indica que las células

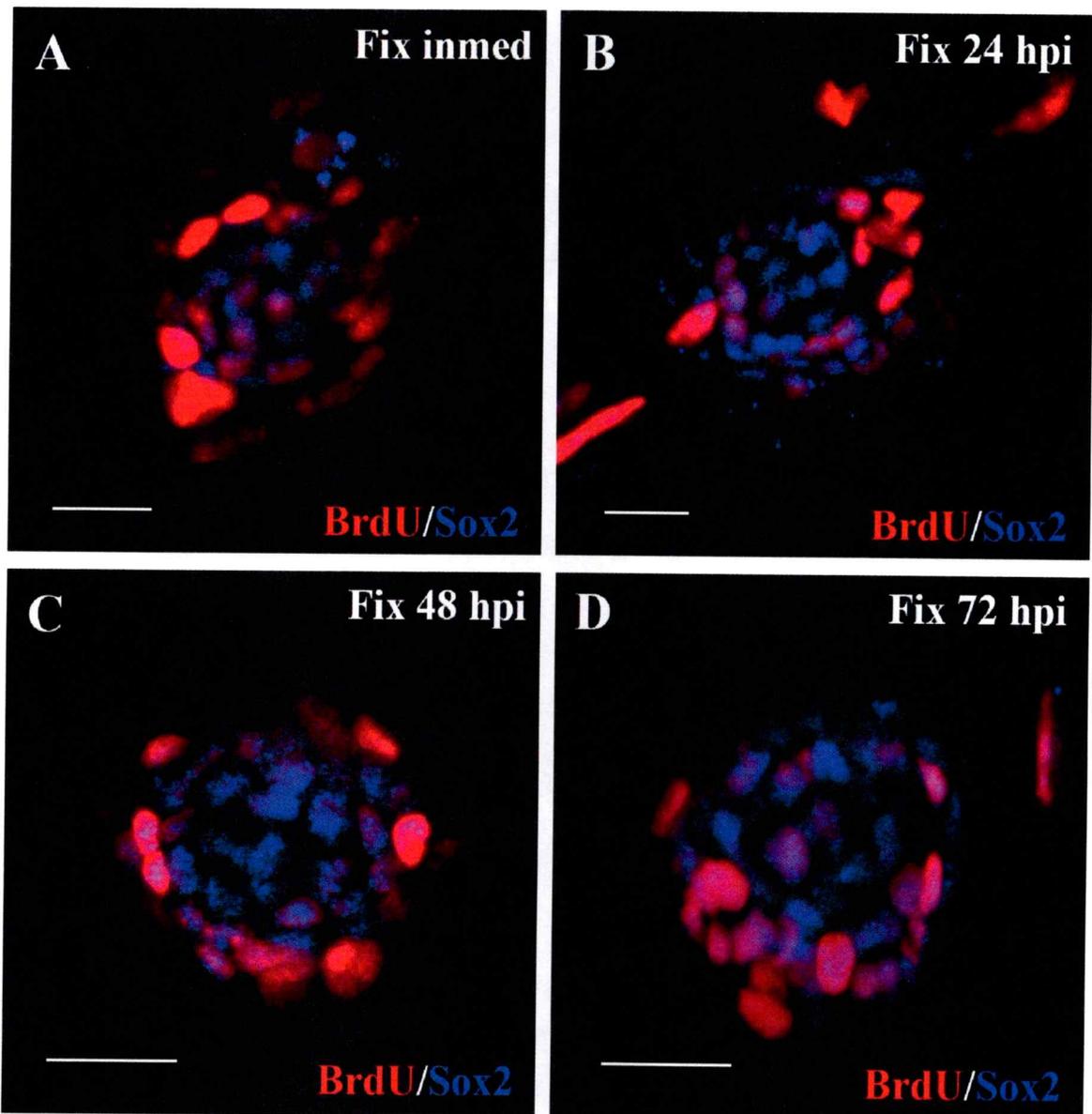
progenitoras no sufren un gran número de divisiones, aún después de repetidas rondas de daño y regeneración.



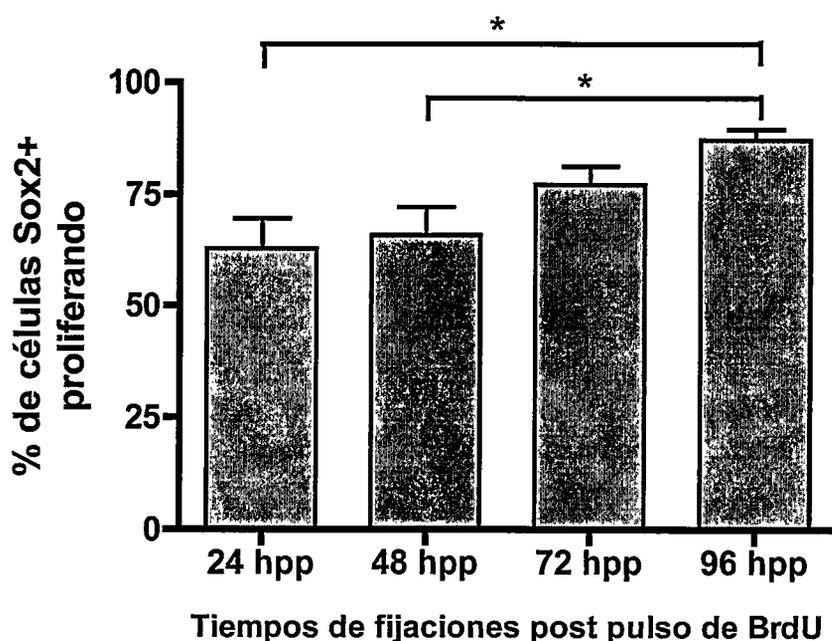
**Figura 62. Porcentaje de células progenitoras que mantienen la marca BrdU+ luego de sucesivas rondas de daño y regeneración.** Si bien se observa una tendencia hacia el aumento en la proporción de células progenitoras marcadas con el análogo, no existen diferencias significativas entre los distintos tiempos.

A continuación, cuantificamos la proporción de las células Sox2+ que presentan marca de BrdU, y por ende proliferaron en algún momento del pulso (Figura 63). A diferencia del gráfico anterior, esto nos entrega información acerca de la proporción de las células progenitoras neurales que sufrieron división en las 24 horas que siguieron al primer evento de daño, y que mantienen esta marca del análogo luego de daños consecutivos (Figura 64). Al analizar estos datos, podemos observar que, a medida que se repite el daño y regeneración, aumenta la proporción de células progenitoras

marcadas con el análogo (Figura 64). Estos resultados sugieren que existe una población de progenitores que se dividen durante el proceso regenerativo para dar origen a los diversos tipos celulares del neuromasto, pero que son capaces de perpetuarse para mantener la capacidad de regeneración. Además, indica que las células que expresan el marcador Sox2 pero que no proliferan durante la regeneración, podrían corresponder a células con algún grado de compromiso hacia alguno de los distintos linajes celulares que constituyen el neuromasto.



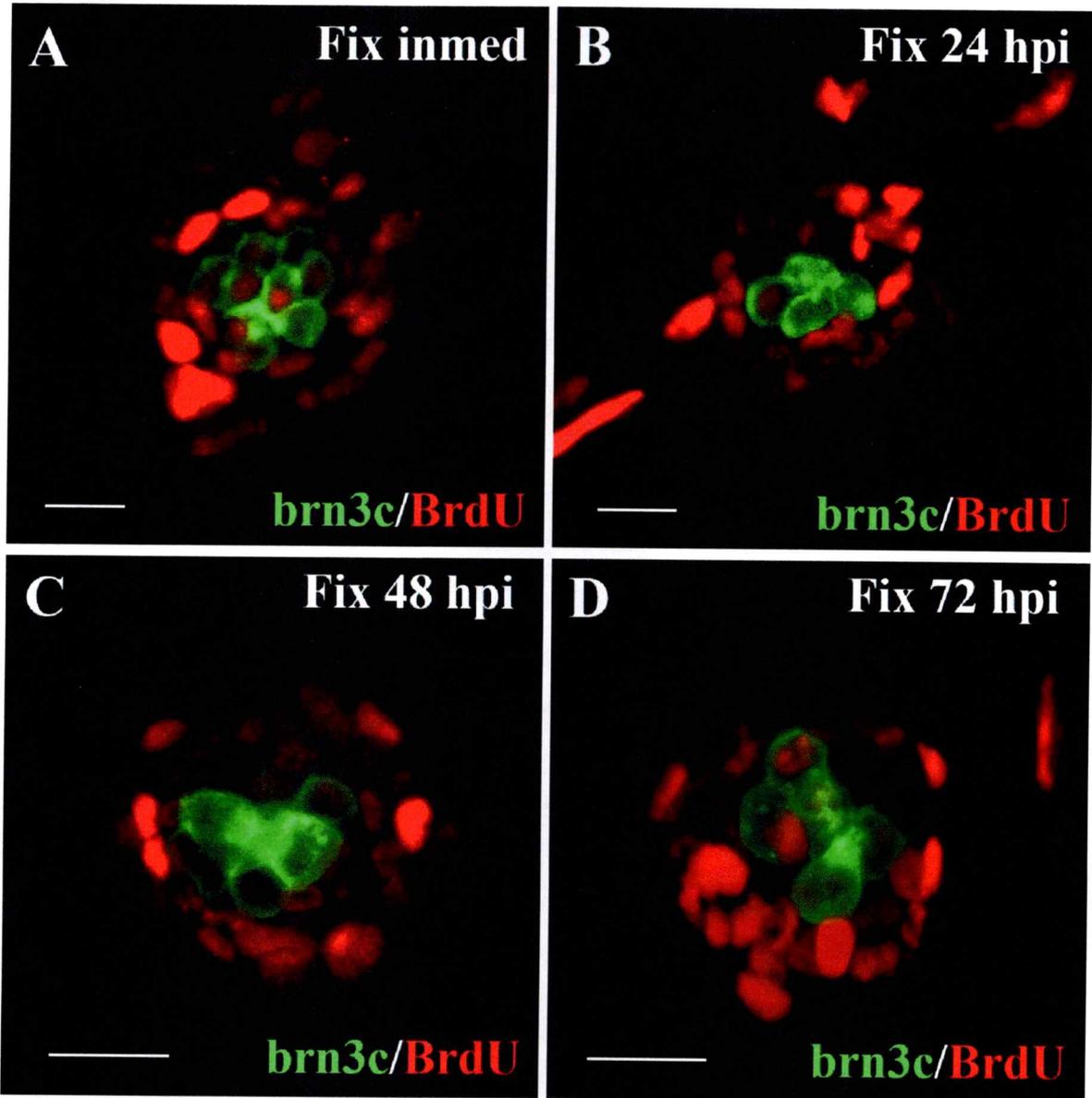
**Figura 63. Predominancia de progenitores mitóticos luego de sucesivas rondas de regeneración en neuromastos.** Larvas de 3 dpf fueron incubadas por 24 horas en BrdU luego de ser incubadas en sulfato de cobre para dañar los neuromastos. Las células que sufrieron mitosis en este período (marca nuclear roja) fueron analizadas 1, 2 y 3 días después, y comparadas con la marca de la proteína Sox2 (marca nuclear azul). Barra = 10  $\mu$ m.



**Figura 64. Rondas sucesivas de regeneración generan un aumento en la proporción de células progenitoras que sufrieron una ronda de proliferación previa.** Variación en la proporción de las células progenitoras post pulso de 24 horas de BrdU luego de varios ciclos de daño y regeneración. Se observa un aumento progresivo y significativo entre las 24-48 horas y las 96 horas post pulso de BrdU. ( $p > 0,05$ ).

Se efectuó un tercer análisis a partir de lo obtenido en este experimento. Se contabilizaron las células ciliadas y las células BrdU+ presentes en cada neuromasto en los tiempos analizados previamente. Se calculó el porcentaje de las células ciliadas regeneradas que nacen a partir de una mitosis luego de cada ciclo de daño con  $\text{CuSO}_4$  (Figura 65). Los valores porcentuales de las células ciliadas que poseen marca

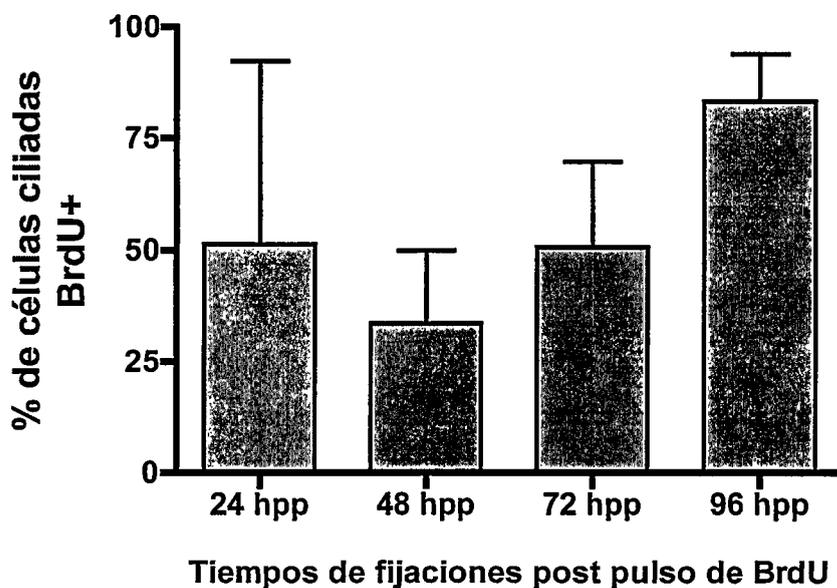
de BrdU en los distintos tiempos se observan en la Figura 66. Al comparar estas proporciones entre los distintos tiempos de análisis, no observamos diferencias significativas en el porcentaje de células ciliadas marcadas con BrdU, que varía entre un 50% y un 75% de ellas. Es posible concluir que las células ciliadas que mantienen la marca de BrdU, provienen de progenitores basales que incorporaron el análogo durante la primera fase regenerativa, progenitores que son capaces de dar origen a nuevas células ciliadas, repetidamente. Mas interesante es el caso de las células ciliadas que no incorporan BrdU. Ellas podrían provenir de precursores que no se dividieron durante la primera fase regenerativa o de precursores que sufrieron numerosas divisiones que diluyeron la marca de BrdU. Como tercera alternativa, podrían originarse por un proceso de transdiferenciación a partir de otros tipos celulares que, a su vez, provienen de progenitores que no se han dividido en la primera fase regenerativa. Sólo estudios detallados de linaje celular en el tiempo podrían resolver entre estas explicaciones tentativas.



**Figura 65. Un progenitor mitótico puede dar origen a células ciliadas luego de varias rondas de regeneración.** Imágenes de las células ciliadas (marcadas con GFP, verde) regeneradas luego de tres instancias de daño consecutivas en neuromastos incubados durante la primera fase regenerativa con BrdU (marca nuclear roja). Barra = 10  $\mu$ m.

Al analizar a las 48 y 72 horas post pulsos, vemos un claro aumento de las células ciliadas que presentan marca de BrdU, lo que se explicaría pues en estas circunstancias, el sistema hace uso rápido de sus células para dar abasto a la

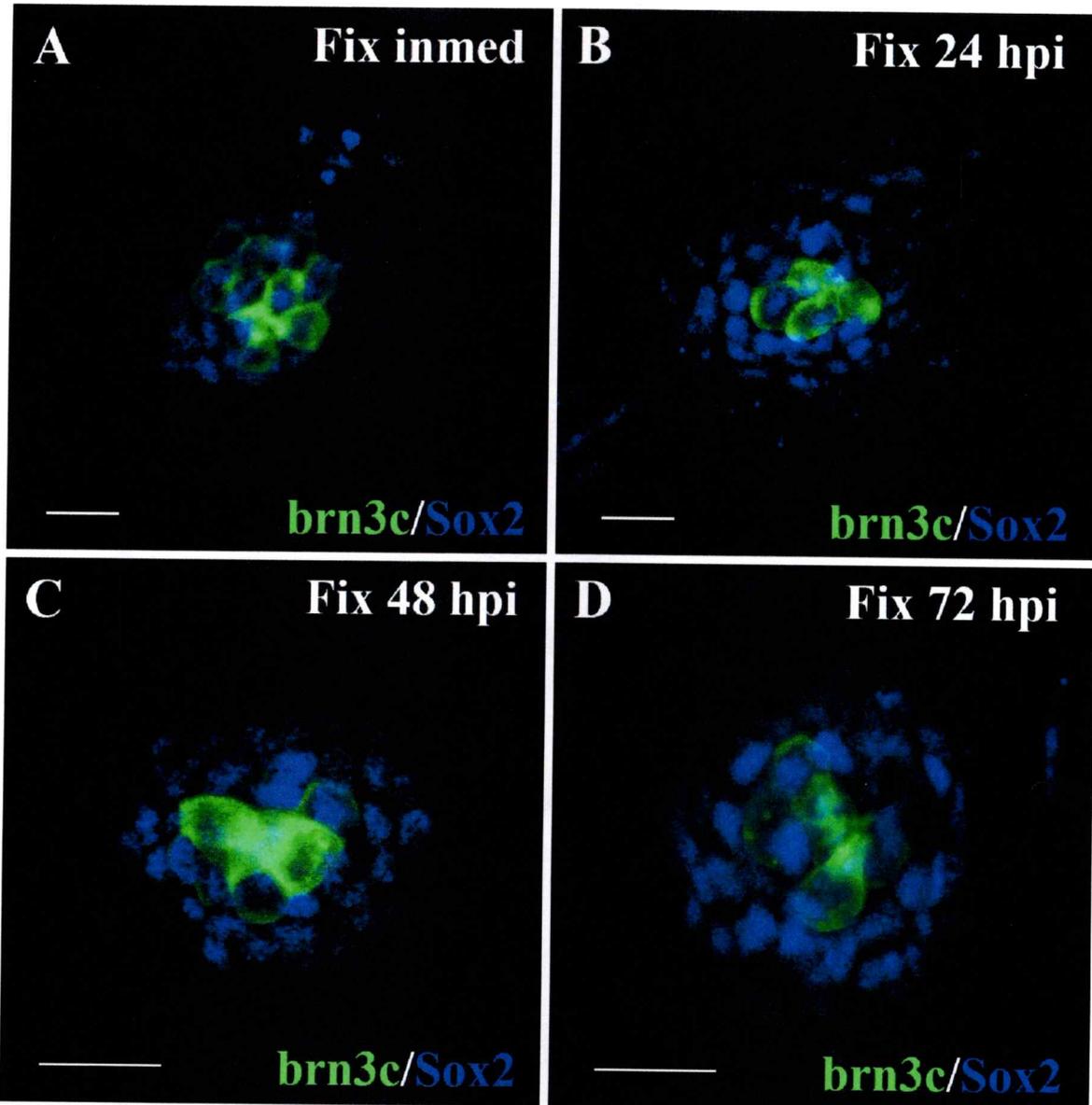
necesidad de regenerar rápidamente las distintas células, acelerando y acortando los procesos de diferenciación desde las células progenitoras hasta las células ciliadas, obteniéndose que las células ciliadas podrían provenir desde las células progenitoras que entran en diferenciación, y que fueron marcadas durante el pulso de BrdU inicial y, por la velocidad de proceso de regeneración en estas circunstancias, aún mantienen esta marca.



**Figura 66.** Las células ciliadas regeneradas en fases sucesivas de regeneración provienen de progenitores que sufrieron mitosis en una primera fase regenerativa. Se grafica el porcentaje de células GFP+ (células ciliadas en el transgénico *bm3c:mGFP*) marcadas con BrdU respecto del total de células GFP+. No se observaron diferencias significativas entre los distintos tiempos post pulsos de BrdU.

Los resultados obtenidos en el experimento en el cuál se indujeron eventos de regeneración reiterada, sugieren que las células ciliadas que se originan en los ciclos sucesivos de regeneración podrían provenir, en una proporción progresivamente

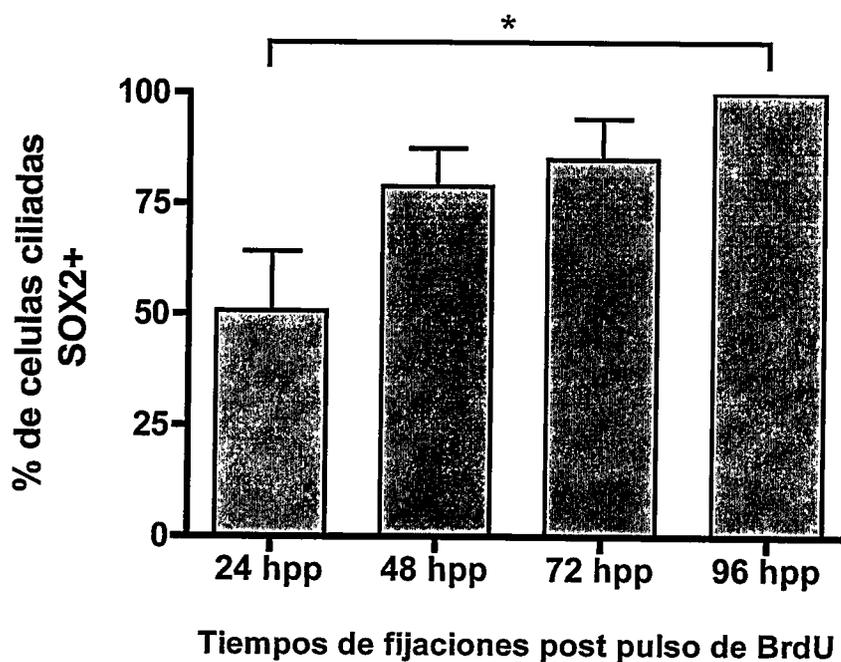
mayor, de la población de progenitores basales del neuromasto. Es decir, desde células mitóticas de la periferia del neuromasto que expresan proteínas de la familia SoxB1. Hipotetizamos que sería posible detectar los eventos de tránsito entre célula progenitora y célula ciliada diferenciada, mediante la colocación transitoria de la marca de las proteínas Sox y de marcadores de diferenciación, como fue descrito por Hernández y cols. (2007). Se observó que, efectivamente, algunas de las células ciliadas que regeneran mantienen la expresión del marcador del progenitor neural, en este caso, del marcador Sox2 (Figura 67). Más aún, se observa un aumento de la proporción de éstas células, respecto del total de ciliadas, a medida que transcurren más ciclos regenerativos (Figura 68).



**Figura 67. Detección del proceso de transición entre célula progenitora y célula ciliada diferenciada.** Neuromastos de peces *brn3c:mGFP* tratados sucesivamente con cobre y analizados para detectar la presencia de GFP (células ciliadas en verde) y de la proteína Sox2 (inmunofluorescencia en azul). Se indican los distintos tiempos de fijación (fix) post incubación en sulfato de cobre. Barra = 10  $\mu$ m.

Podemos observar que luego del primer daño con 10  $\mu$ M de  $\text{CuSO}_4$  y el pulso de 24 horas de BrdU, el número de células ciliadas que regeneran y mantienen la marca de Sox2 es un poco menos de la mitad, valor que contrasta con los datos

obtenidos en un estado no regenerativo del neuromasto (Objetivo 1), en el cual no se observó marca en las células ciliadas de ninguno de los marcadores de progenitores neurales utilizados. El porcentaje de células ciliadas que mantienen marca del anticuerpo anti-Sox2 aumenta progresivamente con cada ciclo de daño y regeneración, observándose luego del tercer ciclo de daño un 100% de correspondencia (Figura 68). De tal modo, se puede concluir que los ciclos de regeneración sucesivos e inmediatos, obligan a acelerar el proceso de transición progenitor-célula ciliada, logrando encontrarse algunas de ellas con marcadores de ambos estados.



**Figura 68. Incremento progresivo de células ciliadas que mantienen un marcador de célula progenitora durante ciclos reiterados de daño y regeneración. Se grafica el porcentaje de células ciliadas (GFP+) que presentan además expresión de Sox2+ respecto del total de células ciliadas, luego de distintos eventos de daño y regeneración. Se observa un aumento significativo entre los valores obtenidos 24 horas después del pulso de BrdU (50%), y aquel obtenido a las 96 horas post pulso de BrdU (100%). ( $p > 0,05$ ).**

## VI. DISCUSION

La regeneración en los animales es un fenómeno intrigante y ampliamente investigado desde tiempos muy remotos en una variedad de especies, que van desde protozoos hasta humanos. Conocer los mecanismos moleculares y celulares que ocurren durante este fenómeno es de gran importancia. Por ejemplo, entender porqué en ciertos procesos la regeneración es exitosa y en otros es pobre o casi nula. Esta información podría aportar datos relevantes para el tratamiento de una serie de enfermedades humanas, además de contribuir a comprender las diferencias entre distintos grupos animales.

Un aspecto que es común en la regeneración es la existencia en los organismos multicelulares de células troncales o células progenitoras capaces de reemplazar las células del tejido u órgano perdido o dañado. Para que ocurra la regeneración en vertebrados es necesario que se den ciertas condiciones: a) proliferación de células indiferenciadas, b) activación de células troncales/células progenitoras presentes en el tejido, y c) formación de nuevas células troncales/células progenitoras con capacidad de autorenovarse (Gurley y Sanchez-Alvarado, 2008).

El epitelio sensorial del oído interno de los vertebrados incluye la presencia de distintos tipos celulares: células ciliadas y células de soporte. La regeneración de las primeras, cuando ocurre, es mediada por la proliferación o transdiferenciación de las células de soporte (revisado por Brigande y Heller, 2009). La capacidad de las células ciliadas de regenerar esta íntimamente ligada a

las propiedades proliferativas de las células de soporte que le rodean. Esto implica que la pérdida de células ciliadas permite que las células de soporte cercanas se dividan y produzcan células hijas progenitoras de células ciliadas o que sencillamente se trans-diferencien a nuevas células ciliadas. Muchos vertebrados al parecer utilizan una combinación de estos mecanismos durante el proceso de regeneración (Brignull y cols., 2009). Es por esto que el estudio en sistemas modelo, como es la línea lateral del pez cebra, podría ser de gran utilidad para caracterizar y entender este fenómeno. Dada la similitud estructural del sistema mecanosensor de la línea lateral con el oído interno, lo accesible de sus órganos sensoriales (los neuromastos), que se encuentran superficialmente por todo el cuerpo del pez, la línea lateral del pez cebra ha emergido como un importante modelo para estudios de regeneración de células ciliadas.

## **6.1. Identificación molecular y celular de progenitores neurales en los neuromastos de la línea lateral**

El fenómeno de regeneración de las células ciliadas de la línea lateral del pez cebra y el hecho de que en ella se exprese el marcador neural Sox2 (Hernández y cols., 2007), fueron dos importantes antecedentes que nos motivaron a estudiar con más detalle la expresión de este gen y otros marcadores neurales en este sistema sensorial.

### **6.1.1 Expresión de genes característicos de progenitores neurales en el neuromasto, detectados por hibridación *in situ***

Las hibridaciones *in situ* llevadas a cabo en esta tesis, revelaron la expresión de genes considerados candidatos a expresarse en las posibles células progenitoras presentes en los neuromastos. Se encontró expresión de los genes *sox2*, *sox3*, *oct4* y *neogenina1* en los neuromastos de la línea lateral posterior. Los dos primeros genes pertenecen a la familia SoxB1, y funcionan como factores de transcripción claves para la mantención de las células madre neurales. Oct4 es otro factor de transcripción involucrado en la determinación de células madre embrionarias (ES cells), que posee un dominio POU, el cual puede interactuar con otros factores de transcripción que poseen dominios HMG, como aquellos que poseen los genes de la familia SoxB1, activando la transcripción de una variedad de genes diana (Botquin y cols., 1998, Nishimoto y cols., 1999). Neogenina1 es una proteína de transmembrana perteneciente a la familia de receptores de inmunoglobulinas, con un dominio extracelular homólogo al de miembros de la familia NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule, por su sigla en inglés). Se ha reportado que esta proteína está involucrada en la migración axonal, en procesos de morfogénesis y en sobrevivencia celular (Wilson y Key, 2007). Últimamente se ha detectado su presencia en precursores neurales con activa proliferación durante la corticogénesis de ratón (Fitzgeralds y cols., 2006). La expresión de este gen se observó en conjunto y como parte de la tesis doctoral del Dr. Luis Milla, del Laboratorio de la Dra. Verónica Palma.

Todos los genes referidos arriba están comprometidos en procesos de neurogénesis, ya sea manteniendo a las células troncales/progenitoras en ese estado e impidiendo su diferenciación, o bien actuando con otros cofactores regulando la expresión de genes diana para mantener la condición de progenitor

neural. Su expresión en la línea lateral del pez cebra nos indica que hay presencia de células con características de progenitores neurales, que nos podrían ayudar a explicar el fenómeno de regeneración observado en este sistema sensorial.

### **6.1.2 Expresión de marcadores de progenitores neurales detectados en el neuromasto por inmunohistoquímica**

Si bien la hibridación *in situ* nos otorga un dato cualitativo sobre la expresión génica, no nos permite observar de forma detallada la ubicación exacta en el neuromasto de las células que lo componen y que expresarían tal o cual mRNA. Tampoco es posible hacer un análisis cuantitativo para determinar los niveles de expresión del gen en distintos contextos dentro de la población de células en los neuromastos de la línea lateral del pez cebra. Es por esto que nos focalizamos en encontrar anticuerpos específicos para marcadores de progenitores neurales, que en conjunto con las líneas transgénicas disponibles en nuestro laboratorio, nos permitieran observar con más detalle la expresión y ubicación de estos marcadores en los neuromastos.

Mediante inmunohistoquímica se observó la expresión de las proteínas Sox2, Sox3 y del conjunto de las proteínas de la familia SoxB1 con el anticuerpo PANSox. Existe marcación específica con estos tres anticuerpos en la gran mayoría de las células que forman el primordio migratorio de la línea lateral posterior. No se observó una expresión diferenciada en alguna zona específica del primordio. Este patrón de expresión sería totalmente acorde al hecho de que a partir del primordio se forman todas las células del sistema de la línea lateral posterior, incluyendo las células interneuromásticas. Por lo tanto, las células del

primordio deberían necesariamente tener características de células troncales/progenitoras con cierta multipotencialidad para dar origen a todos los linajes celulares presentes en este sistema sensorial.

Una característica que se apreció en la inmunohistoquímica para estos marcadores es que se vio su expresión en las células interneuromásticas presentes entre cada neuromasto, lo cual es acorde con el hecho que a partir de ellas se forman en etapas posteriores del desarrollo, neuromastos adicionales (llamados intercalares), pues la línea lateral esta en constante crecimiento y renovación a lo largo de la vida del pez (Grant y cols., 2005). Por lo tanto, la expresión de marcadores de progenitores neurales es concordante con la presencia de células que tienen la capacidad de proliferar y diferenciarse para generar nuevos componentes y permitir el crecimiento de este sistema sensorial a través del cuerpo del pez.

### **6.1.3 La expresión de GFP en la línea transgénica *sox3h7:GFP* identifica progenitores y células de soporte en el neuromasto.**

Se analizó la expresión de GFP en las células de la línea lateral de la línea transgénica *sox3h7:GFP*. Esta línea fue generada con un enhancer, el h7, del gen SOX3 humano (Navratilova y cols., 2009), por lo que no contiene todos los elementos regulatorios necesarios para la expresión de este gen. De los diversos enhancers probados en peces transgénicos, solo éste generó expresión de GFP en la línea lateral. Si bien, la expresión de la proteína reportera coincide en parte con las células marcadas con el anticuerpo anti-Sox3, existen diferencias de expresión importantes. En el primordio migratorio, la expresión de GFP en peces

transgénicos es más intensa en la parte posterior, y casi indetectable en las células más anteriores (anterior y posterior se refiere a la dirección de migración del primordio). En cambio, la proteína Sox3 se distribuye de manera homogénea en todo el primordio.

La diferencia de expresión entre ambos marcadores también se puede observar en los neuromastos maduros, ya que el GFP se aprecia con menor intensidad en células basales periféricas, y mucho mayor en las zonas centrales de los neuromastos. En cambio, la proteína Sox3, se expresa de manera inversa, siendo más intensa la cantidad de proteína en las células periféricas, presumiblemente las progenitoras. Tomando en cuenta ambos hallazgos, es posible concluir que la expresión de GFP sufre un retraso respecto a la expresión endógena del gen *sox3*. Es sabido que la visualización de GFP bajo iluminación fluorescente requiere la acumulación de una cantidad considerable de proteína, a niveles mucho mayores de los necesarios para detectar una proteína expresada en bajos niveles mediante inmunohistoquímica. Pensamos que el transgen responde de la misma manera que el gen *sox3* de pez cebra endógeno, pero que el GFP se hace visible en estas células muchas horas después de la activación transcripcional del transgen y a tiempos en los cuales la expresión de Sox3 ya está en disminución. A pesar de esta dificultad en el uso de la línea transgénica, ésta ha resultado fundamental para los análisis realizados en esta tesis por dos razones. Primero, ha permitido describir una nueva población celular en el neuromasto, las células de soporte (ver siguiente sección). Segundo, dado que GFP marca células que han expresado el marcador de progenitor neural Sox3 en su historia reciente, nos permitió seguir en tiempo real el desarrollo de las células

derivadas de estos progenitores, incluyendo las mismas células de soporte y las células ciliadas. El nivel de confianza alcanzado en varias de nuestras conclusiones se debe a que muchos de los experimentos realizados se pudieron hacer con video microscopia en tiempo extendido usando esta cepa transgénica.

#### **6.1.4 Identificación y caracterización de las células de soporte**

La línea transgénica *sox3h7:GFP* ha permitido identificar y diferenciar de forma precisa las células de soporte que rodean a las células ciliadas de los neuromastos. Las células de soporte en neuromastos de larvas transgénicas expresan GFP en su citoplasma, permitiendo observar la morfología celular en forma de copa que rodea basal y lateralmente a las células ciliadas. La identificación de las células de soporte nos ha permitido diferenciar claramente éstas de las células basales del neuromasto, que expresan los marcadores de progenitores neurales analizados en esta tesis, y que proponemos son las células troncales de este sistema (Figura 69 y 70).

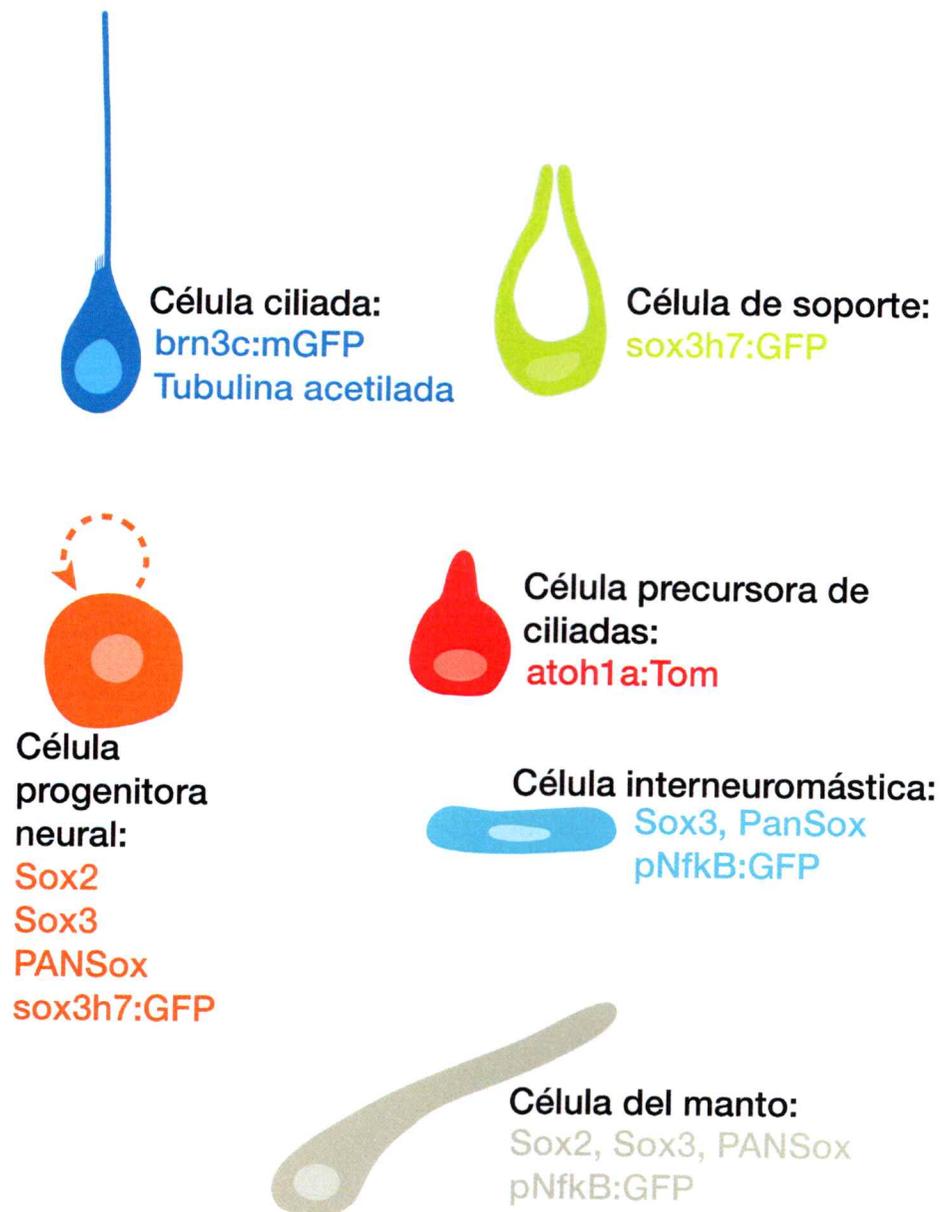
#### **6.1.5 La expresión de GFP identifica a las células del manto en peces transgénicos *pnfkb:GFP***

La línea transgénica *pnfkb:GFP* se construyó usando elementos de respuesta del factor transcripcional NFkB, proteína clave en diversas respuestas celulares que incluyen la respuesta inmune (Kanter y cols., 2011). La expresión de GFP en las células del manto de los neuromastos de estos peces es interesante, pues su presencia se explicaría por la capacidad de estos últimos de

montar una rápida respuesta inmune al experimentar algún tipo de daño o infección. En nuestro laboratorio se ha descrito en neuromastos la expresión de numerosas proteínas relacionadas con la inmunidad (tesis doctoral de Claudia D`alençon, 2012) y la infiltración masiva de neutrófilos y macrófagos luego de un daño inducido por  $\text{CuSO}_4$  (D`alençon y cols., 2010).

La coexpresión de proteínas como Sox2 o Sox3 en las células del manto (determinadas por co-expresión con GFP en este transgénico), indicaría que estas células también podrían tener una cierta potencialidad para diferenciarse en otros tipos celulares, evento que no se alcanzó a probar en esta tesis. Alternativamente, es posible que la expresión de Sox2 y Sox3 indique que las células mantienen la presencia de las proteínas luego de diferenciarse a partir de progenitores que expresaban estos marcadores previamente. Un experimento interesante consistiría en seguir con video microscopía las células GFP+ de este transgénico en un contexto regenerativo, dañando los neuromastos y viendo si alguna de las nuevas células provienen de las células del manto.

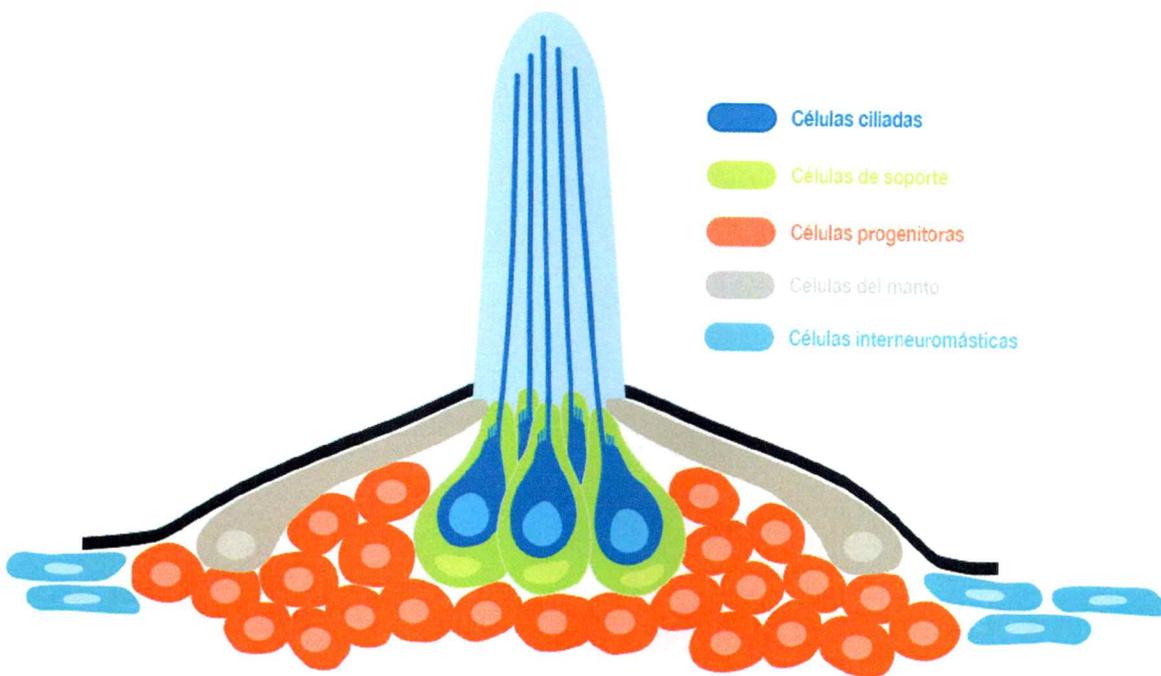
A partir de los resultados obtenidos en esta tesis, se ha podido determinar que los distintos tipos celulares que componen los neuromastos de la línea lateral del pez cebra son generados a partir de progenitores neurales que expresan marcadores de la familia SoxB1, proteínas que se expresan en el primordio migratorio, y permanecen en los neuromastos maduros. El grupo de marcadores descritos en esta tesis, a permitido identificar molecularmente los distintos tipos celulares que componen el neuromasto, sumado a la batería de marcadores previamente descritos y que se muestran de manera conjunta en la Figura 69.



**Figura 69.** Esquema que muestra los distintos tipos celulares encontrados y analizados en esta tesis, los genes o proteínas que expresan, y las líneas transgénicas que los marcan con proteínas fluorescentes.

El conjunto de los análisis realizados también nos ha permitido describir en el neuromasto, la existencia de un código de marcadores que definen distintas

poblaciones celulares, previamente no caracterizadas en el neuromasto, como la población que expresa marcadores de células progenitoras neurales. De tal modo, pensamos que existen progenitores de distinta potencialidad que son distinguibles de las células de soporte, las cuales tendrían un rol estructural y funcional en el neuromasto. Se propone, con estos resultados, la elaboración de un esquema nuevo que describe más precisamente estas distintas poblaciones celulares, y que es presentado en la Figura 70.



**Figura 70. Esquema que ilustra los diversos tipos celulares en neuromastos de la LLP.** Tipos celulares encontrados en esta tesis, y que describe de manera más precisa y funcional, la variedad celular encontrada en los neuromastos. Se describen 5 tipos celulares, sus distintas morfologías y distribuciones en un neuromasto maduro.

## **6.2. En el neuromasto existen células con características de progenitores neurales.**

Previamente en nuestro laboratorio, se había descrito la presencia de células que expresan marcadores de progenitores neurales en la base del neuromasto y que éstas poseían la capacidad de proliferar (Hernández y cols., 2007) . Nos interesó evaluar aquí la capacidad de estas células de auto renovarse y de poder dar origen a los tipos celulares observados en los neuromastos. Con ello, podríamos resolver la incógnita respecto al origen de las nuevas células ciliadas que aparecen durante la regeneración de los neuromastos.

### **6.2.1. Capacidad ilimitada de regeneración de las células ciliadas en neuromastos**

Se sometieron larvas a varios ciclos de regeneración de células ciliadas, usando un protocolo estandarizado de tratamientos con  $\text{CuSO}_4$ . Mediante el uso de marcadores o tinciones vitales confirmamos que la metodología empleada generaba daño específico en las células ciliadas, y de soporte o progenitoras.

Larvas transgénicas con marca específica en las células ciliadas (para poder monitorear la eliminación y regeneración de ellas), fueron sometidas a varios ciclos de regeneración, llegando a obtenerse hasta 4 ciclos seguidos en que se observó regeneración de células ciliadas. Al hacer el análisis cuantitativo y contar las células ciliadas originadas luego de cada ciclo, se observó que el número de éstas no siempre alcanzaba a llegar al número total de ciliadas encontradas en larvas controles no tratadas del mismo estadio. Si bien, en el

primer ciclo, se alcanza el número normal de células ciliadas 48 horas post daño, para los demás ciclos, este tiempo no fue suficiente para alcanzar el número de células ciliadas presentes en los controles. Posiblemente, y observando la tasa de regeneración de las células ciliadas, se hubiera alcanzado el número control extendiendo el tiempo de recuperación entre cada evento de daño.

Este experimento nos permitió comprobar que la capacidad regenerativa esta presente de forma robusta en este sistema. Además, la regeneración depende de células presentes en el mismo neuromasto, ya que al eliminar completamente las células de este, no se observa regeneración (Hernández et al., 2007; resultados no mostrados)

### **6.2.2. Destino de las células que proliferan durante la migración del primordio de la línea lateral**

Al analizar la proliferación celular en el primordio migratorio se comprobó que ésta ocurre en mayor proporción en la zona anterior del mismo, lo que concuerda con el resultado de otros autores (Laguerre y cols., 2005) y de nuestro laboratorio (Leonardo Valdivia, Tesis de Doctorado, 2011). También se detectó proliferación en los proneuromastos a punto de ser depositados, y en las células interneuromásticas que son depositadas por el primordio migratorio entre cada proneuromasto. Al realizar pulsos de BrdU y luego inmunohistoquímica sin tiempo de caza, encontramos que la mayoría de las células en proliferación expresan proteínas de la familia SoxB1, tanto en el primordio como en los neuromastos ya maduros.

En el caso de los neuromastos maduros, las células que expresan marcadores neurales y que están proliferando son bastante pocas, no llegando a ser más de 4-6 células por neuromasto, lo que indicaría una baja tasa proliferativa de estas células en un contexto de desarrollo normal. Al dar un pulso de BrdU en estadios más tempranos (cuando el primordio aún está migrando) y analizando las muestras 24 horas después del pulso, el número de células BrdU+ en un neuromasto aumenta a casi el triple, disminuyendo el número a las 48 y 72 horas posteriores al pulso. Al analizar el destino de las células que proliferaron en el primordio se aprecia colocación de BrdU con marcadores de progenitores neurales, de entre un 70% hasta cerca de un 95% de las células BrdU+. Si bien, las células que proliferan en el primordio se dividen y disminuyen en número con el tiempo, se observa que las células que persisten con la marca de BrdU en los neuromastos son mayoritariamente progenitores neurales, dándonos un indicio de la posible presencia de células troncales, que mantienen esa condición en los neuromastos maduros. El resto de las células marcadas originalmente perderían la marca por dilución, lo que sugeriría que son células progenitoras con una alta tasa de proliferación.

Otra característica observada es que a medida que progresa la maduración del neuromasto, las células que proliferan en el primordio, se ubican inicialmente en posiciones periféricas del neuromasto y en etapas posteriores adoptan posiciones más centrales en el órgano. Esto nos indicaría que las células que se originan en el primordio por división celular siguen un tránsito que las lleva desde un estado indiferenciado en la base y periferia del neuromasto, hacia destinos celulares diferenciados más centrales.



### **6.2.3. Capacidad de autorenovación de las células troncales del neuromasto.**

Otra característica importante que deben tener las presuntas células troncales neurales es que presenten autorenovación. Para esto se realizaron experimentos de pulsos de BrdU, caza de varios días, e inmunohistoquímica para detectar la incorporación de BrdU y marca de fosfo-histona 3. Se encontró que la mayoría de las células que incorporaron BrdU se mantienen proliferando, desde un 100% a las 24 horas post pulso, hasta cerca del 90% a las 72 horas posteriores al pulso. Esta proporción de células que se mantienen proliferando baja a alrededor de un 40% al analizar y contar las células 1 semana post pulso, aunque la marca de BrdU es más débil que aquella observada a las 24, 48 y 72 horas post pulso. Este resultado sugiere que las células que proliferan en los neuromastos, y que en su gran mayoría expresan proteínas propias de progenitores neurales, pueden entrar en ciclo celular reiteradamente, en una importante fracción de los casos, varios días después de la división anterior. Aquellas células que proliferan por segunda vez luego de 1 semana post incorporación de BrdU, presentan un ciclo relativamente lento (comparado con la tasa de recambio de células ciliadas en un neuromasto por ejemplo), aspecto que calza con las características que poseen las células troncales y que sustentan la hipótesis de que participan en la homeostasis del neuromasto en condiciones normales y regenerativas.

### **6.2.4. Evidencias de la multipotencialidad de las células troncales del neuromasto.**

Una de las características cruciales de una célula troncal/progenitora neural es su multipotencialidad, rasgo que intentamos poner en evidencia para las células

candidatas a troncales descritas en esta tesis. Demostrar esta cualidad fehacientemente resultó imposible en este trabajo por dos razones principales: no contamos con una buena batería de marcadores para todos los tipos celulares diferenciados y que puedan ser usados en combinación unos con otros. En segundo lugar, y siendo la limitación más seria, no contamos con un buen sistema para hacer estudios de linaje celular, en que fuera posible marcar células de origen conocido y seguir su destino inequívocamente hasta el estado de diferenciación terminal. Para esto último, será necesario desarrollar estrategias de marcaje genético irreversible, como aquellas ofrecidas por el sistema Cre-loxP que genera recombinaciones genéticas que perduran por la vida de la célula a partir del momento en que se inducen.

Recurrimos en este trabajo a varias herramientas para demostrar multipotencialidad indirectamente. Las células GFP positivas en el transgénico *sox3h7:GFP* incluyen las células de soporte de los neuromastos, pero además se marcan con la proteína fluorescente células basales y periféricas, que co-expresan marcadores de progenitores neurales. Si bien, no todas las células categorizadas como progenitores (SoxB1) expresan GFP en los peces transgénicos, esto se debe a la demora en la aparición de GFP respecto a la inducción del enhancer *h7* de *sox3*, como fue discutido anteriormente. De manera análoga, la marca de GFP en las células de soporte se debe a que mantienen el GFP por un tiempo que se extiende más allá del periodo de expresión del enhancer, por estabilidad de la proteína reportera. Al dañar las células de soporte con sulfato de cobre y observar su regeneración, determinamos que las células GFP+ remanentes (progenitores), dan origen a las nuevas células de soporte. Por lo tanto, concluimos que las

células progenitoras SoxB1+ del neuromasto pueden dar origen a las células de soporte, uno de los tipos celulares diferenciados del neuromasto. Para robustecer más esta conclusión, sería ideal contar con un marcador específico de las células de soporte, ya que en este trabajo, solo hemos podido describirlas morfológicamente gracias a la fuerte expresión de GFP que poseen en la línea *sox3h7:GFP* cuando adquieren una posición medial y adjunta a las células ciliadas en el neuromasto.

Una segunda aproximación para definir la multipotencialidad de las células troncales o progenitoras del neuromasto, fue posible gracias a la obtención de la línea transgénica *atoh1a:Tom*, en la cual se marcan con proteína fluorescente roja (*Tomato*), las células precursoras inmediatas a las células ciliadas (Wibowo y cols., 2011; esta tesis). El gen *atoh1a* (*atoh1a*) es un factor de transcripción proneural que controla la especificación y diferenciación de las células ciliadas del oído en vertebrados y línea lateral en peces (Millimaki y cols., 2007; revisado por Cotanche y Kaiser, 2010). Se ha estudiado intensamente su función ya que es un gen capaz de inducir transdiferenciación de células de soporte en la cóclea de mamíferos y generar nuevas células ciliadas (Gubbels y cols., 2008), incluso rescatando un fenotipo de sordera (Izumikawa y cols., 2005). Además, se sabe que es un factor de función antagónica a la de los genes de la familia SoxB1, ya que se reprimen mutuamente a nivel transcripcional (Sweet y cols., 2011). Si bien *atoh1a* promueve la salida del ciclo celular, se sabe que su expresión en precursores de células ciliadas coincide con la última división celular que origina dos células ciliadas, aspecto reflejado perfectamente con la expresión de *Tomato* en la línea transgénica *atoh1a:Tom* (Wibowo y cols., 2011; esta tesis).

De tal modo, esta línea puede ser usada para detectar a los precursores de células ciliadas y cotejar este marcador transgénico con la expresión de proteínas SoxB1 y con la marca generada en la línea *sox3h7:GFP*.

Al inducir un proceso regenerativo en los neuromastos de peces *atoh1a:Tom*, observamos que la aparición de células que expresan Tomato ocurre en células que aún expresan la proteína Sox2. Asimismo, combinando los transgénicos *atoh1a:Tom* con la línea *sox3h7:GFP*, pudimos, en experimentos de video microscopía *time lapse*, observar la transición de precursor a célula ciliada mediante la transformación de una célula GFP+ a una *Tomato+*. Sin embargo. Se observaron al menos cuatro eventos distintos en cuanto al comportamiento mitótico de las células GFP+/Tomato+ que reflejan un grado de complejidad mayor al esperado. Los eventos fueron: a) células que expresan ambas proteínas fluorescentes se dividen simétricamente y mantienen la expresión de ellos; b) células que expresan ambas proteínas fluorescentes, se dividen simétricamente, obteniéndose dos células hijas que expresan ambos marcadores, como en el caso anterior, pero que son rodeadas por células GFP+ con morfología de células de soporte; c) a partir de dos células que expresan ambas proteínas fluorescentes, una de ellas entra en división simétrica originando dos células que expresan ambos marcadores, pero que luego pierden el GFP y mantienen solo la expresión de *Tomato*. La otra célula original se mantiene indivisa y expresa ambos marcadores; d) una célula que expresa solo *Tomato* y que no se divide, es rodeada por una célula GFP+, que adopta la ubicación y morfología de una célula de soporte.

Para confirmar que las células *Tomato+* dan origen a las células ciliadas se utilizó peces doble transgénicos *brn3c:mGFP/atoh1a:Tom*, con lo cual pudimos apreciar en forma inequívoca que las nuevas células ciliadas diferenciadas (GFP+) provienen de las presuntas células precursoras inmediatas (*Tomato+*). Estas células precursoras se dividen para dar origen a dos células que mantienen la expresión de *Tomato*, pero que adquieren la expresión de la proteína GFP en su membrana, señal proveniente del transgen *brn3c:mGFP*. Como se indicó anteriormente, la expresión de GFP en esta línea corresponde a células ciliadas diferenciadas y maduras en los neuromastos de la línea lateral.

Esta serie de experimentos permite describir las etapas que suceden durante el proceso de regeneración en un neuromasto que ha sufrido daño en sus células más superficiales, como son las células ciliadas y las células de soporte. Por un lado, células progenitoras, mitóticamente activas, que expresan proteínas de la familia SoxB1, son capaces de diferenciarse hacia células de soporte. Por otro lado, estos progenitores pueden adoptar el destino de célula ciliada, pasando por un precursor intermediario marcado por la expresión del gen proneural *atoh1a* (reflejado en el transgénico *atoh1a:Tom* por la expresión de la proteína fluorescente *Tomato*), que sufre una mitosis simétrica para generar dos células ciliadas que se diferencian y maduran (reflejado en el transgénico *brn3c:GFP* por la expresión de GFP). Finalmente se obtienen dos células ciliadas adyacentes que adquieren polaridad planar en un mismo eje de orientación del kinocilio en formación, pero especulares entre si (López-Schier y cols, 2006). Posteriormente estas dos células toman una posición más apical en el neuromasto y maduran, a la par con la asociación que adquieren con células de soporte.

### **6.2.5. la regeneración repetida permite inducir una fuerte reacción proliferativa en el neuromasto.**

Una vez puesto en evidencia la presencia de progenitores neurales y su participación en la regeneración de las distintas poblaciones celulares en los neuromastos, se analizó la dinámica de proliferación normal versus aquella que ocurre al someter al sistema a varias rondas consecutivas de daño y regeneración.

Al marcar las células que proliferan normalmente en un neuromasto, realizar un daño y observar el destino de las células derivadas de ellas luego de la regeneración, se determinó que un número importante de ellas se mantiene dentro de la población de progenitores, ya que expresan proteínas de la familia SoxB1 (un 30% de la población incorpora BrdU y se mantiene como tal durante al menos tres días luego de un daño al neuromasto). Este resultado sugiere que hay una población estable de progenitores que sufren división celular limitada durante el proceso regenerativo, posiblemente células troncales.

Si bien el hecho de observar que la mayoría de las células que proliferan durante la regeneración son progenitores, su dinámica no había sido determinada, encontrándose que al forzar reiteradamente el sistema a regenerar, éste rápidamente se adapta.

A continuación, nos interesó determinar si un neuromasto forzado a regenerar repetidamente mostraría un cambio en el comportamiento de las células progenitoras o en la forma en que se repondrían las nuevas células diferenciadas del neuromasto. Primero, encontramos que la gran mayoría de las células que proliferan post daño, expresan el marcador de progenitores neurales Sox2, es decir, no salen de esta población que proliferó en las 24 horas post daño. Es

posible presumir que una fracción de las células que se dividieron, en esta primera fase, han transitado por las distintas etapas conducentes a la diferenciación. A medida que el sistema se somete a más rondas de daño (desde la segunda ronda de regeneración), casi un 100% de las células que proliferaron post daño poseen marca de progenitor neural, manteniéndose esta característica en todos los tiempos posteriores de observación.

Fue interesante constatar que no todas las células progenitoras (identificadas por la expresión de Sox2), ni aún bajo el proceso repetido de daño y regeneración, muestran una conducta proliferativa. Aunque se ve disminución en el número de progenitores no proliferativos al hacer ciclos reiterados de daño, ellas persisten, lo que podría dar cuenta de una “reserva” de progenitores que no participan del proceso (a excepción de encontrarse frente a un daño mayor como sería la pérdida de un gran número de células del neuromasto), o a células que cumplen una función particular que no incluye el proceso regenerativo (por ejemplo, en la conservación del nicho troncal o en la asociación de los neuromastos con los procesos neuronales que inervan las células ciliadas).

Al analizar las células ciliadas en el contexto de rondas continuas de regeneración, se observa que alrededor de la mitad de las células ciliadas poseen marca de BrdU 24 horas post daño con CuSO<sub>4</sub>, lo cual sería coherente con el hecho de que las células ciliadas provienen de precursores mitóticos. La fracción de células ciliadas que no poseen marca de BrdU, podrían provenir de eventos de transdiferenciación, sobre todo en el primer ciclo de regeneración, pues ha sido descrita como una de las formas de reemplazar a las células ciliadas perdidas, en otros vertebrados (Roberson y cols., 2004; Duncan y cols., 2006). Sin embargo, es

probable también que provengan de precursores inmediatos post mitóticos, o que al menos, han pasado por la fase S del ciclo celular, como ha sido descrito previamente (Hernández y cols., 2007). Estos precursores expresan el gen proneuroal *atoh1a*, y serían células detenidas en G2 que pueden sustituir rápidamente a las células ciliadas perdidas entrando en mitosis simétrica y originando dos células ciliadas.

Consistente con esta hipótesis, el número de células ciliadas marcadas con BrdU disminuye con los ciclos consecutivos de regeneración, probablemente por la desaparición de los precursores postmitóticos y el requerimiento de nuevos precursores a partir de los progenitores troncales del neuromasto. Como confirmación adicional de este proceso acelerado de regeneración, se observó que las células ciliadas diferenciadas mantienen por algunas horas la presencia de proteínas SoxB1 y la marca de GFP en transgénicos *sox3h7:GFP*, y que la proporción de células con doble marca aumenta progresivamente con cada ciclo de daño y regeneración.

Estos resultados arrojan, como conclusión, que las células ciliadas regeneradas, en un proceso de daño intenso y reiterativo, provienen de progenitores neurales que responden proliferando y transitando rápidamente por los estados intermediarios para llegar al estado diferenciado. Sugerimos que, de existir otros mecanismos de regeneración como la transdiferenciación, estos ocurrirían durante procesos menos severos, tal vez durante el reemplazo paulatino de células ciliadas individuales que se recambian naturalmente en el neuromasto. De tal modo, estaríamos frente a un órgano que presenta plasticidad regenerativa, con dos mecanismos distintos de reparación. Debemos sumar también, el

fenómeno de regeneración que ocurre a nivel del órgano completo. La línea lateral es capaz de regenerar en el tejido dañado de adultos, por ejemplo, cuando se remueve la aleta caudal, esta regenera junto con el órgano mecanosensorial (Seminario de título de Camila Mardones, 2010). En este caso, células de los neuromastos sobrevivientes (suponemos, progenitores que expresan SoxB1), adquieren propiedades migratorias, colonizan zonas desprovistas de neuromastos y pueden formar nuevos órganos funcionales. Esta capacidad extraordinaria de autoreparación probablemente este relacionada al hecho que la línea lateral está muy expuesta al medio ambiente y es un sistema crucial para la sobrevivencia del pez.

### **6.3. Comparación de la regeneración en los neuromastos con aquella observada en otros organismos.**

La transdiferenciación de las células de soporte para dar origen a parte de las nuevas células ciliadas ha sido observada en el oído del pez cebra, donde hay transdiferenciación de algunas células de soporte a células ciliadas, sin mediar división celular (Millimaki y cols., 2010). En pollos también se ha visto que al menos un tercio de las nuevas células ciliadas que regeneran post daño, lo hacen a partir de la transdiferenciación de células de soporte (Roberson y cols., 2004; Duncan y cols., 2006). La transdiferenciación de las células de soporte se ha considerado como un proceso que permite reemplazar células ciliadas de forma rápida en una primera instancia, cuando el daño no es masivo y por lo tanto se

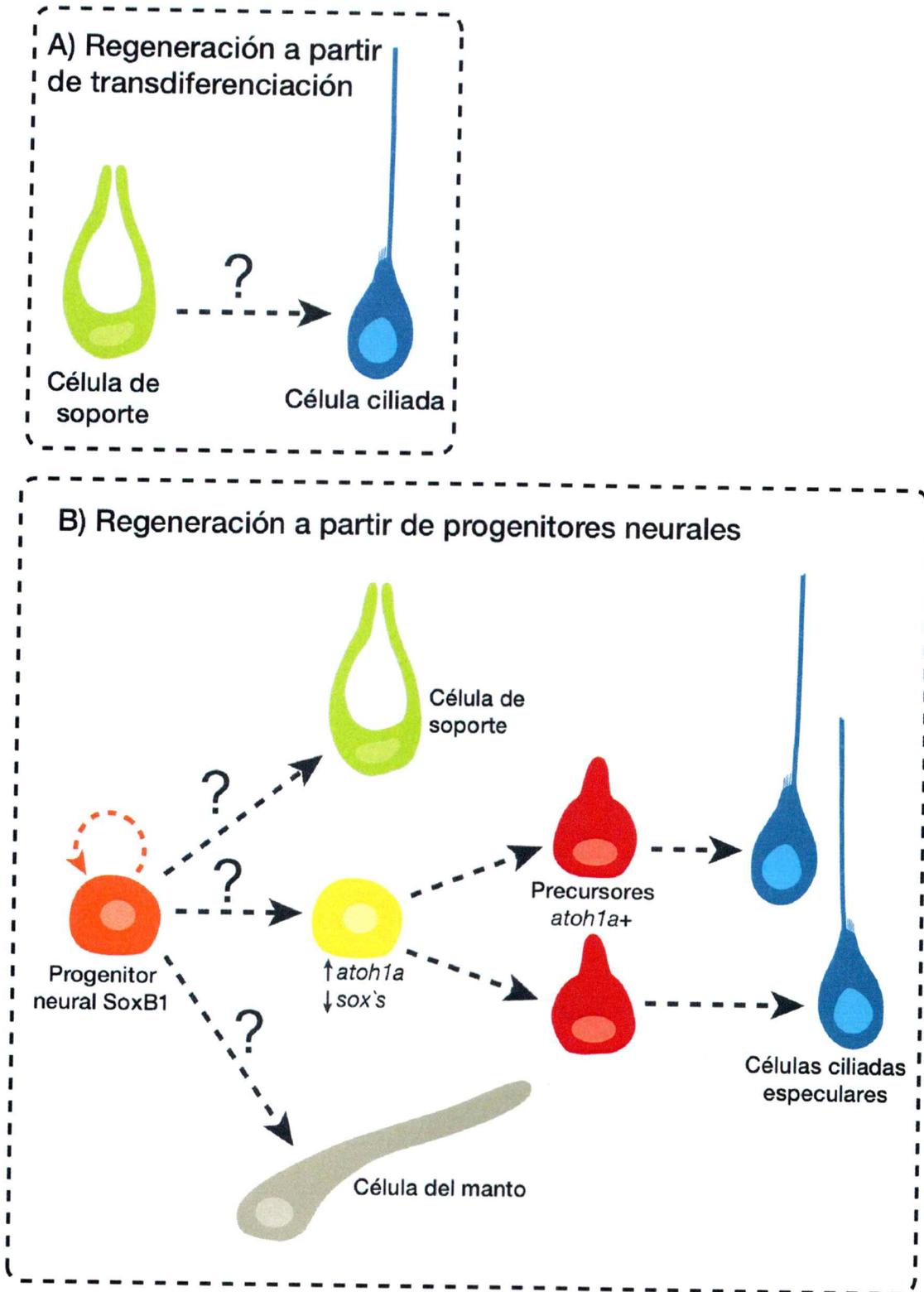
podría considerar como el mecanismo normal que se utiliza para reemplazar células ciliadas perdidas por distintos motivos.

Cuando el daño es mas severo, y la cantidad de células ciliadas que hay que regenerar es mayor, la transdiferenciación de células de soporte no es suficiente, y se hace uso de un segundo mecanismo: la proliferación de células progenitoras y la consecuente regeneración de células ciliadas y de células de soporte. En este fenómeno se ha visto una importante participación de Sox2 y *atoh1a*, tanto en el oído del pollo como del pez cebra (Millimaki y cols., 2010; Cafaro y cols., 2007; revisado por Cotanche y Kaiser, 2010). La regeneración acompañada de proliferación de células de soporte Sox2+ es un efectivo mecanismo por el cual no solo se reemplazan las células ciliadas si no también las de soporte dañadas y/o las que fueron utilizadas para la transdiferenciación inicial. En este mecanismo se ha visto la participación de Sox2, siendo esencial para la regeneración en el oído del pez cebra, con un posible rol en la mantención de las células de soporte en un estado pluripotente y/o contribuyendo en la transdiferenciación de las células de soporte (Millimaki y cols., 2010). En el oído del pollo se ha visto que la regeneración de las células ciliadas conlleva una disminución de la expresión de *sox2* y un aumento de *atoh1* en las células de soporte que van a dar origen a las nuevas células ciliadas (Cafaro y cols., 2007). Como se emplean las mismas vías de señalización y expresión de los mismos genes que en el desarrollo normal, en la regeneración se está recapitulando lo sucedido durante la ontogenia (Corwin y Cotanche, 1988).

Si bien en la línea lateral del pez describimos anteriormente la presencia de progenitores proliferativos en forma indirecta (Hernández y cols., 2007), en este

trabajo las diferenciamos claramente de las células de soporte y observamos la transición entre progenitores y células diferenciadas, tanto de soporte como ciliadas. Además, se han obtenido resultados similares que indican que tanto *sox2* como *sox3* son genes esenciales para la regeneración de las células ciliadas (Pablo Sandoval, tesis doctoral, resultados no publicados).

Dado el comportamiento observado de algunas de las células que expresan las proteínas SoxB1, podemos concluir que poseen un ciclo celular relativamente largo y que presentan divisiones asimétricas, generando una célula hija que mantiene esta característica. No es claro cuantas divisiones existirían entre esta y aquella división del precursor inmediato de las células ciliadas, que expresan *atoh1a* y se dividen simétricamente para producir dos células ciliadas. En nuestro modelo (Figura 71B), consideramos un paso directo entre célula troncal y precursor, pero se requieren experimentos de seguimiento *in vivo* con estudios de linaje para abordar esta incógnita.



**Figura 71. Modelo de regeneración en neuromastos de la línea lateral.** Esquema que muestra los posibles mecanismos que explicarían la regeneración de los diversos tipos celulares dañados en un neuromasto. En A) se observa el

reemplazo de células ciliadas mediante transdiferenciación de células de soporte, mecanismo posiblemente existente en condiciones normales de reposición de células ciliadas o cuando existe un daño menor. B) se ilustran los distintos eventos que transcurren durante una regeneración masiva en el neuromasto, en el cual es necesario reponer todos los tipos celulares. Las células progenitoras que expresan proteínas de la familia SoxB1, son capaces de autorenovarse, por un lado, y también de generar precursores mitóticos de células ciliadas y posiblemente precursores de los otros tipos celulares (no es claro si existen precursores mitóticos en el caso de las células de soporte o del manto). Se indica también que la expresión de las proteínas SoxB1 disminuye coincidentemente con el aumento del mRNA de *atoh1a* en el precursor de célula ciliada.

En esta tesis se identificó una población celular en el neuromasto que sólo había sido descrita morfológicamente mediante microscopía electrónica: las células de soporte. Pudimos detectar fehacientemente estas células gracias a la expresión de GFP en ellas en la línea transgénica *sox3h7:GFP*, que acumula altos niveles de la proteína fluorescente en el citoplasma y es posible visualizar la particular forma de copa de estas células. Las extensiones del citoplasma de las células de soporte que rodean a las células ciliadas son perfectamente discernibles en microscopía de fluorescencia confocal. El GFP se expresa también en un grupo de células progenitoras, mas periféricas, pero que son más esféricas y presentan niveles más bajos de expresión de la proteína fluorescente en la línea *sox3h7:GFP*.

Al comparar los mecanismos descritos hasta ahora en otros organismos en que se ha visto regeneración de células ciliadas, con lo que hemos descrito en el neuromasto, podemos enumerar una serie de similitudes, como son la expresión de los genes *sox2*, *atoh1*, *notch*, *delta* etc., o la posible transdiferenciación como mecanismo de reemplazo de las células ciliadas perdidas en una primera

instancia. Por otro lado, no había sido descrito el mecanismo aquí reportado de regeneración a partir de una población de células progenitoras, distintas de las células de soporte, y que explicarían la robusta regeneración observada en la línea lateral. Esta característica puede deberse a la naturaleza del sistema, que debe mantener una homeostasis funcional en un ambiente adverso, al mismo tiempo que crece y se desarrolla. La ilimitada potencialidad de las células progenitoras para reponer durante meses o años a las células mecanosensoras, nos habla de un sistema de alta plasticidad y adaptabilidad. En parte, es posible que parte del mecanismo que garantice esta capacidad sea gracias a la expresión sostenida de proteínas de la familia SoxB1 en los progenitores. Esto contrasta con lo observado en mamíferos, en los cuales existe la capacidad de regeneración de células ciliadas a nivel neonatal, vía transdiferenciación de células de soporte que expresan *sox2*, pero, en estadios posteriores, los niveles de *sox2* disminuyen con el desarrollo, coincidiendo con la pérdida de la capacidad de transdiferenciación vista en el desarrollo temprano (Smeti y cols., 2010).

#### **6.4. Consideraciones finales.**

La regeneración de células ciliadas en vertebrados es un fenómeno bastante común. De hecho, 4 de las 5 clases de vertebrados pueden responder favorablemente a daños en estas células, condición que esta ausente solo en los mamíferos. Este tipo de regeneración podría ser equivalente a una condición que se ha observado en otros sistemas sensoriales como el olfativo y el gustativo, en los cuales sus receptores tienen una regeneración constante en el transcurso de la

vida del animal. Existe la hipótesis que plantea que el origen de los distintos sistemas auditivos en vertebrados ocurrió a partir de órganos ancestrales de percepción de vibraciones en el medio, como la línea lateral de peces y anfibios (Harris y Burgeaux, 1962). El oído interno surgido a partir de este sistema, habría mantenido la capacidad regenerativa del sistema precursor, conservando la acción de los mismos genes.

La completa ausencia de regeneración en mamíferos podría ser consecuencia de la alta especialización, tanto de sus células ciliadas como de sus células de soporte; las primeras son capaces de detectar un amplio espectro de frecuencias. Además de sensar y discriminar los sonidos de variados frentes, estas células se han diversificado para asociarse con otros sistemas como el del equilibrio o el fonoarticulador, para generar un complejo nivel de comunicación en ellos (Rusell, 1976). Las células de soporte, de la mano de las células ciliadas, también han desarrollado una especialización tan profunda en mamíferos que han perdido la capacidad de transdiferenciarse a otros tipos celulares en caso de un daño, como si sucede en sus homólogas de vertebrados inferiores.

## VII. CONCLUSIONES

1. Se identificaron marcadores moleculares de progenitores neurales que se expresan tanto en el primordio migratorio como en los neuromastos de la línea lateral del pez cebra.
2. Se propone una nueva organización y nomenclatura de los tipos celulares en los neuromastos que conforman la línea lateral del pez cebra.
3. Se ha podido describir el mecanismo de regeneración de las células ciliadas de los neuromastos a partir de una población de células progenitoras.
4. Las células progenitoras descritas y caracterizadas aquí, conforman un nicho o población de células que tienen características propias de progenitores neurales, entre ellas:
  - a) presentan expresión de marcadores de progenitores neurales.
  - b) proliferan tanto en un estado homeostático como en regeneración.
  - c) se auto renuevan.
  - d) pueden dar origen a varios de los tipos celulares presentes en los neuromastos.

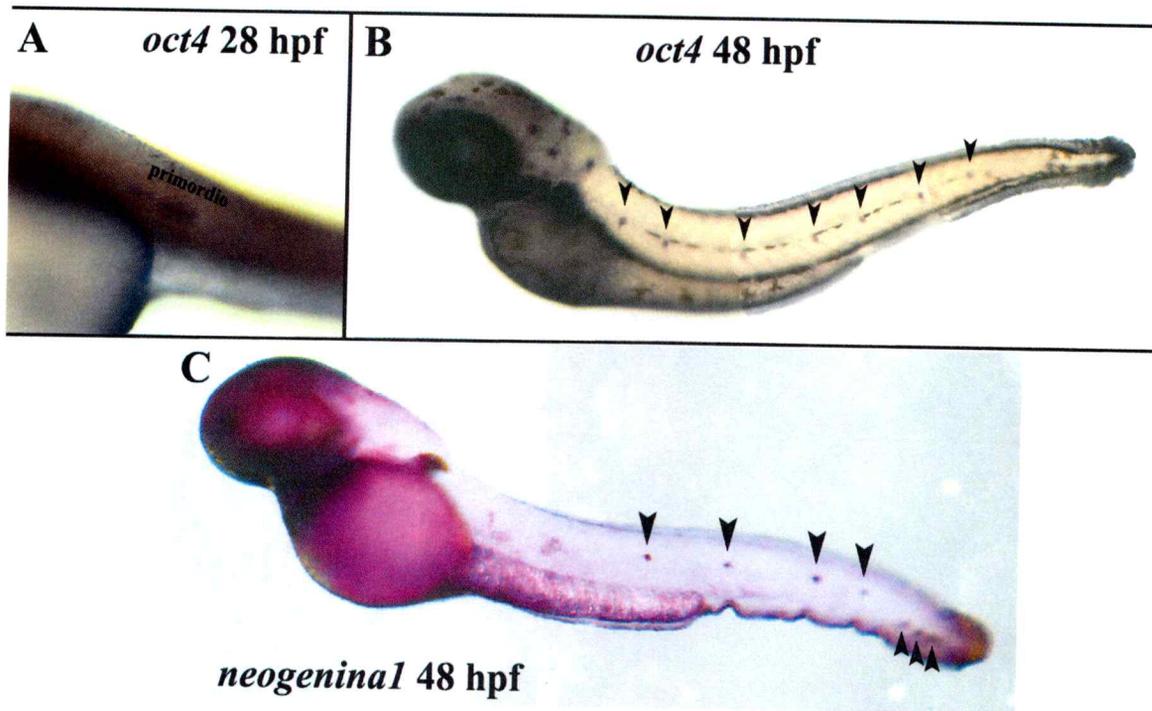
## VIII. PROYECCIONES

Los resultados aquí descritos muestran que la línea lateral del pez cebra podría ser un nuevo e interesante modelo para el estudio de progenitores neurales en vertebrados. También, la identificación de los mecanismos involucrados en la regulación de la regeneración podrían ser de gran importancia clínica, pues permitiría la experimentación *in vitro* con esta nueva población de células progenitoras, y el utilizarlas para probar distintos tipos de drogas que promuevan la generación de células ciliadas, y que potencialmente pueden ser utilizadas para terapias de reemplazo terapéutico en modelos de mamíferos, y finalmente en seres humanos con problemas de audición.

## IX. ANEXO

### 9.1. Expresión de otros genes en la línea lateral.

En el transcurso de esta tesis, y en colaboración con otros trabajos de doctorantes de nuestro laboratorio y vecinos, se encontraron también el producto de los genes *oct4* en el primordio y neuromastos (Figura 72 A y B), y de *neogenina1*, en neuromastos de larvas de 2 dpf. (Figura 72 C). Este último gen fue analizado en conjunto y como parte de la tesis del Dr. Luis Milla (Milla y cols., 2012).



**Anexo 1, Figura 72. Expresión de genes marcadores de células progenitoras.** A) Expresión del gen *oct4* en un embrión de 28 hpf en el primordio migratorio. B) Expresión de *oct4* en un embrión de 48 hpf en los neuromastos depositados de la LLP (puntas de flechas). C) Expresión del marcador de progenitores neurales *neogenina1* en un embrión de 48 hpf en los neuromastos de la línea lateral posterior (puntas de flechas). (Milla y cols., 2012).

## VIII. BIBLIOGRAFIA

- Álvarez-Buylla A, y Kirn JR. (1997). Birth, migration, incorporation, and death of vocal control neurons in adult songbirds. *J. Neurobiol.* 33, 585-601.
- Álvarez-Buylla A, y García-Verdugo JM. (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *J. Neurosci.* 22, 629-634.
- Andermann P, Ungos J, y Raible DW. (2002). Neurogenin1 defines zebrafish cranial sensory ganglia precursors. *Dev. Biol.* 251, 45-58.
- Antos C, y Tanaka E. (2010). Vertebrates that regenerate as models for guiding stem cells. En: Meshorer E, Plath K, editors. *The Cell Biology of Stem Cells*. Landes Bioscience.
- Antos C, y Brand M. (2011). Regeneration of organs and appendages in Zebrafish: A Windows into underlying control mechanism. *Encyclopaedia of Life Sciences*.
- Avilion A, Nicolls S, Pevny L, Perez L, Vivian N, y Lovell-Badge R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & development* 17(1), 126-40.
- Barnea A, y Nottebohm F. (1996). Recruitment and replacement of hippocampal neurons in young and adult chickadees: an addition to the theory of hippocampal learning. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 714-718.
- Becker CG, y Becker T. (2008). Adult zebrafish as a model for successful central nervous system regeneration. *Restor. Neurol. Neurosci.* 26: 71-80.
- Bernardos RL, y Raymond PA. (2006). GFAP transgenic zebrafish. *Gene Expr. Patterns* 6: 1007-1013.
- Bertrand N, Castro DS, y Guillemot F. (2002). Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 517-530.
- Birnbaum KD, y Sanchez Alvarado A. (2008). Slicing across kingdoms: regeneration in plants and animals. *Cell* 132, 697-710.
- Bonfanti L. (2011). From hydra regeneration to human brain structural plasticity: a long trip through narrowing roads. *The Scientific World Journal* 11, 1270-1299.
- Botquin V, Hess H, Fuhrmann G, Anastassiadis C, Gross MK, Vriend G, y Scholer HR. (1998). New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2. *Genes Dev.* 12, 2073-2090.
- Bowles J, Schepers G, y Koopman P. (2000). Phylogeny of the SOX family of developmental transcription factors based on sequence and structural indicators. *Dev. Biol.* 227:239-255.
- Brigande JV, y Heller S. (2009). Quo Vadis, hair cell regeneration?. *Nat. Neurosci.* 12, 679-685.
- Brignull HR, Raible DW, y Stone JS. (2009). Feathers and fins: non-mammalian models for hair cell regeneration. *Brain Res.* 1277: 12-23.
- Bylund M, Andersson E, Novitsch BG, y Muhr J. (2003). Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat. Neurosci.* 6, 1162-1168.

- Cafaro J, Lee, GS, y Stone JS. (2007). Atoh1 expression defines activated progenitors as well as differentiating hair cells during avian hair cell regeneration. *Dev. Dyn.* 236, 156-170.
- Carlson BM. (2005). Some principles of regeneration in mammalian systems. *Anat. Rec.* 287B, 4-13.
- Chardin S, y Romand R. (1995). Regeneration and mammalian auditory hair cells. *Science* 267, 707-709.
- Collazo A, Fraser SE, y Mabee PM. (1994). A dual embryonic origin for vertebrate mechanoreceptors. *Science* 264, 426-430.
- Collodi P, y Fan L. (2006). Zebrafish embryonic stem cells. *Methods in Enzymology* 418, 64-77.
- Coltrera MD, y Gown AM. (1991). PCNA/Cyclin expresión and BrdU uptake define different subpopulations in different cell lines. *J Histochem. Cytochem.* 39:23-30.
- Corwin JT, y Cotanche DA. (1988). Regeneration of sensory hair cells after acoustic trauma. *Science* 240, 1772-1774.
- Cotanche DA, y Kaiser CL. (2010). Hair cell fate decisions in cochlear development and regeneration. *Hearing research* 266(1-2), 18-25.
- D'alençon CA, Peña OA, Wittman C, Gallardo VE, Jones RA, Loosli F, Liebel U, Grabher C, y Allende ML. (2010). A high-throughput chemically induced inflammation assay in zebrafish. *BMC Biology* 8: 151.
- Danno H, Michiue T, Hitachi K, Yukita A, Ishiura S. y Asashima M. (2008). Molecular links among the causative genes for ocular malformation: Otx ans Sox2 coregulate Rax expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105:5408-5413.
- Duncan LJ, Anderson JK, Williamson KE, Mangiardi DA, Matsui JI, y Cotanche DA. (2006). Pattern of myosin expression during hair cell death and regeneration in the chick cochlea. *J. Comp. Neurol.* 499, 691-701.
- Emsley JG, Mitchell BD, Kempermann G, y Macklis JD. (2005). Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors, and stem cells. *Prog. Neurobiol.* 75, 321-341.
- Episkopou V. (2005). SOX2 functions in adult neural stem cells. *Trends Neurosci.* 28, 219-221.
- Ferri AL, Cavallaro M, Braida D, Di Cristofano A, Canta A, Vezzani A, Ottolenghi S, Pandolfi PP, Sala M, De Biasi S, y Nicolis SK. (2004). Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development* 131, 3805-3819.
- Fitzgerald DP, Cole SJ, Hammond A, Seaman C, y Cooper HM. (2006). Characterization of neogenin-expressing neural progenitor populations and migrating neuroblasts in the embryonic mouse forebrain. *Neuroscience* 142(3): 703-716.
- Font E, Desfilis E, Perez-Canellas MM, y Garcia-Verdugo JM. (2001). Neurogenesis and neuronal regeneration in the adult reptilian brain. *Brain Behav. Evol.* 58, 276-295.
- Gerlach C, Golding M, Larue L, Alison M, y Gerdes J. (1997). Ki-67 immunoexpression is a robust marker of proliferative cells in the rat. *Lab. Invest.* 77:697-698.
- Ghysen A, y Dambly-Chaudière C. (2004). Development of the zebrafish lateral line. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14, 67-73.

- Graham V, Khudyakov J, Ellis P, y Pevny L. (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* 39, 749-765.
- Grandel H, Kaslin J, Ganz J, Wenzel I, y Brand M. (2006). Neural stem cells and neurogénesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Dev. Biol.* 295: 263-277.
- Grant KA, Raible DW, y Piotrowski T. (2005). Regulation of latent sensory hair cell precursors by glia in the zebrafish lateral line. *Neuron* 45:69-80.
- Gubbels SP, Woessner DW, Mitchell JC, Ricci AJ, y Brigande JV. (2008). Functional auditory hair cells produced in the mammalian cochlea by in utero gene transfer. *Nature* 455(7212):537-41.
- Gurley KA y Sánchez-Alvarado A. (2008). Stem cells in animal models of regeneration. *StemBook*, pp.1-24.
- Guth SI, y Wegner M. (2008). "Having it both ways: Sox protein function between conservation and innovation". *Cell. Mol. Life Sci.* 65 (19): 3000-18
- Hack MA, Saghatelian A, de Chevigny A, Pfeifer A, Ashery-Padan R, Lledo PM, y Götz M. (2005). Neuronal fate determinants of adult olfactory bulb neurogenesis. *Nat. Neurosci.* 8, 865-872.
- Harris GG, y Bergeux WV. (1962). Evidence that the lateral line organ respond to water displacement. *J. acoust. Soc. Amer.* 34: 1831-1841.
- Harris JA, Cheng GA, Cunningham L, MacDonald G, Raible DW y Rubel EW. (2003). Neomycin-Induced hair cell death and rapid regeneration in the lateral line of zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the Association for Research in Otolaryngology* 4(2): 219-34.
- Hass P, y Gilmour D. (2006). Chemokine signaling mediates self-organizing tissue migration in the zebrafish lateral line. *Developmental cell* 10: 673-680.
- Hasson T, Gillespie PG, Garcia JA, MacDonald RB, Zhao Y, Yee AG, Mooseker MS, y Corey DP. (1997). Unconventional myosins in inner-ear sensory epithelia. *J. Cell Biol.* 1997, 1287--1307.
- Hata S, Namae M, y Nishina H. (2007). Liver development and regeneration: from laboratory study to clinical therapy. *Dev. Growth Differ.* 49: 163-170.
- Heintz N, Sive HL, y Roeder RG. (1983). Regulation of human histone gene expression: kinetics of accumulation and changes in the rate of synthesis and the half lives of individual histone mRNAs during the HeLa cell cycle. *Mol. Cell Biol.* 3:539-550.
- Hernandez PP, Moreno V, Olivari FA, y Allende ML. (2006). Sub-lethal concentrations of waterborne copper are toxic to lateral line neuromasts in zebrafish (*Danio rerio*). *Hear. Res.* 213, 1-10.
- Hernández P, Olivari F, Sarrazin F, Sandoval P, y Allende ML. (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. *Develop. Neurobiol.* 67: 637-654.
- Holstein TW, Hobmayer E, y David CN. (1991). Pattern of epithelial cell cycling in hydra. *Dev. Biol.* 148:602-611.
- Huang HT, y Zon LI. (2008). Regulation of stem cells in the zebrafish hematopoietic system. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 73: 111-118.
- Itoh M, y Chitnis AB. (2001). Expression of proneural and neurogenic genes in the zebrafish lateral line primordium correlates with selection of hair cell fate in neuromasts. *Mech. Dev.* 102:263-266.

- Izumikawa M, Minoda R, Kawamoto K, Abrashkin KA, Swiderski DL, Dolan DF, Brough DE, y Raphael Y. (2005). Auditory hair cell replacement and hearing improvement by Atoh1 gene therapy in deaf mammals. *Nat. Med.* 3(11):271-6
- Kani S, Bae YK, Shimizu T, Tanabe K, Satou C, Parsons MJ, Scott E, Higashijima S, y Hibi M. (2004). Proneural gene-linked neurogenesis in zebrafish cerebellum. *Dev. Biol.* 343: 1-17.
- Kanther M, Sun X, Mühlbauer M, Mackey LC, Flynn EJ 3rd, Bagnat M, Jobin C, y Rawls JF. (2011). Microbial Colonization Induces Dynamic Temporal and Spatial Patterns of NF- $\kappa$ B Activation in the Zebrafish. *Digestive Tract. Gastroenterology* 141(1):197-207.
- Kaslin J, Ganz J, y Brand M. (2008). Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 363: 101-122.
- Kaslin J, Ganz J, Geffarth M, Grandel H, Hans S, y Brand M. (2009). Stem cells in the adult zebrafish cerebellum: initiation and maintenance of a novel stem cell niche. *The Journal of neuroscience* 29(19), pp.6142-53.
- Kondoh H, y Kamachi Y. (2010). SOX-partner code for cell specification: Regulatory target selection and underlying molecular mechanisms. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42(3): 391-399.
- Kwan T, White PM, y Segil N. (2009). Development and regeneration of inner ear, Cell cycle control and differentiation of sensory progenitors. *Ann. NY. Acad. Sci.* 1170: 28-33.
- Lam CS, März M, y Strähle, U. (2009). Gfap and Nestin Reporter Lines Reveal Characteristics of Neural Progenitors in the Adult Zebrafish Brain. *Dev. Dyn.* 238, 475-86.
- Laguerre L, Soubiran F, Ghysen A, König N, y Dambly-Chaudière C. (2005). Cell proliferation in the developing lateral line system of zebrafish embryos. *Dev Dyn* 233, 466-72.
- Lee HY, Instelman AL, Kanungo J, y Hansen DK. (2012). Alternative models in developmental toxicology. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 58:10-22.
- Li H, Lui H, y Heller S. (2003). Pluripotent stem cells from the adult mouse inner ear. *Nature Med.* 9:1293-1299.
- Lois C, y Alvarez-Buylla A. (1994). Long-distance neuronal migration in the adult mammalian brain. *Science* 264, 1145-1148.
- López-Schier H, y Hudspeth J. (2006). A two-step mechanism underlies the planar polarization of regenerating sensory hair cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103(49), 18615-20.
- Marcus RC, Delaney CL, y Easter Jr. SS. (1999). Neurogenesis in the visual system of embryonic and adult zebrafish (*Danio rerio*). *Off. Vis. Neurosci.* 16, 417-424.
- Masaki H, y Ide H. (2007). Regeneration potency of mouse limbs. *Dev. Growth Differ.* 49, 89-98.
- Metcalfe WK, Kimmel CB, y Schabtach E. (1985). Anatomy of the posterior lateral line system in young larvae of the zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 233, 377-389.
- Millimaki BB, Sweet EM, y Riley BB. (2010). Sox2 is required for maintenance and regeneration, but not initial development, of hair cells in the zebrafish inner ear. *Dev. Biol.* 338(2), 262-9.
- Murakami SL, Cunningham LL, Werner LA, Bauer E, Pujol R, Raible DW, y Rubel EW. (2003). Developmental differences in susceptibility to neomycin-induced hair cell death in the lateral line neuromasts of zebrafish (*Danio rerio*). *Hear. Res.* 186: 47-56.

- Muskhelishvili L, Latendresse JR, Kodell RL, y Henderson EB. (2003). Evaluation of Cell Proliferation in Rat Tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) Immunohistochemistry and In Situ Hybridization for Histone mRNA. *J. Histochem. Cytochem.* 51:1681-1688.
  - Nakatani Y, Kawakami A, y Kudo A. (2007). Cellular and molecular processes of regeneration, with special emphasis on fish fins. *Dev. Growth. Differ.* 49: 145-154.
  - Navratilova P, Fredman D, Hawkins TA, Turner K, Boris L, y Becker TS. (2009). Systematic human/zebrafish comparative identification of cis regulatory activity around vertebrate developmental transcription factor genes. *Dev. Biol.* 327(2), 526-40.
  - Newmark PA, y Sánchez Alvarado A. (2000). Bromodeoxyuridine specifically labels the regenerative stem cells of planarians. *Dev Biol.* 220:142-153.
- Nicolson T, Rüsç A, Friedrich R, Granato M, Ruppertsberg JP, y Nüsslein-Volhard C. (1998). Genetic analysis of vertebrate sensory hair cell mechanosensation: the zebrafish circler mutants. *Neuron* 20(2), 271-83.
- Nishiguchi S, Wood H, Kondoh H, Lovell-Badge R, y Episkopou V. (1998) Sox1 directly regulates the gamma-crystallin genes and is essential for lens development in mice. *Genes Dev.* 12, 776-781.
  - Nishimoto M, Fukushima A, Okuda A, y Muramatsu M. (1999). The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5453-5465.
  - Nottebohm F, O'Loughlin B, Gould K, Yohay K, y Alvarez-Buylla A. (1994). The life span of new neurons in a song control nucleus of the adult canary brain depends on time of year when these cells are born. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 7849-7853.
  - O'Reilly-Pol T, y Johnson SL. (2009). Melanocyte regeneration reveals mechanism of adult stem cell regulation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20: 117-124.
  - Parinov, S, Kondrichin I, Korzh, y Emelyanov A. (2004). Tol2 transposon-mediated enhancer trap to identify developmentally regulated zebrafish genes in vivo. *Dev. Dyn.* 231(2), 449-59.
  - Pevny LH. y Lovell-Badge R. (1997). Sox genes find their feet. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7, 338-344.
  - Poss KD, Keating MT, y Nechiporuk A. (2003). Tales of regeneration in zebrafish. *Dev. Dyn.* 226: 202-210.
  - Potten CS, y Loeffler M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110: 1001-1020.
  - Rauch G, Lyons D, Middendorf I, Friedlander B, Arana N, Reyes T, y Talbot W. (2003). Submission and curation of gene expression data. ZFIN Direct data submission (<http://zfin.org>).
  - Raya A, Consiglio A, Kawakami Y, Rodriguez-Esteban C, y Izpisua-Belmonte JC. (2004). The zebrafish as a model of heart regeneration. *Cloning Stem Cells* 6: 345-351.
  - Reddien PW, y Sánchez Alvarado A. (2004). Fundamentals of planarian regeneration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20:725-757.
  - Renshaw S, y Trede N. (2012). A model 450 million years in the making: zebrafish and vertebrate immunity. *Dis. Model Mech.* 5(1): 38-47.

- Reynolds BA, Tetzlaff W, y Weiss S. (1992a). A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J. Neurosci.* 12: 4565–4574.
- Reynolds BA, y Weiss S. (1992b). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707–1710.
- Rizzoti K, Brunelli S, Carmignac D, Thomas PQ, Robinson IC, y Lovell-Badge R. (2004). SOX3 is required during the formation of the hypothalamo–pituitary axis. *Nat. Genet.* 36, 247–255.
- Roberson, DW, Alosi JA, y Cotanche DA. (2004). Direct transdifferentiation gives rise to the earliest new hair cells in regenerating avian auditory epithelium. *J. Neurosci. Res.* 78, 461–471.
- Rubel EW, Dew LA, y Roberson DW. (1995). Mammalian vestibular hair cell regeneration (letter; comment). *Science* 267: 701-707.
- Rusell JJ. (1976). Amphibian lateral line receptors. In frog neurobiology. Llinas R. Precht W. Springer Verlage. Berlin. Heidelberg Germany. 513-550.
- Sarrazin AF, Villablanca E, Nuñez VA, Ghysen A, y Allende ML. (2006). Proneural gene requirement for hair cell differentiation in the zebrafish lateral line. *Dev. Biol.* 295: 534–545.
- Selimoglu E. (2007). Aminoglycoside-induced ototoxicity. *Curr. Pharm. Des.* 13(1): 119-126.
- Smeti I, Savary E, Capelle V, Hugnot JP, Uziel A, y Zine A. (2010). Expression of candidate markers for stem/progenitor cells in the inner ears of developing and adult GFP<sup>A</sup> and nestin promoter-GFP transgenic mice. *Gene Expr. Patterns* 11, 22–32.
- Sweet EM, Vemaraju S, y Riley BB. (2011). Sox2 and Fgf interact with Atoh1 to promote sensory competence throughout the zebrafish inner ear. *Dev. Biol.* 358, 113-121.
- Tanaka EM, y Ferretti P. (2009). Considering the evolution of regeneration in the central nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 713–723.
- Trembley A. (1744). Mémoires pour Servir a L'histoire d'un Genre de Polypes d'eau Douce, a Bras en Forme de Cornes. Leiden: Jean and Herman Verbeek.
- Uchikawa, M., Kamachi, Y. y Kondoh, H., 1999. Two distinct subgroups of Group B Sox genes for transcriptional activators and repressors: their expression during embryonic organogenesis of the chicken. *Mech. Dev.* 84, 103–20.
- White RM, y Zon LI. (2008). Melanocytes in development, regeneration and cancer. *Cell Stem Cell* 3: 242-252.
- Whitfield T, Granato M. y Eeden FV. (1996). Mutations affecting development of the zebrafish inner ear and lateral line. *Development* 123, 241–254.
- Wibowo I, Pinto-Teixeira F, Satou C, Higashijima S, y López-Schier H. (2011). Compartmentalized Notch signaling sustains epithelial mirror symmetry. *Development* 138, 1143–52.
- Wilson N, y Key B. (2007). Neogenin: one receptor, many functions. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39(5): 874-8.
- Wood HB, y Episkopou V. (1999). Comparative expression of the mouse Sox1, Sox2 and Sox3 genes from pre- gastrulation to early somite stages. *Mech. Dev.* 86, 197–201.

- Xiao T, Roeser T, Staub W, y Baier H. (2005). *Development* 132: 2955-67.
- Zhao S, Nichols J, Smith A, y Li M. (2004). SoxB transcription factors specify neuroectodermal lineage choice in ES cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 27, 332-342.
- Zupanc GK. (2001). Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. *Brain Behav. Evol.* 58, 250-275.
- Zupanc GK, Hinsch K, y Gage FH. (2005). Proliferation, migration, neuronal differentiation, and long-term survival of new cells in the adult zebrafish brain. *J. Comp. Neurol.* 488: 290-319.