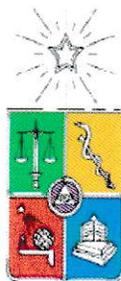


UCH-FC
MAG-BMCN
S 211
C.1

Universidad de Chile
Facultad de Ciencias



Mecanismos celulares involucrados en la regeneración del sistema mecanosensor 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

Mario Eduardo Sánchez Rubio

Mayo, 2015

Director de Tesis Dr: Miguel Luis Allende Connelly

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

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

Mario Eduardo Sánchez Rubio

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 9 de abril 2015

Director de Tesis:

Dr. Miguel Luis Allende Connelly

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Juan Fernández

Dra. Verónica Palma

Dr. Ariel Reyes

Dr. Marcelo Antonelli



A circular stamp from the University of Chile Library (BIBLIOTECA CENTRAL U. DE CHILE) is positioned at the top right. Below it are three handwritten signatures in blue ink, each followed by a dotted line. The signatures appear to be 'Miguel Allende', 'Juan Fernández', and 'Ariel Reyes'.

A Loreto el amor de mi vida...

Agradecimientos.

En este espacio me gustaría agradecer a todas las personas que me han apoyado permitiendo que ésta etapa finalmente termine.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis cinco familias: la primera de ellas, mi familia biológica que sin ellos claramente no estaría acá (no solo biológicamente hablando), ellos me inculcaron una formación íntegra en la que no sólo lo intelectual es lo importante sino también un valor agregado llamado valores (extrañamente escasos), me enseñaron la importancia de formar lazos personales a destacar lo bueno y respetar malo de las personas. La segunda de ellas, mi familia “hogareña” compuesta por solo tres integrantes una llamada “yiiiáá” (Fola), con quien hemos disfrutado múltiples momentos (en especial cuando le escondía sus tan preciadas muletas y cuando la obligaba a correr con ellas por la UdeC) por desde que nos conocimos en el “Sure” durante nuestros estudios de pregrado, la segunda integrante de esta familia es “Yeme” (Lo), el amor de mi vida, sin su comprensión, carácter, y compañía (en especial por esas largas noches de desvelo por esta tesis) esta etapa hubiera sido claramente más difícil, sin sus valores inquebrantables que me permitieron seguir firme con mis valores “sureños” y no los personalista muchas veces vistos en esta ciudad. A mi tercera familia Rojas-Sobarzo, quienes me acogieron como parte de su familia mientras estaba lejos de mi familia biológica y escuchaban mis interminables tonteras. A mi cuarta familia “toda la magia del sur”, amigos de la vida de más de 11 años juntos quien soportaron por este tiempo mis historias y chiste fomes. Y por último a mi quinta familia (no por ello menos importante), nuestro cardumen de pez

cebra que en la cabecera se encuentra Miguel, a quien agradezco con especial afecto por recibirme en su laboratorio tras la ola del maremoto que me trajo a Santiago y darme las oportunidades de desarrollarme intelectualmente y apoyarme en muchos experimentos fallidos. A Florencio Espinoza y Juan Silva por soportarme tanto tiempo de sacar la vuelta en su oficina y soportarme hablar tanta tontera. A Catalina Lafourcade por su gran conocimiento y ayuda en el tan necesario manejo de los peces. A María Laura Ceci, Consuelo Anguita, Daniela Gutiérrez, Diego Rojas quienes pasaron de ser parte de un grupo de trabajo a ser grandes amigos de la vida en tan poco tiempo de conocernos. A También a varios integrantes más de esta familia como lo son Cristian Undurraga, Leonardo Valdivia, Elvis Acevedo, a la “Gástrula Mecánica”, a los laboratorios de Álvaro Glavic y Verónica Palma, lamento profundamente no escribir más de cada uno de ellos en particular pero sería muchas más páginas que esta misma tesis y cada uno de ellos sabe lo importante que han sido para mi vida.

Agradezco también al comité evaluador de esta tesis que sin sus comentarios su exhaustiva revisión este escrito claramente no sería lo que es hoy.

Índice de contenido

Índice de figuras	v
Listado de abreviaturas	vii
Hipótesis del trabajo	2
I. Objetivos.....	2
Resumen	4
Abstract	6
II. Introducción.....	7
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
1. Material biológico.....	23
2. Inhibición de la señalización ErbB	25
3. Experimentos de trasplantes	25
4. Tratamientos con Sulfato de Cobre	26
5. Inmunofluorescencia.....	26
6. Adquisición de imágenes y “time lapse”	28
IV. Resultados.....	30
1. Caracterización del comportamiento de los diversos componentes celulares de la línea lateral de pez cebra en respuesta al daño de un neuromasto que ha perdido todas sus células.	30
1.1. Desarrollo de una metodología que permita la eliminación completa de un neuromasto en larvas de pez cebra.	31
1.1.1. Electroablación como método de daño localizado	31
1.1.2. Electroablación como método de daño a un neuromasto único	33
1.1.3. Daño de un neuromasto por electroablación da paso a la regeneración de un neuromasto único.	34
1.1.4. Caracterización del daño a los tejidos subyacentes	36
1.1.4.1. Daño a la piel y tejido muscular	36
1.1.4.2. Daño al nervio de la línea lateral posterior	42
1.1.4.3. Daño en las células de Schwann asociadas al nervio de la línea lateral posterior	45
1.2. Caracterización del comportamiento de neuromastos cercanos al daño por electroablación.	49

1.2.1.1.	Células totales.....	50
1.2.1.2.	Células ciliadas.....	51
1.2.1.3.	Células del manto.....	53
2.	Mediante estudios de linaje celular <i>in vivo</i> , detectar la ubicación inicial de las células que darán origen al nuevo neuromasto.	57
2.1.	Determinar el origen de las células progenitoras que darán origen al nuevo neuromasto.....	57
2.1.1.	Acumulación de células interneuromásticas e la zona de daño.	57
2.1.2.	El neuromasto regenerado proviene íntegramente de células interneuromásticas.	60
2.1.3.	La aparición de un neuromasto producto del daño por electroablación no requiere un neuromasto preexistente.	64
2.1.4.	Las células de Schwann tienen un efecto inhibitorio en la regeneración de los neuromastos.....	66
2.1.5.	En ausencia de regeneración, las células interneuromásticas proliferan pero no se diferencian.....	69
2.2.	Identificar la secuencia temporal de aparición de cada tipo celular durante la regeneración del neuromasto.	71
2.2.1.	La activación de las células interneuromásticas como mecanismo de regeneración requiere la formación de un ambiente permisivo.	77
V.	Discusión.....	81
1.	Electroablación como método de eliminación local de neuromastos.	82
2.	Pérdida temporal de inervación y su implicancia en el estado de diferenciación de las células de Schwann.	83
3.	Células interneuromásticas son responsables de regenerar el neuromasto tras su eliminación.....	84
4.	Rol de las células interneuromásticas en la correcta inervación del nuevo neuromasto.	86
5.	Células de Schwann como reguladores espaciales y temporales de la regeneración.....	87
6.	¿Efecto local del daño o mecanismos celulares diferentes?.	90
7.	Diferenciación local de células interneuromásticas resulta en la aparición de todos los tipos celulares del neuromasto.	92
8.	Adquisición de Sox2 como evento clave en la regeneración de neuromastos.	95
VI.	Bibliografía.....	98
VII.	Anexos.....	103

Índice de figuras

figura 1: Fuentes celulares de la regeneración.	9
figura 2: Desarrollo de la línea lateral posterior.	12
figura 3: Esquema que ilustra los diversos tipos celulares en neuromastos de la llp.	13
figura 4: Desarrollo post embrionario de la línea lateral de pez cebra.	15
figura 5: Función de las células interneuromásticas	18
figura 6: Regeneración de línea lateral caudal de pez cebra adulto	22
figura 7 Disposición del equipo de electroablación y la dependencia del daño tisular con el amperaje.	32
figura 8 Electroablación como método de daño a un neuromasto único.	34
figura 9: Electroablación del neuromasto l3 permite la regeneración a partir de 48 hpd.	35
figura 10 Extensión del daño inflingido por la electroablación..	39
figura 11 Reparación de las piel posterior al daño.	40
figura 12: Muerte celular posterior al daño.	41
figura 13 La electroablación del neuromasto l3 resulta en una axotomía del nervio de la línea lateral posterior.	43
figura 14: Comportamiento del npll durante la regeneración de neuromasto.	44
figura 15 La electroablación del neuromasto l3 resulta en la eliminación de las células de schwann ubicadas bajo el neuromasto l3.	46
figura 16: Pérdida temporal de expresión de mbp en las células de schwann posterior al daño.	48
figura 17 Cuantificación del número total de células en neuromastos l2 y l4.	51
figura 18 Cuantificación del número de células ciliadas en los neuromastos de la pll.	52
figura 19 Cuantificación del número de células del manto en neuromastos l2 y l4.	54
figura 20 Cuantificación del número de células de soporte sox2+ en neuromastos l2 y l4.	56
figura 21 Acumulación de inc en la zona de daño.	59
figura 22 Células interneuromásticas son responsables de regenerar el neuromasto dañado.	62

figura 23 La regeneración de un neuromasto involucra al menos 2 células interneuromásticas.	63
figura 24 Daño local en las células interneuromásticas mediante electroablación induce la formación de un nuevo neuromasto.	66
figura 25: Efecto inhibitorio de las células de schwann en la regeneración de neuromasto único.	68
figura 26 En ausencia de regeneración existe proliferación y reorganización de las células interneuromásticas.	70
figura 27: Acumulación y diferenciación de las células interneuromásticas en la zona de daño.	72
figura 28 Acumulación y diferenciación de las células interneuromásticas en la zona de daño.	74
figura 29 Incremento progresivo del numero de células en la zona de regeneración..	75
figura 30: Diferenciación de células centrales del neuromasto hacia linaje de célula ciliada brn3c positiva.	76
figura 31 Microambiente local generado por la electroablación permite la activación de las células interneuromásticas.	79
figura 32 Modelos posibles de inhibición	89
figura 33 Posibles escenarios de diferenciación que no pudieron ser dilucidados.	94
figura 34 Mutante g19 presenta menos neuromastos en la línea lateral posterior.	105
figura 35: La posición de los neuromastos está afectada en el mutante g19.	105
figura 36 El número de células que componen cada neuromasto está afectado en el mutante g19.	106
figura 37 El número de células atoh1a positivas se ve afectado en el mutante g19.	107
figura 38: La composición celular del neuromasto no se ve afectada en el mutante g19.	108
figura 39: Mutante g19 presenta una muerte celular exacerbada.	109
figura 40: Ensayo de tunel en el primordio de la línea lateral posterior.	110
figura 41: La inducción de muerte en el primordio por toxicidad de morfolino, no recapitula el fenotipo mutante..	111
figura 42 Regeneración de la línea lateral caudal en peces adultos posterior a la electroablación. Cola de pez adulto.	112

Listado de abreviaturas

°C	: Grados Celsius.	MBP	: Proteína básica de la mielina.
μA	: micro Amperios.	min	: Minutos.
μm	: micrómetros.	mM	: Mili molar.
DMSO	: Dimetilsulfóxido.	nLLP	: Nervio de la línea lateral posterior.
Dpf	: Días post fertilización	ON	: <i>Over night</i> (toda la noche).
E3	: Medio para crecimiento de embriones.	p/v	: Concentración peso/volumen.
GFP	: Proteína fluorescente verde.	PBS	: Tampón fosfato salino
gLLP	: Ganglio de la línea lateral posterior.	PBT	: Tampón fosfato salino con tween20.
hpd	: Horas post daño.	PFA	: Paraformaldehído.
hpf	: Horas post fertilización.	PrimI	: Primordio de la LLP primaria.
h	: Horas.	PrimII	: Primordio de la LLP secundaria.
INC	: Células interneuromásticas.	RFP	: Proteína fluorescente roja.
L1-8	: Neuromastos 1 al 8 de la LLP primaria.	RT	: <i>Room temperature</i> (temperatura ambiente).
LII.1-6	: Neuromastos 1 al 6 de la LLP secundaria.	TAB	: Línea silvestre de pez cebra.
LL	: Línea lateral.		
LLA	: Línea lateral anterior.		
LLP	: Línea lateral posterior.		

Hipótesis del trabajo.

Las células interneuromásticas son responsables de regenerar el neuromasto de la línea lateral del pez cebra luego de su eliminación y lo hacen reguladas por células de Schwann.

I. Objetivos

Objetivo General.

Identificar las células participantes en la restitución de un neuromasto completamente destruido.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar el comportamiento de los diversos componentes celulares de la línea lateral de pez cebra, en respuesta al daño de un neuromasto que ha perdido todas sus células.
 - 1.1. Estandarizar un protocolo que permita la eliminación completa de un neuromasto en larvas del pez cebra.
 - 1.2. Caracterizar el comportamiento de neuromastos no intervenidos en respuesta al daño de uno de ellos.
2. Mediante estudios de marcaje celular *in vivo*, detectar la ubicación inicial de las células que darán origen al nuevo neuromasto.
 - 2.1. Determinar el origen de las células progenitoras que darán origen al nuevo neuromasto.

2.2. Identificar la secuencia temporal de aparición de cada tipo celular durante la regeneración del neuromasto.

Resumen

La línea lateral larval del pez cebra es un atrayente modelo para estudiar los procesos involucrados en la respuesta reparativa o regenerativa frente a un daño tisular. Este sistema sensorial es sensible a la exposición prolongada de altas concentraciones de algunos metales pesados y biomoléculas, sufriendo desorganización parcial y a veces destrucción total de los órganos que lo conforman: los neuromastos. Luego del daño, se ha evidenciado que las células ciliadas presentes en el órgano regeneran en un corto periodo de tiempo, a partir de la división de precursores ubicados en la región basal del neuromasto. Sin embargo el tratamiento severo con sulfato de cobre, no permite la regeneración. Esta dualidad en la respuesta frente a un tratamiento leve o severo, posiciona al modelo de la línea lateral del pez cebra como un modelo adecuado para estudiar los mecanismos celulares involucrado en la capacidad de reparar o regenerar en respuesta al daño. Este trabajo está enfocado en comprender el o los mecanismos celulares involucrados en la restauración de un neuromasto tras la eliminación de todas sus células y en entender cómo la coordinación celular regula dicho proceso en condiciones que conducen o no a la regeneración. Para ello se desarrolló una metodología que permite la eliminación completa de un neuromasto único denominada electroablación. Observamos que luego del daño, las células interneuromásticas (INC) próximas a la lesión son reclutadas desde ambos extremos, proliferan, se acumulan y se diferencian a todos los tipos celulares del neuromasto. El proceso de acumulación y diferenciación está regulado

negativamente por las células de Schwann asociadas al nervio de la línea lateral ya que su ausencia genera un ambiente permisivo para la proliferación, diferenciación y organización de las INC para regenerar el neuromasto.

Abstract

The zebrafish lateral line is an attractive model for studying the response to tissue damage, which can result in repair or regeneration of the organ. Hair cells in lateral line neuromasts are sensitive to heavy metals and other toxic molecules but they can regenerate in a short period of time, through the division of precursors located in the basal region of the neuromast. However, treatment with high concentrations of copper sulfate does not allow regeneration. This duality in the response to a mild vs severe treatment, introduces the zebrafish lateral line as a suitable model for studying the cellular mechanisms involved in the ability to repair or regenerate cells in response to damage. This work is focused on understanding the cellular mechanisms involved in the restoration of an entire neuromast after the removal of all cells and on how coordination of cellular behaviors regulates the process under non regenerative and regenerative conditions. For this aim, we develop a methodology that allows the complete removal of a single neuromast called electroablation. We observed that, after ablation of a neuromast, adjacent interneuromastic cells are recruited from both sides to fill the gap, proliferate, accumulate and differentiate to restore a complete neuromast containing all cell types. Importantly, we find that the process of accumulation and differentiation of interneuromastic cells is negatively influenced by Schwann cells associated with the lateral line nerve. Thus, neuromast regeneration is a robust process that is favored by permanent or temporary Schwann cell absence suggesting they produce a diffusible inhibitory factor.

II. Introducción

Restablecimiento de estructuras o tejidos perdidos

La respuesta de un organismo frente a un daño tisular que elimine o dañe tejidos u órganos, puede ser una respuesta regenerativa o bien reparativa. **La respuesta regenerativa**, involucra una restauración funcional de la estructura perdida o dañada. En cambio, la **respuesta reparativa** es una respuesta compensatoria, en que la estructura es remplazada por tejido que permite la sobrevivencia del organismo y no recupera la identidad estructural ni funcional del tejido original (Bonfanti, 2011) . El análisis de las capacidades regenerativas a lo largo del reino animal nos muestra que las capacidades de responder a un trauma, son variadas y dependen de la edad, tipo de organismo y del tejido u órgano que fue dañado y en qué forma fue dañado. El balance existente entre la capacidad de regenerar y de reparar estructuras dañadas van desde la impresionante capacidad de regenerar de la *Hydra*, la cual puede formarse completamente a partir de grupos discretos de células (Reddien y Sánchez Alvarado, 2004) hasta la limitada respuesta regenerativa de los mamíferos, en los que encontramos eventos de regeneración discretos y acotados a órganos particulares como el hígado y cuya capacidad de responder depende del tipo de daño generado y disminuye con la edad del organismo. De esta forma el aumento de la complejidad estructural y celular, en conjunto con la limitada distribución de células progenitoras, restringiría la respuesta regenerativa, dando pie a la reparación tisular como mecanismo principal de respuesta frente a un daño. Las preguntas centrales que se

han abordado frente a la variada distribución de las capacidades regenerativas en los diferentes organismos, incluyen: (1) ¿qué determina y controla el potencial de regeneración?; (2) ¿cuáles son las fuentes celulares de la regeneración y si existe un cambio de linaje durante dicha regeneración?; (3) ¿qué factores inician la regeneración y cómo su activación se restringe al área de daño?; y (4) ¿qué señales controlan la proliferación y “*patterning*” durante la regeneración y cómo es adecuadamente completado este proceso?.

Fuentes celulares de la regeneración

La capacidad de regenerar o reparar radica, por un lado, en la correcta activación de mecanismos celulares básicos que provean de nuevas células al tejido en regeneración y que estas sean capaces de organizarse correctamente durante la organogénesis regenerativa. Entre los posibles mecanismos a los que los organismos pueden acceder para disponer de células con capacidad de formar nuevas estructuras tras el daño, encontramos: (1) la existencia en el tejido o bien, en el organismo de **células troncales o progenitoras** con la capacidad de auto-renovarse y de producir uno o todos los tipos celulares del órgano o tejido; (2) la pérdida del estado de diferenciación de células en el sitio de daño que actúen como células progenitoras capaces de formar uno o varios tipos de células del órgano o tejido, fenómeno denominado **desdiferenciación**; y (3) la existencia de células capaces de “transformarse” desde un tipo celular a otro sin división celular previa, denominado **trans-diferenciación**. Las capacidades de producir uno, varios o

todos los tipos celulares, definen a estas células como unipotentes, multipotentes o pluripotentes.

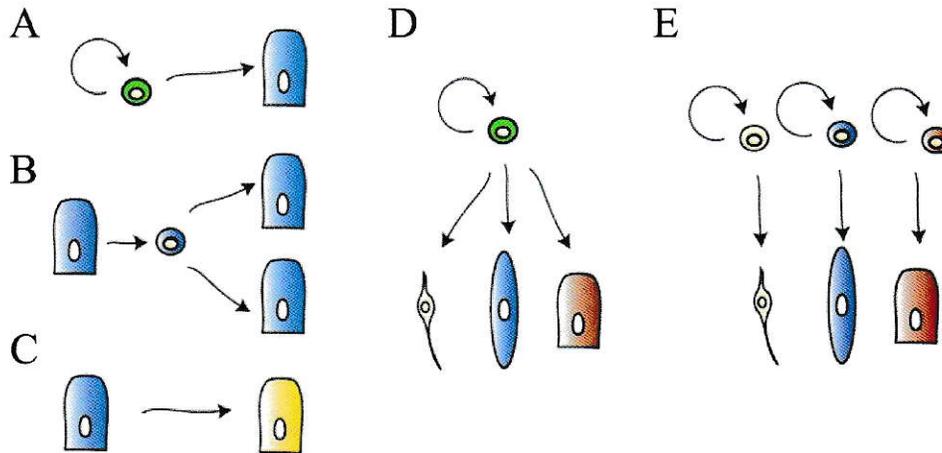


Figura 1: Fuentes celulares de la regeneración. Representación esquemática de las posibles fuentes de celulares durante la regeneración. (A) célula progenitora o troncal como fuente de células para la regeneración. (B) dediferenciación celular para formar los diferentes tipos celulares del tejido dañado. (C) transdiferenciación celular. (D) Célula multipotente capaz de generar todos los tipos celulares de la estructura dañada. (E) múltiples células unipotentes para regenerar todas las células del órgano o tejido dañado. Imagen modificada desde Tanaka y Reddien, 2011.

De esta forma, durante la regeneración disponemos de dos diferentes mecanismos a través de los cuales se pueden reemplazar todos los tipos celulares que componían la estructura dañada. Uno de ellos es la existencia de una célula progenitora multipotente. La segunda, es la existencia de múltiples células progenitoras con capacidades de diferenciación más restringidas. Lamentablemente la señalización involucrada en la correcta activación de alguno de estos mecanismos en respuesta al daño y cómo se regula el fenómeno a nivel

local, están pobremente estudiados. En este contexto nace la hipótesis que en el sitio de daño se generan moléculas que promueven la activación y diferenciación de estas células restringidas al sitio de daño, o bien, son fuentes de señales atrayentes para células progenitoras provenientes de otros sitios del organismo. Un modelo interesante en el cuál estudiar el efecto local del daño en la activación de células progenitoras, es en la línea lateral del pez cebra. Este es un órgano sensorial, con un número pequeño de células y al menos 5 tipos celulares a con potencial de regeneración. Además el modelo de la línea lateral (LL) ha mostrado una respuesta regenerativa y reparativa frente a protocolos de daño experimentales.

Formación de la línea lateral posterior

La LL es un sistema mecanosensorial presente en la superficie corporal de peces y anfibios cuya función se relaciona con la detección de presas, evasión de predadores, natación sincronizada y algunas conductas sociales (Ma y Raible, 2009). El sistema de la línea lateral de los teleósteos comprende dos estructuras principales: grupos discretos de órganos mecanosensoriales (neuromastos) organizados en un patrón reproducible en el cuerpo y la cola, y las neuronas aferentes encargadas de la inervación de los neuromastos (Coombs y col. 1989). En el pez cebra, la LL está compuesta por dos ramas principales: la LL anterior (ALL) que incluye los neuromastos presentes en la cabeza, mandíbula y opérculo, y la línea lateral posterior (PLL), en la cual se centra este trabajo, se compone de

neuromastos localizados en el tronco y la cola (Gompel y col., 2001). La ontogenia de la PLL comienza a partir de una placoda craneal que se ubica caudal a la vesícula ótica aproximadamente a las 18h post fecundación (hpf) (Kimmel y col., 1995). Esta placoda se divide en un grupo anterior (estático) de aproximadamente 20 células que dará origen al ganglio de la línea lateral posterior (gLLP) (neuronas aferentes) y un grupo (migratorio) de aproximadamente 80 células que origina el primordio de la PLL (PrimI) (Figura 1a). A las 22 hpf, el PrimI comienza a migrar a lo largo del “*mioseptum*” horizontal hacia la punta de la cola, que es alcanzada aproximadamente a las 40hpf (Kimmel y col., 1995) Durante la migración del primI, el ganglio de la línea lateral proyecta sus axones hacia la región caudal, acompañando al primordio migratorio (Gilmour y col., 2004; Metcalfe y col., 1985) en conjunto con la migración de los axones, migran precursores de células de Schwann a lo largo de dichos axones (Gilmour y col., 2002).

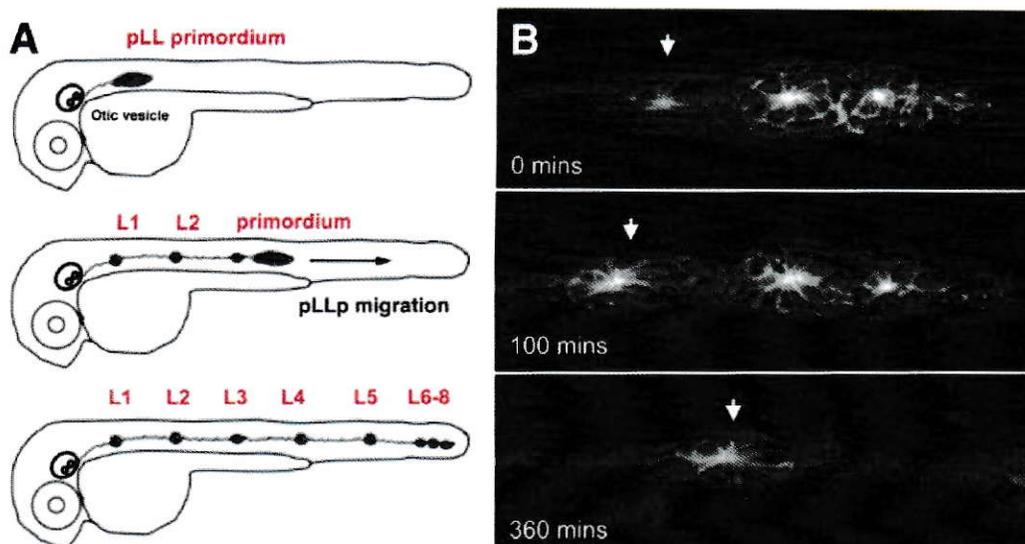


Figura 2: Desarrollo de la línea lateral posterior. Depósito de neuromastos por el primordio de la línea lateral posterior (primI). (A) esquema de la migración del primordio de la línea lateral posterior desde la vesícula ótica a la punta de la cola, como también del reiterado depósito de neuromastos primarios (L1-L5) y de los neuromastos caudales (L6-L8) por el primI. (B) imágenes de microscopia confocal de tiempo extendido, del primI usando la línea *tg(-8.0cldnB:LynGFP)*, mostrando el proceso de depósito de neuromastos. Flechas, posición del proneuromasto. Figura adaptada de Chitnis y col., 2011.

Durante la migración, el primI deposita cinco grupos de 20 células cada uno (proneuromastos) (Figura 2B) cuyo espaciamiento depende de la tasa de proliferación de las células que componen el primordio (Valdivia y col., 2011). Cada uno de estos grupos de células dará origen a un neuromasto (denominados L1-L5 desde rostral a caudal, Figura 2A). Cada neuromasto depositado está compuesto por 4 tipos celulares (Figura 3): células del manto, a las que solo se les ha atribuido un rol estructural; células de soporte responsables del recambio normal de células y posiblemente en regeneración; progenitores basales; y las células ciliadas, que constituyen la unidad funcional del neuromasto, los

mecanorreceptores. Una vez que los proneuromastos abandonan el primordio, estos quedan conectados con el siguiente proneuromasto a través de una delgada fila de células no diferenciadas provenientes del mismo primordio, denominadas células interneuromásticas (INC) (Gompel y col., 2001; López-Schier y col., 2004). Finalmente, fragmentos del PrimI que alcanzan la punta de la cola, formaran dos o tres neuromastos terminales o caudales (L6-L8) (Figura 1A). Alrededor de las 48hpf, el patrón embrionario de la LL está completo (Figura 1A).

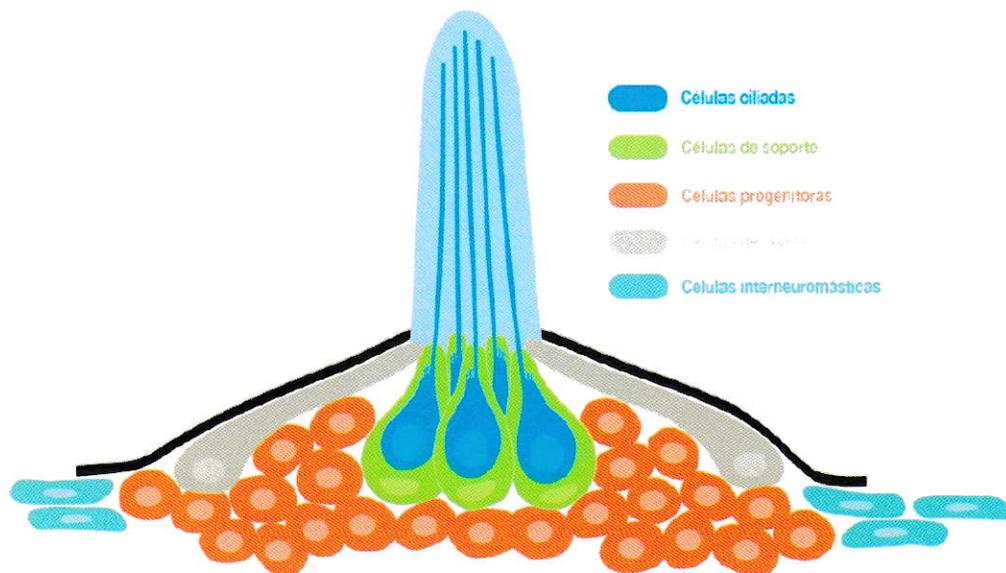


Figura 3: Esquema que ilustra los diversos tipos celulares en neuromastos de la LLP. Se describen 5 tipos celulares, sus distintas morfologías y distribuciones en un neuromasto maduro. Adaptada de C. Undurraga datos no publicados.



Desarrollo post-embrionario de la línea lateral

Durante la etapa larval, juvenil y adulta del pez cebra, existe un incremento del número de neuromastos que componen las diferentes líneas laterales. Este proceso involucra 3 mecanismos (Ledent, 2002; Nuñez y col., 2009; Sarrazin y col., 2010): (1) Migración de nuevos primordios (PrimII y PrimD), (2) formación de “stitches” o formación de neuromastos por yemación; y (3) formación de neuromastos intercalares. El primer mecanismo involucra la formación de un nuevo primordio en la región caudal a la vesícula ótica, que comienza a migrar desde el oído hacia la cola. Este primordio denominado PrimII, culmina su migración cercano al ano del pez y durante su migración deposita nuevos neuromastos en el miosepto horizontal denominados neuromastos secundarios (Nuñez y col., 2009; Sapède y col., 2002; Sarrazin y col., 2010) (Figura 4 Ay B). El segundo fenómeno corresponde a la formación de “*stitches*” de neuromastos, que temporalmente es el último proceso que contribuye a aumentar el número de neuromastos. El “*stitching*” de neuromastos involucra la formación de nuevos neuromastos desde uno previamente establecido y a través del cual se forman columnas de neuromastos (Ledent, 2002; Wada y col., 2013) (Figura 4E-F). Finalmente, el tercer mecanismo, en el cual centraremos nuestra atención, corresponde a la formación de neuromastos intercalares (IC). Estos neuromastos surgen como consecuencia de la proliferación de las células interneuromásticas (Grant y col., 2005; Lush y col., Piotrowski, 2014; López-Schier y col., Hudspeth, 2005; Nuñez y col., 2009; Sapède y col., 2002).

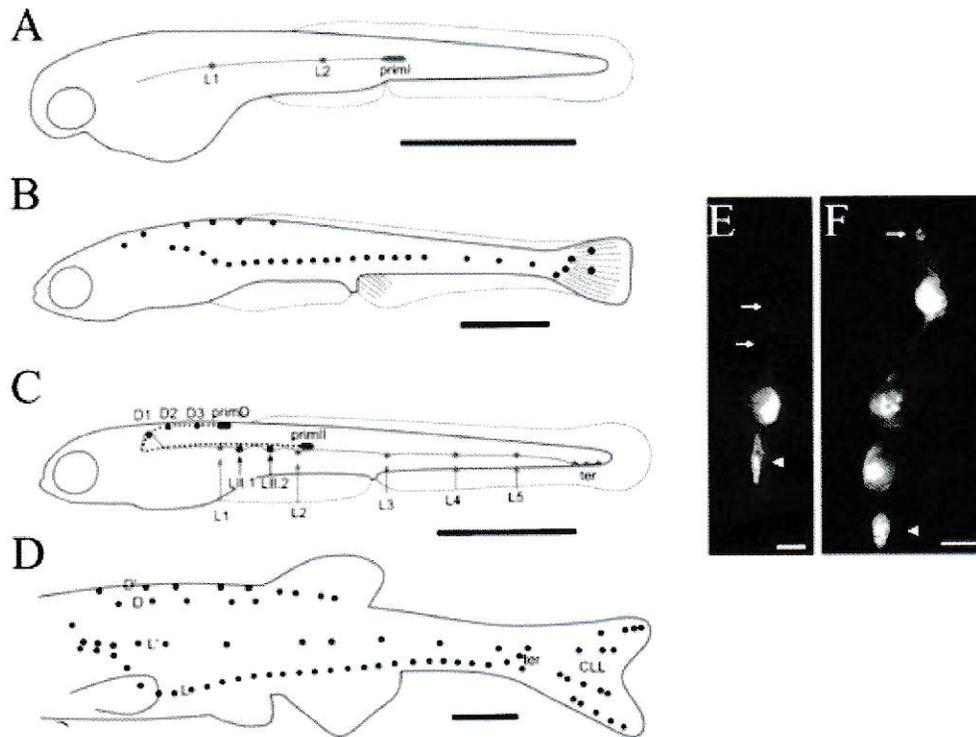


Figura 4: Desarrollo post-embriionario de la línea lateral de pez cebra. Representación esquemática del patrón de distribución de los neuromastos de la línea lateral posterior en larvas de pez cebra desde (A) 32hpf; (B) 48hpf; (C) 3-4 semanas y (D) juvenil. Representación esquemática de la migración de PrimII y PrimD como mecanismos para incrementar el número de neuromastos. En D, se muestran el resultado de la migración de los primordios I, II y D en el número de neuromastos depositados. En E y F se muestra el proceso de “*stitching*” de neuromastos en una larva transgénica *cxcr4b:RFP* mostrando la extensión de células hacia ventral (cabeza de flechas, E-F) y hacia dorsal (Flechas, E-F). Barra 1mm (A-D) y 20µm (E-F). Adaptada de Nuñez y col., 2009 (A-D); adaptada de Wada y col., 2013 (E-F).

La formación de los neuromastos intercalares.

Las células interneuromásticas son una delgada fila de células derivadas del primer primordio y están conectando los neuromastos primarios (Grant y col., 2005). Durante la formación del patrón adulto de la línea lateral del pez cebra, estas células son desplazadas hacia ventral, alejándolas del mioseptum horizontal donde fueron inicialmente depositadas. Esta ventralización coincide con el inicio de su proliferación y consecuente acumulación en grupos discretos de células. Esta acumulación resulta en la diferenciación local y espaciada de las células interneuromásticas hacia nuevos neuromastos denominados neuromastos intercalares (IC) (Grant y col., 2005; Lush and Piotrowski, 2014; López-Schier and Hudspeth, 2005; Nuñez y col., 2009; Sapède y col., 2002). Este fenómeno de formación de neuromastos IC, ha sido ampliamente estudiado, y se ha mostrado que las células de Schwann asociadas al nervio de la línea lateral juegan un papel clave regulando la temporalidad de la proliferación de estas células y así evitando la formación temprana o ectópica de los neuromastos IC. Se observó que la carencia de células gliales en la línea lateral ya sea en mutantes para *Sox10* y componentes de la vía de señalización ErbB o en ausencia del ganglio de la línea lateral (mutantes de neurogenina, o extirpación mecánica del ganglio) presentan activación temprana de las células interneuromásticas y por tanto formación anticipada de los neuromastos intercalares, denominándose neuromastos supernumerarios (Grant y col., 2005; López-Schier and Hudspeth, 2005; Perlin y

col., 2011; Rojas-Muñoz y col., 2009) . Sin embargo, la señalización involucrada en el establecimiento de los diferentes linajes durante la diferenciación de las células interneuromásticas, sólo está siendo recientemente investigada (Lush and Piotrowski, 2014) y no ha sido identificado el o los factores involucrados en la regulación por parte de las células de Schwann sobre las células interneuromásticas. Evidencias preliminares asocian a la interacción célula de Schwann/nervio de la línea lateral como un evento clave para la producción de este factor inhibitorio (Lush and Piotrowski, 2014)

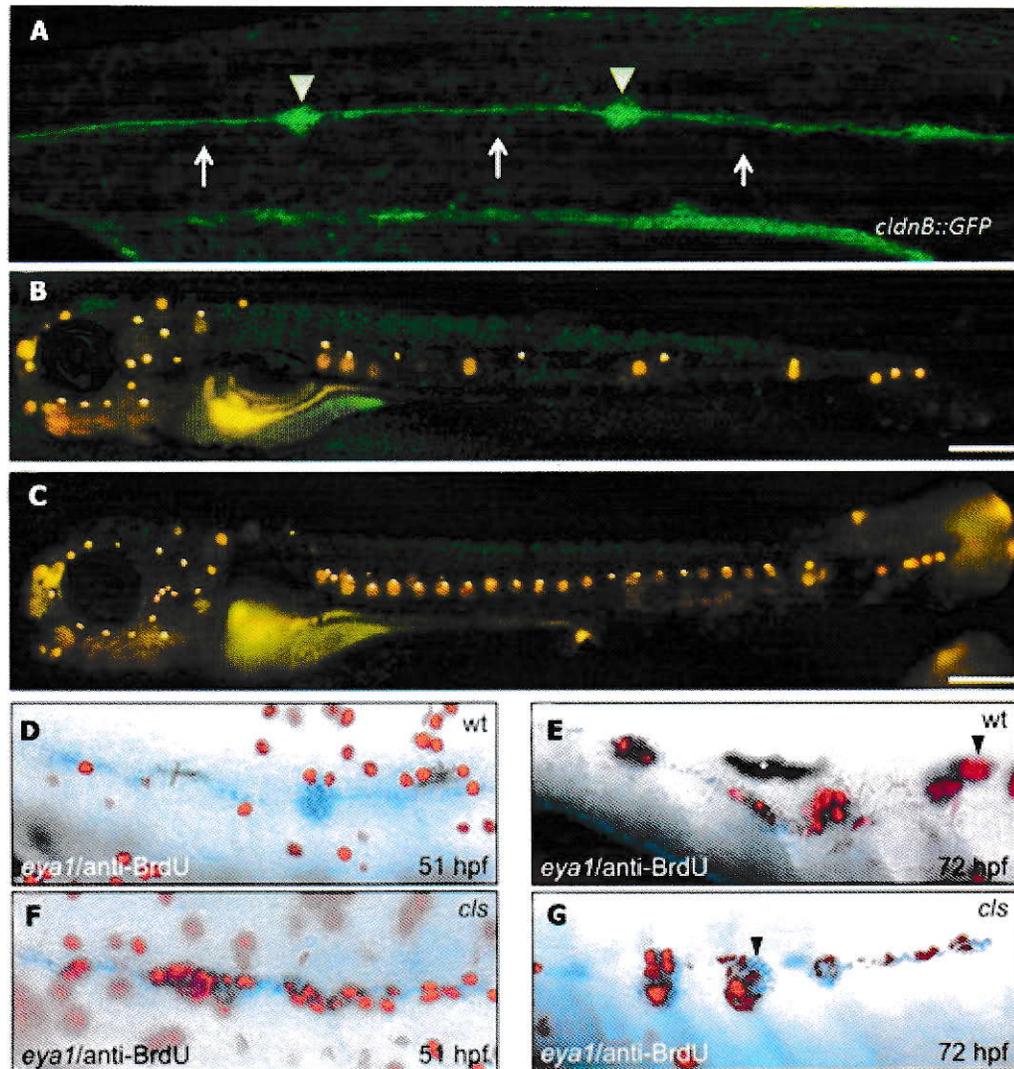


Figura 5: Función de las células interneuromásticas. (A) imagen de microscopia confocal de tiempo extendido, del primI usando la línea transgénica *cldnB:lynGFP*, mostrando las INC depositadas por el primI (flechas) y los neuromastos derivados del PrimI (triángulos). (B) larva “wild type” (WT) de pez cebra de 72 hpf, marcados por la tinción vital de las células ciliadas Di-Asp las células ciliadas de cada neuromasto, el patrón de los neuromastos (puntos fluorescentes) a las 72hpf. (C) pez cebra mutante para neurogenina 1 (no presenta nervio de la línea lateral, ni tampoco células de Schwann asociadas al nervio de la línea lateral), evidencia un número aumentado de neuromastos (2 veces el de la condición WT) (adaptadas de Hernán López-Schier y col., 2004). (D-E) peces WT de 51 y 72hpf respectivamente, en los cuales se realizó ensayos de

incorporación de bromo deoxi Uridina (BrdU, rojo), y en azul, hibridación *in situ* del gen *eyaI* que se expresa en INC y neuromastos. (F-G) peces mutantes *Colourless* (mutantes *sox10*, no presentan células de Schwann en el nervio de la línea lateral) de 51 y 72hpf respectivamente, en los cuales se realizó ensayos de incorporación de BrdU (rojo), y en azul, hibridación *in situ* del gen *eyaI* que se expresa en INC y neuromastos mostrando un aumento de incorporación de BrdU, en comparación a la condición WT (adaptadas de Grant y col., 2005 y López-Schier y col., 2004).

Línea lateral como modelo de regeneración/repación

De los tres componentes principales de la línea lateral (neuromastos, células interneuromásticas, nervio de la línea lateral), los neuromastos han sido estudiados en mayor detalle. La similitud funcional de estas últimas células con aquellas células ciliadas que componen el oído interno de los mamíferos, hacen de la LL del pez cebra un buen modelo de estudio para evaluar la capacidad regenerativa de las células mecanorreceptoras. En este contexto, se observó que la exposición a concentraciones micromolares de metales pesados como mercurio (Liang y col., 2003) y por sobre todo cobre (Hernández y col., 2011; Hernández y col., 2006; Hernández y col., 2007), permiten la destrucción total de las células ciliadas y la regeneración de las mismas, 24h después de haber sido provocado el daño (hpd) (Hernández y col., 2006). Las células también son extremadamente sensibles al tratamiento con algunos antibióticos derivados de aminoglucósidos como la neomicina o gentamicina, evidenciándose su regeneración a las 36 hpd (Harris y col., 2003). Otra estrategia utilizada para eliminarlas es mediante la ablación con láser, después de que se ha comprobado su reaparición entre las 12 y 24 hpd (células ciliadas del oído interno de pez cebra) (Millimaki y col., 2010).

Estos estudios demuestran la capacidad regenerativa de este sistema, sugiriendo la existencia de células progenitoras presentes en cada neuromasto. Este tipo de aproximaciones permiten realizar una eliminación rápida del total de las células ciliadas, pero no eliminar todas las células del neuromasto. Existen pocos trabajos que han enfrentado la problemática de la eliminación de todas las células del neuromasto, algunos de ellos desarrollados en anfibios, los que sugieren que células de neuromastos vecinos pueden adquirir propiedades progenitoras y formar nuevos neuromastos cuando uno es dañado. Esta hipótesis se basa en la migración de una placoda que emergería desde células del manto del neuromasto vecino al dañado (Jones and Corwin, 1993). Si bien este trabajo abordó la problemática, las herramientas experimentales disponibles para trabajar sobre dicho modelo (axolote), en conjunto con la imposibilidad de realizar seguimientos en tiempo real o imágenes de microscopía de tiempo extendido, no han permitido demostrar fehacientemente el origen de las células progenitoras de este nuevo neuromasto. En el modelo adulto de pez cebra, también en muestras fijadas, se ha demostrado que a los pocos días después de cortar la aleta caudal, células de la línea lateral proliferan e invaden el nuevo tejido en crecimiento para dar origen a un nuevo neuromasto (Dufourcq y col., 2006) y al igual que el trabajo en axolote, no fue posible identificar la célula responsable de la regeneración. Trabajos recientes en nuestro laboratorio, usando líneas transgénicas que expresan la proteína fluorescente verde (GFP) en células de la línea lateral, han mostrado que luego de un corte de la cola de peces adultos ocurre movilización de células del manto y/o interneuromásticas que permiten la aparición de nuevos neuromastos en el nuevo

tejido recién regenerado (Camila Mardones datos no publicados, ver Figura 5). Esto sugiere que componentes celulares de la línea lateral mantienen la propiedad de células progenitoras y que esta situación está presente en estadios post-larvales. A pesar de esto, en nuestro laboratorio hemos observado que posterior al tratamiento con altas concentraciones de sulfato de cobre ($>100\mu\text{M}$), la cual destruye y elimina todas las células de todos los neuromastos, no se observa regeneración de ellos. Esta dualidad en la capacidad de regenerar sugiere dos posibles escenarios: (1) existen células o moléculas capaces de inhibir el proceso de regeneración bajo las condiciones experimentales posterior al tratamiento con sulfato de cobre, que no están presentes en el modelo de corte de cola. O bien, (2) los estadios larvarios no tienen la capacidad de regenerar neuromasto completos y la capacidad de regenerar la línea lateral es una capacidad adquirida en estadios adultos. En base a los antecedentes anteriormente mostrados, en que las células interneuromásticas tienen la capacidad de formar neuromastos enteros, y que esta capacidad está inhibida por la presencia de las células de Schwann, nosotros pensamos que un buen candidato de progenitor multipotente para regenerar la línea lateral, son las células interneuromásticas, y que su activación está sujeta a la regulación por parte de las células de Schwann.

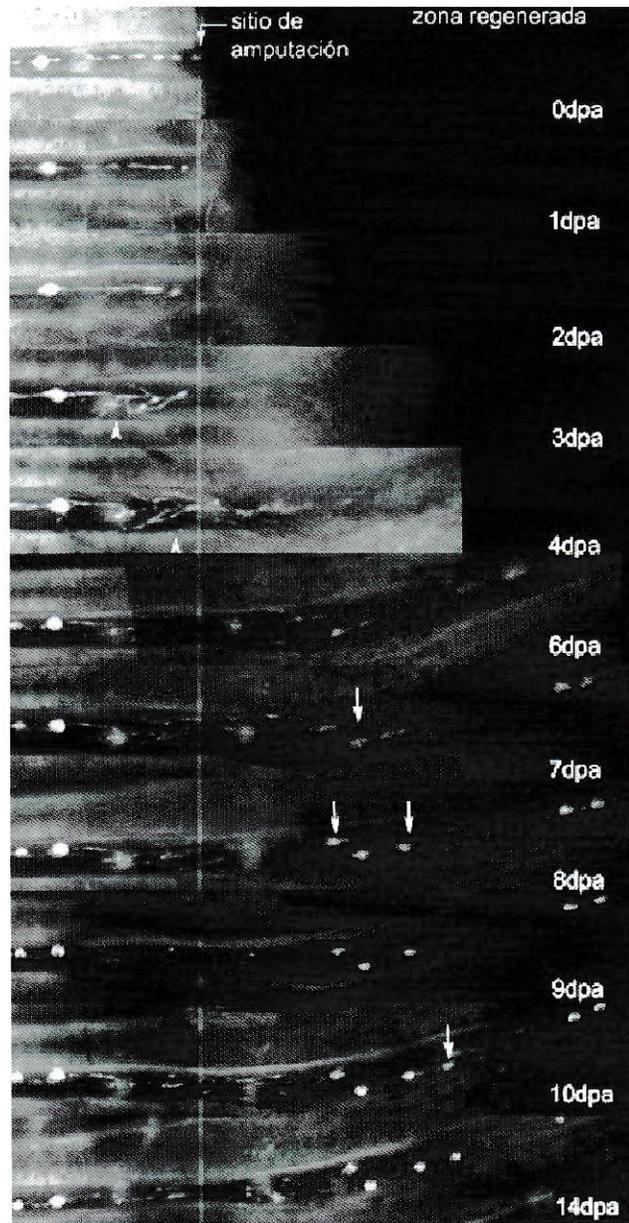


Figura 6: Regeneración de línea lateral caudal de pez cebra adulto transgénico Et20 (expresa GFP en células del manto e INC). Resumen de regeneración de LLC desde 0 dpa hasta 14dpa. Las puntas de flecha indican los puntos en donde comienzan las ramificaciones de las INC, mientras que las flechas indican neuromastos generados *de novo*. Línea vertical: plano de amputación. dpa: días post- amputación. Camila Mardones datos no publicados.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

Como modelo experimental se utilizaron peces adultos y larvas de pez cebra (*Danio rerio*) obtenidas desde cruces de peces adultos. Los peces se mantuvieron bajo ciclos de 14h de luz y 10h de oscuridad en acuarios de circulación constante agua (agua de osmosis inversa salinizada con “Instant Ocean”, 60mg/L) a 28°C, pH 6,5-7,0 (ajustados con NaHCO₃), burbujeo constante de aire y conductividad entre 400 y 600µS (Westerfield 2000). Los embriones y larvas se mantuvieron en incubadoras a 28°C con ciclos de luz/oscuridad 14/10h respectivamente, en placas Petri con medio E3 (NaCl 5 mM; KCl 0,17 mM; CaCl₂ 0,13mM; MgSO₄ 0,33mM) o E3 + 0,1% de azul de metileno. Los estadios de desarrollo de las larvas fueron determinados como se ha descrito previamente (Kimmel y col., 1995) y se expresan en horas post fecundación (hpf) o días post fecundación (dpf). Todos los animales sujetos a experimentación fueron anestesiados con MS – 222 (tricaina; A5040; Sigma, Saint Louis, MO, USA).

En este trabajo se utilizaron las siguientes líneas de peces descritas en la tabla 1.

Tabla 1. Líneas transgénicas del pez cebra utilizadas en esta tesis, tipos celulares marcados y tipo de marca.

Línea transgénica	Células marcadas	Tipo de marca	Referencia
<i>Tg(-8.0Cldnb:lynGFP)</i>	Todas las células del sistema de la LL	GFP de membrana	Haas y Gilmour, 2006.
<i>Tg(cxcr4b:mCherry)^{ump1}</i>	Todas las células del neuromasto, células interneuromásticas, células musculares.	mCherry de membrana	Gamba y col., 2010.
<i>Tg(brn3c:gap43-GFP)^{s3561}</i> <i>o Brn3:GFP</i>	Células ciliadas	GFP de membrana	Xiao y col., 2005.
<i>TgBAC(neurod:EGFP)^{nl1}</i>	Neuronas del ganglio de la línea lateral	GFP citoplasmática	Obholzer y col., 2008.
<i>Et(krt4:EGFP)sqet20</i> <i>o ET20:GFP</i>	Células del manto e interneuromásticas	GFP citoplasmática	Parinov y col., 2004
<i>Tg(foxd3:GFP)^{zfl04}</i>	Células de Schwann del sistema de la línea lateral	GFP citoplasmática	Gilmour y col., 2002
<i>Tg(Ubi:zebrabow:cherry)</i>	Todas las células del pez	RFP citoplasmática	Pan y col., 2013.

Tabla 2. Marcadores de diferenciación celular en la línea lateral

Marcador	Tipo celular en la línea lateral
FoxD3	Células de Schwann de la LL en todos sus estadios de diferenciación.
MBP	Células de Schwann de la línea lateral maduras.
Et20 ⁻ Sox2 ⁺	Célula progenitora basal del neuromasto.
Et20 ⁺ Sox2 ⁺	Célula del manto del neuromasto.
Et20 ⁺ Sox2 ⁻	Célula interneuromástica.
Brn3c ⁺	Célula ciliada madura.
Atoh1 α	Progenitor unipotente de célula ciliada.
NeuroD	Neurona del nervio de la línea lateral.

2. Inhibición de la señalización ErbB

La inhibición de la migración de las células de Schwann en el nervio de la línea lateral fue realizada mediante incubación con 5 μ M del inhibidor AG1478 (Lyons y col., 2005) a concentración final de DMSO 0,05%(v/v) en oscuridad de embriones en estadio 10hpf y fue mantenido hasta las 58hpf a 28,5°C en E3. Larvas controles fueron incubadas de manera similar en medio E3 con 0,05% DMSO. Posterior a las 58hpf las larvas fueron mantenidas en medio E3 sin azul de metileno.

3. Experimentos de trasplantes

Embriones donantes y receptores fueron mantenidos en medio E3 hasta un estadio temprano de desarrollo (*high stage*, 3 1/3hpf) (Kimmel y col., 1995). En este estadio ambos grupos fueron decorionados mediante incubación con pronasa a una concentración de 0,2mg/mL en medio Holtfreter modificado (NaCl 59mM; KCl 0,67mM; CaCl₂ 0,9mM; MgSO₄ 0,81mM; NaHCO₃ 2,38mM). Luego, fueron mantenidas en medio Holtfreter modificado con penicilina/estreptomicina (5000 U/L; 100 mg/L; respectivamente). Aproximadamente 10-20 células del embrión donante fueron aspiradas y transplantadas en el embrión receptor usando una micropipeta de vidrio conectada a una jeringa de 1mL como fue previamente descrito (Ho y Kane, 1990). Los embriones receptores fueron mantenidos durante 24h en medio Holtfreter modificado con penicilina/estreptomicina en placas Petri de vidrio. A partir de las 24hpf los embriones fueron mantenidos en medio E3 y

observados a 48hpf para la identificar la presencia de INC marcadas en la línea lateral.

4. Tratamientos con sulfato de cobre

Para eliminar todas las células de todos los neuromastos de la línea lateral, las larvas de 3dpf fueron incubadas en 100 μ M de sulfato de cobre en medio E3 sin azul de metileno en placas Petri durante 2h a 28°C. Posterior al tratamiento fueron lavadas en medio E3 sin azul de metileno y sin sulfato de cobre en 3 ocasiones y luego cambiadas a una placa Petri nueva.

5. Inmunofluorescencia

Inmunohistoquímica para GFP y MBP (proteína básica de la mielina): larvas de diferentes estadios fueron fijadas en paraformaldehído 4% p/v en PBS1x-Tween20 0,05% v/v a 4°C durante 16h o 2h a temperatura ambiente, luego lavadas en 3 ocasiones por 5 min cada una en PBT (PBS 1X y Tween20 al 0,1% v/v). Posterior a esto, las larvas fueron deshidratadas mediante lavados secuenciales en metanol/PBT: 25%/75%; 50%/50%; 75%/25% y 100% metanol, en lavados de 5 min cada uno y finalmente almacenadas a -20°C hasta su utilización. Luego las larvas fueron rehidratadas mediante lavados secuenciales en PBT/metanol: 25%/75%; 50%/50%; 75%/25% y 100% PBT. Luego fueron permeabilizadas con Proteinasa K (40 μ g/mL en PBT, 40 min para larvas de 3dpf, 70 min para larvas de 5-7dpf), 3 lavados de 5 min cada uno en PBT, refijadas en paraformaldehído 4% p/v en PBS1x-Tween20 0,05% v/v por 20 min a temperatura ambiente. Las larvas

fueron tratadas con 3 ciclos de lavados en tampón citrato de sodio (10mM, pH 6,0) de 10 min cada uno, seguidos por un lavado a 90°C y 3 veces por 5 min cada una, luego fueron transferidas a solución de bloqueo (2% p/v suero de cabra, 1% p/v BSA, 1%DMSO, 0,1% v/v TritonX-100) durante al menos 1hr a temperatura ambiente. Posteriormente fueron incubadas en solución de bloqueo más anticuerpo primario hecho en conejo anti-MBP (1:50, gentilmente facilitado por Dr. William Talbot) y el anticuerpo primario monoclonal hecho en ratón anti-GPF (1:500, Millipore, MAB3580) durante 16-20h a 4°C. Posterior a esto fueron lavados 4 veces por 20 min cada uno a temperatura ambiente e incubados en solución de bloqueo más anticuerpos secundarios Alexa594 anti-conejo hecho en cabra (1:2000; Invitrogen, A31632) y Alexa488 anti-ratón hecho en cabra (1:2000; Invitrogen, A11029) durante 2h a temperatura ambiente o 16-20h a 4°C. A continuación fueron incubadas con la tinción nuclear TO-PRO-3 (1:250; Invitrogen, T3605) durante 20 min a temperatura ambiente y lavadas 6 veces por 10 min cada uno en PBT. Luego fueron almacenadas en PBS 1X a 4°C durante un máximo de 4 días en oscuridad.

Para la inmunohistoquímica de reconocimiento de Sox2, las larvas nunca fueron deshidratadas en metanol. Tampoco fueron permeabilizadas con proteinasa K y no fueron tratadas con citrato. Las larvas fueron fijadas de similar manera que para la inmunohistoquímica contra MBP, luego lavadas en PBT y trasladadas a solución de bloqueo durante 1hr a temperatura ambiente. Posterior a esto fueron incubadas con el anticuerpo primario anti-Sox2 hecho en conejo diluido a 1:500

(Abcam, ab97959) y el anticuerpo primario monoclonal hecho en ratón anti-GPF (1:500, Millipore, MAB3580) en solución de bloqueo durante 16-20h a 4°C. Posterior a esto, fueron lavados 4 veces por 20 min cada uno a temperatura ambiente e incubados en solución de bloqueo más anticuerpos secundarios Alexa594 anti-conejo hecho en cabra (1:2000; Invitrogen, A31632) y Alexa488 anti-ratón hecho en cabra (1:2000; Invitrogen, A11029) durante 2h a temperatura ambiente o 16-20h a 4°C. A continuación fueron incubadas con la tinción nuclear TO-PRO-3 (1:250; Invitrogen, T3605) durante 20 min a temperatura ambiente y lavadas 6 veces por 10 min cada uno en PBT. Luego fueron almacenadas en PBS 1X a 4°C durante un máximo de 4 días en oscuridad.

6. Adquisición de imágenes y “*time lapse*”

La adquisición de imágenes *in vivo* fue realizada anestesiando las larvas transgénicas en 0,01% p/v de Tricaina y montadas en agarosa de bajo punto de fusión 0,75-1% p/v en E3 con 0.01% p/v de Tricaina. Para la microscopia *time lapse* las imágenes fueron adquiridas con diferentes tiempos de captura y número de cortes ópticos. La adquisición de imágenes de inmunohistoquímica fue realizada montando las larvas en agarosa de bajo punto de fusión 0,75-1% p/v en PBS1X. Para la adquisición de imágenes fueron utilizados un microscopio confocal (Zeiss LSM 510 meta) y un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX81).

El ensamblaje de las imágenes fue realizado de manera manual utilizando Adobe Photoshop CS5. El procesamiento de cada foto incluye proyección máxima de los cortes ópticos además de alteraciones de brillo y contraste mediante imageJ.

IV. Resultados

1. Caracterización del comportamiento de los diversos componentes celulares de la línea lateral de pez cebra en respuesta al daño de un neuromasto que ha perdido todas sus células.

Nos planteamos investigar la contribución de: (1) el nervio de la línea lateral; (2) las células de Schwann; (3) las INC y (4) los neuromastos no intervenidos en cuanto a su papel en la restitución de un neuromasto después de su eliminación. Entre los métodos físicos de daño disponibles en el laboratorio, el procedimiento del corte de la cola (Dufourcq y col., 2006) resulta inadecuado debido a que, a diferencia de estadios adultos del pez cebra, los neuromastos en estadios larvales están ubicados en la cercanía del tejido muscular y vasos sanguíneos importantes, por lo cual la sección caudal resulta en una muy baja sobrevivencia de la larva. Por otro lado, los métodos químicos, como la incubación con sulfato de cobre (Hernández y col., 2006), dañan o eliminan todos los neuromastos de la larva impidiendo estudiar la contribución de ellos en la regeneración. Por lo tanto, para este objetivo fue necesario desarrollar una nueva metodología de daño localizado de neuromastos en larvas del pez cebra.

1.1. Desarrollo de una metodología que permita la eliminación completa de un neuromasto en larvas de pez cebra.

1.1.1. Electroablación como método de daño localizado

Para establecer un protocolo que permita generar daño tisular localizado sin afectar la sobrevivencia de la larva, se utilizaron la incorporación de trazadores celulares denominada iontoforesis (Alheid y Carlsen, 1982). En nuestro diseño experimental (Figura 7), acoplamos una fuente generadora de pulsos de corriente (AM System, model 2010, Stoelting) a un microelectrodo de Tungsteno (número de catálogo UEWMGGSEBN1M, FHC Inc., Bowdoin, ME, USA) el cual se encuentra acoplado a un micromanipulador (Narishige M-152). Como se observa en la Figura 7a, este sistema fue montado en un microscopio de epifluorescencia convencional. Con este sistema de generación de pulsos de corriente, fue posible regular la cantidad de daño generado variando: (1) el número de pulsos de corriente; (2) su duración del pulso de corriente y (3) la magnitud de la corriente aplicada. Mediante el uso de anaranjado de acridina, luego de la aplicación de la corriente, fue posible observar el incremento de muerte celular generada por el aumento en la magnitud de la corriente aplicada (Figura 7d-g). Otro punto fundamental fue la inmovilización de la larva durante la aplicación de la corriente. Para ello, fue necesario montar las larvas en agarosa de bajo punto de fusión entre 0,75%-1% p/v en E3 y 0,01% p/v de tricaina. Este rango de concentración de agarosa permite el correcto balance entre rigidez y flexibilidad de la agarosa. Un mayor porcentaje de agarosa dificulta el movimiento del electrodo, y por tanto

disminuye la precisión, mientras que un porcentaje menor al 0,75% p/v dificulta la gelificación y por tanto impide la inmovilización de las larvas. Esta metodología fue denominada electroablación (Moya-Díaz y col., 2014) y se incorpora como resultado a esta tesis porque fue fundamental para responder las preguntas planteadas.

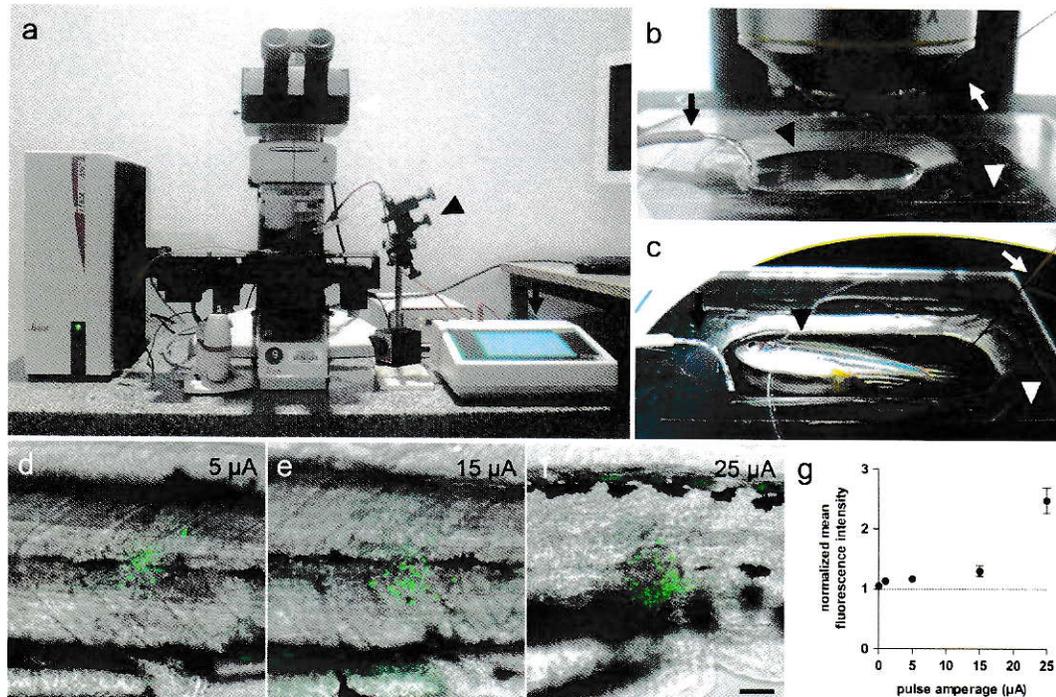


Figura 7: Disposición del equipo de electroablación y la dependencia del daño tisular con el amperaje. (a-c) disposición del equipo de electroablación en (b) larvas de pez cebra y (c) en adultos. (a, flecha negra) fuente generadora de pulsos. (a, cabeza de flecha negra) micromanipulador. (a, cabeza de flecha blanca) microscopio de epifluorescencia. (b) acercamiento al sistema de montaje de larvas. (b, flecha blanca) microelectrodo. (b, cabeza de flecha blanca) soporte acrílico para montaje. (b, cabeza de flecha negra) larvas montadas en agarosa de bajo punto de fusión. (verde, d-f) superposición de luz transmitida y anaranjado de acridina, mostrando la expansión de la incorporación del marcador de muerte celular con el aumento de la corriente aplicada. Los pulsos aplicados (5 - 25 μA) fueron aplicados durante 1 segundo y la tinción de anaranjado

de acridina fue realizada 2h posteriores al daño. (g) cuantificación de la marca de anaranjado de acridina, la intensidad promedio de fluorescencia fue medida en un área circular de 50 μ m de radio y normalizada por una zona no dañada de similares características. Los valores están expresados en promedio normalizados \pm SEM desde 15-21 larvas por condición, desde 3 experimentos independientes. Barra, 50 μ m.

1.1.2. Electroablación como método de daño a un neuromasto único.

Para aplicar la electroablación como método de daño a un neuromasto único, sin intervenir los neuromastos cercanos al punto de aplicación de la corriente, fue necesario establecer un protocolo reproducible de daño. Mediante el uso de la línea transgénica *cxcr4b:mCherry*, que expresa la proteína fluorescente roja mCherry en todas las células del neuromasto y en las INC, se estableció que la aplicación local de 2 pulsos de corriente de 8 μ A durante 2seg cada uno es suficiente para eliminar completa y selectivamente un neuromasto. Como se puede observar en la Figura 8, luego de la aplicación de este protocolo en el tercer neuromasto de la línea lateral primaria (L3), fue posible eliminar completamente dicho neuromasto y observar que en ninguno de los casos evaluados (n=60 peces; 3 experimentos independientes) fueron encontradas células remanentes del neuromasto (con fluorescencia roja) en la zona de aplicación de la corriente (Figura 8C-D).

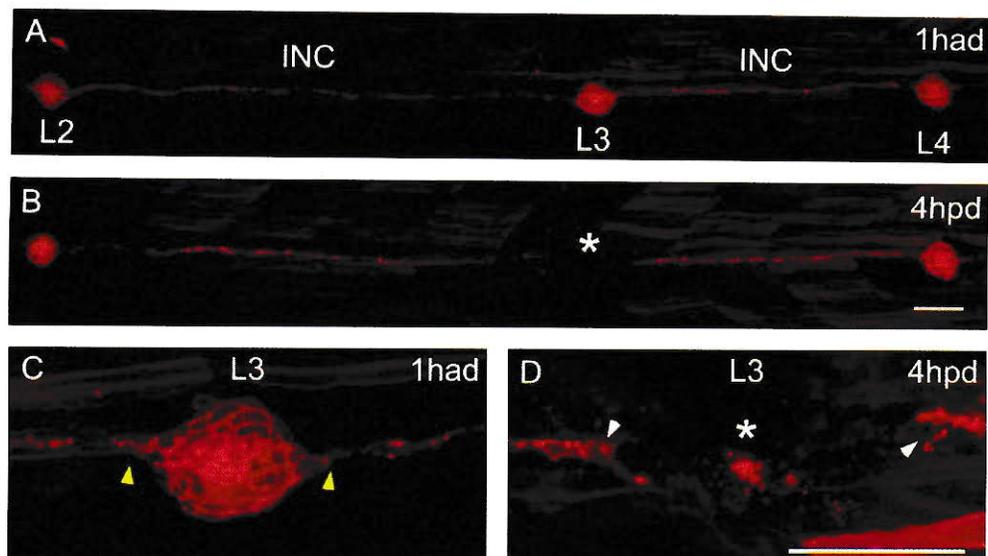


Figura 8 Electroablación como método de daño a un neuromasto único. Larva *tg(cxcr4b:mCherry)* de 3 dpf 1h antes del daño (1had, A, C), 4h posteriores al daño (4hpd, B, D). Segundo, tercer y cuarto neuromasto de la línea lateral posterior (L2, L3, L4 respectivamente). Células interneuromásticas (INC). Zona de daño (*). Células del interneuromásticas que flanquean al neuromasto (c, cabezas de flechas amarillas). Células interneuromásticas que flanquean la zona de daño (D, cabezas de flechas blancas). Detalle del neuromasto L3 antes del daño (C) y después del daño (D). Barra 50 μ m.

1.1.3. Daño de un neuromasto por electroablación da paso a la regeneración de un neuromasto único.

Se estableció que la aparición de al menos dos células ciliadas constituye evidencia de que un neuromasto ha regenerado todos los tipos celulares que lo componen. Se examinó *in vivo* en larvas doble transgénicas *cxcr4b:mCherry* y *brn3c:GFP* (expresan GFP de membrana en células ciliadas diferenciadas) la capacidad de regenerar de un neuromasto único luego de la electroablación del neuromasto L3. Observamos que, 24h post daño (hpd), ninguna de las larvas exhibe aparición de células ciliadas en la zona de daño. Veinticuatro horas más

tarde (48hpd) fue posible observar la aparición de neuromastos con células ciliadas maduras en un $29,2 \pm 2,2\%$ y a 72hpd un $58,2 \pm 4,4\%$ ($n = 100$; tres experimentos independientes). El porcentaje alcanzado a las 72hpd no se ve alterado a las 96hpd, lo que sugiere que los peces que no regeneraron el neuromasto en este lapso de tiempo, no lo harán en los tiempos posteriores (Figura 9).

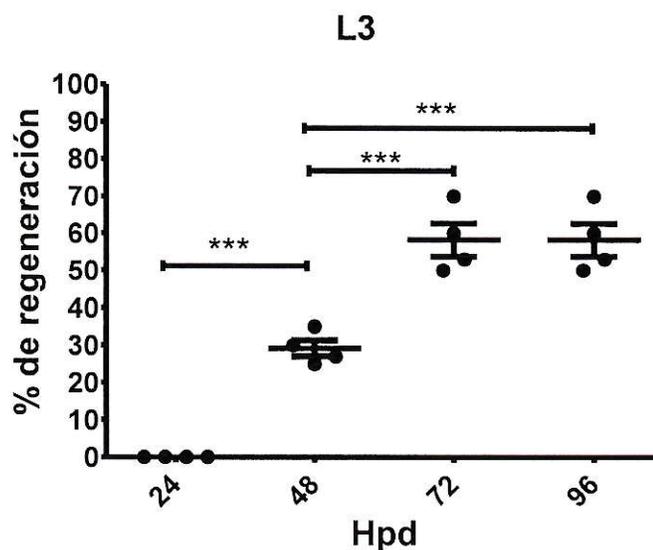


Figura 9: Electroablación del neuromasto L3 permite la regeneración a partir de 48 hpd. Porcentaje de regeneración posterior al daño del neuromasto L3 mediante aplicación local de 2 pulsos de corriente de $8\mu\text{A}$ durante 2seg cada uno con un microelectrodo de tungsteno de $1\text{M}\Omega$. El porcentaje de regeneración fue cuantificado a las 24, 48, 72 y 96hpd contando el número de larvas doble transgénicas *tg(brn3c:GFP; cxcr4b:mCherry)*, que presenten al menos 2 células ciliada Brn3c^+ en el neuromasto en regeneración del total de larvas analizadas. A 24hpd 0%, 48hpd $29,2 \pm 2,2\%$, 72hpd $58,2 \pm 4,4\%$ y a 96hpd $58,2 \pm 4,4\%$ ($n = 100$; cuatro experimentos independientes).

1.1.4. Caracterización del daño a los tejidos subyacentes

1.1.4.1. Daño a la piel y tejido muscular

Debido a que la metodología empleada genera un daño local pero no específico en el neuromasto, analizamos el efecto de la electroablación en los tejidos cercanos al neuromasto. Para ello, como primera aproximación, larvas *tg(cldnb:GFP)* (expresan GFP destinada a membrana en todos los tipos celulares del sistema de la línea lateral y células de la piel) fueron incubadas 30 min antes de la electroablación en el marcador vital de *Bodipy-TR metil ester* (Life technologies, C34556) que es incorporado en todas las células de la larva marcándolas con fluorescencia roja, 20 minutos después de eliminar el neuromasto L3 cortes ópticos de 1,5µm fueron adquiridos mediante microscopia confocal desde la piel de la larva (células hexagonales GFP positivas, Figura 10A y B desde 0,0µm hasta 7,5µm) hasta el tejido muscular (células alargadas rojas, Figura 10A y B desde 9,0µm hasta 34,5µm). En las larvas dañadas se observó desorganización de las células de la piel en el punto de aplicación de la corriente. Este daño es reparado durante las primeras 24hpd (Figura 11). En conjunto con el daño a la piel y como se había mencionado anteriormente, la corriente aplicada elimina todas las células del neuromasto L3. Como se observa en los peces control (Figura 10A), el neuromasto corresponde a una agrupación compacta de células (GFP positivas, cabeza de flecha, Figura 10A) que fue completamente eliminada por la electroablación (asterisco, Figura 10B). Dada la proximidad de las INC a la piel de la larva y su estereotipada distribución a lo largo del mioseptum horizontal, fue

posible cuantificar la extensión lateral del daño midiendo la distancia existente entre las dos INC que flanquean al neuromasto dañado (Figura 8D, cabezas de flechas blancas). El distanciamiento generado entre dichas células fue de $55,8 \pm 26,3 \mu\text{m}$ ($n=22$, 3 experimentos independientes) y no observamos retracción de las INC posterior al daño dando cuenta que la distancia medida corresponde a la extensión lateral del daño. Por otro lado, la profundidad del daño fue observada mediante la pérdida de señal roja de la tinción *Bodipy-TR methyl ester* y por la desorganización del tejido muscular. Como se observa en la Figura 9, comparando la larva control con la larva intervenida (Figura 10A y B), se observó el daño y la desorganización del tejido muscular desde los $9,0 \mu\text{m}$ hasta los $27 \mu\text{m}$ (Figura 10B), lo que refleja la extensión del daño generado por la electroablación.

Para evaluar muerte celular, se usó la línea transgénica *cxcr4b:mCherry* en conjunto con la tinción de anaranjado de acridina (marca en verde y rojo células muertas o en proceso de muerte). Como resultado del daño, se observó, entre 2-15hpd, muerte celular sólo en tejidos cercanos a la línea lateral y acotada a un área cercana al punto de aplicación de la corriente (Figura 12). En la región dañada, las células del neuromasto son eliminadas en el momento de aplicación del pulso, por lo que no se marcan con anaranjado de acridina. En ninguno de los casos analizados se observó muerte celular luego del daño en alguno de los componentes celulares de la línea lateral.

Los axones del nervio de la línea lateral posterior, recubiertos por células de Schwann, están situados entre los neuromastos y el tejido muscular, por lo que se ubican en un territorio crítico para ser dañados por la electroablación. Analizamos,

por separado, ambos tipos celulares debido a su importancia para el sistema sensorial en estudio, a saber: (1) el nervio de la línea lateral posterior (nPLL) es clave debido a su rol en la funcionalidad del sistema de la línea lateral (conducción del impulso nervioso), y en la migración y diferenciación de las células de Schwann asociadas a él durante la formación y maduración del sistema de la línea lateral. Por otro lado, (2) las células de Schwann son fundamentales para controlar la proliferación de las INC (Grant y col., 2005; Lush y Piotrowski, 2014; López-Schier y Hudspeth, 2005). Cualquier alteración en estos componentes puede inducir cambios en la funcionalidad del sistema, en la capacidad de inhibir la proliferación de las INC o bien favorecer o retrasar el proceso de regeneración.

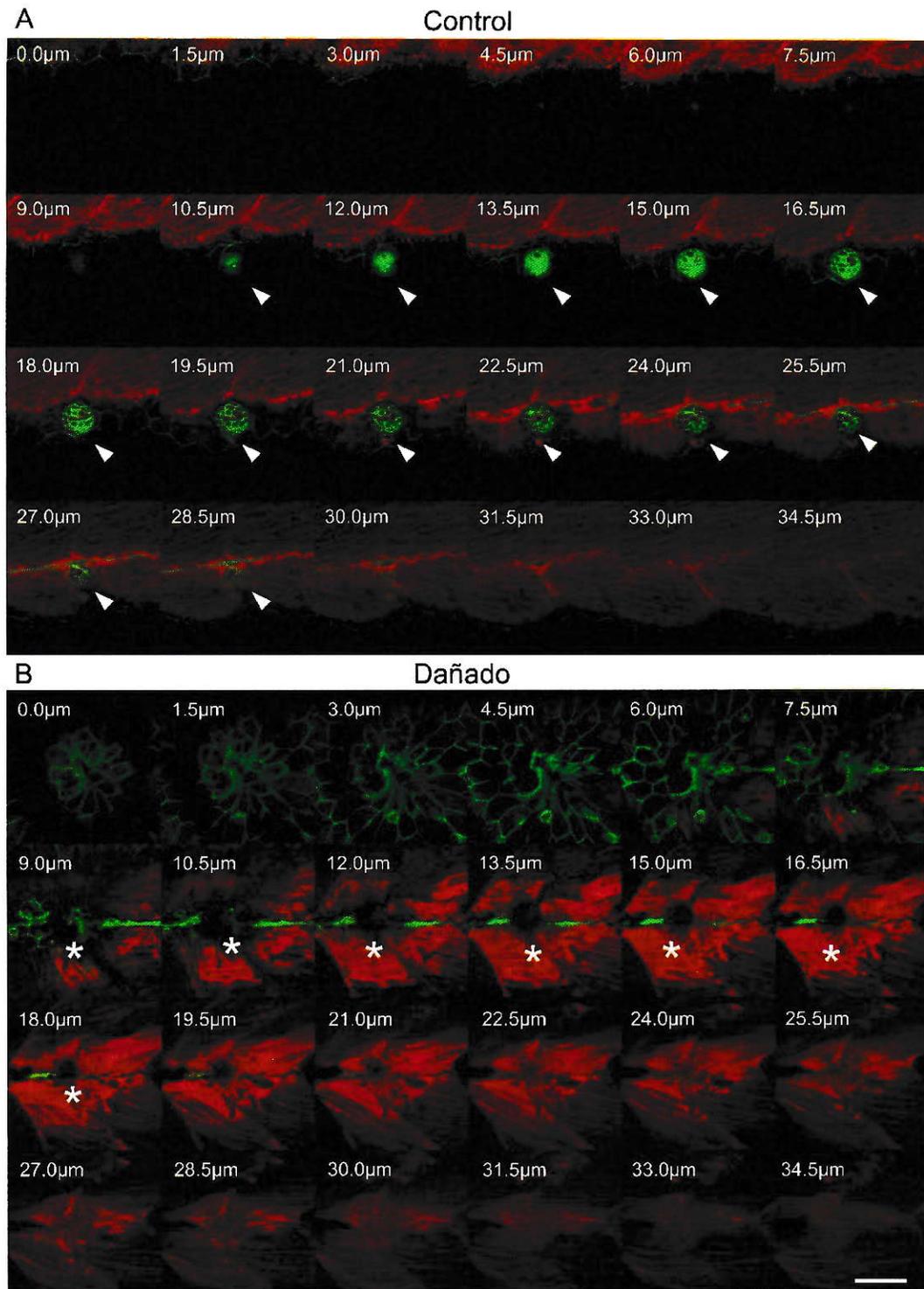


Figura 10 Extensión del daño infligido por la electroablación. Línea transgénica *Tg(-8.0cldnB:lynGFP)*, la cual expresa GFP en las membrana de todos los componentes de la línea lateral y células de la piel, fue teñida con BODIPY. La larva

teñida fue montada y electroablacionada en el neuromasto L3. Cortes ópticos confocales con un espaciamento de $1,5\mu\text{m}$ en peces control (a) y larva dañada (b) neuromastos control (a, cabeza de flechas blancas) y zona de daño (b, asterisco). Barra $50\mu\text{m}$.

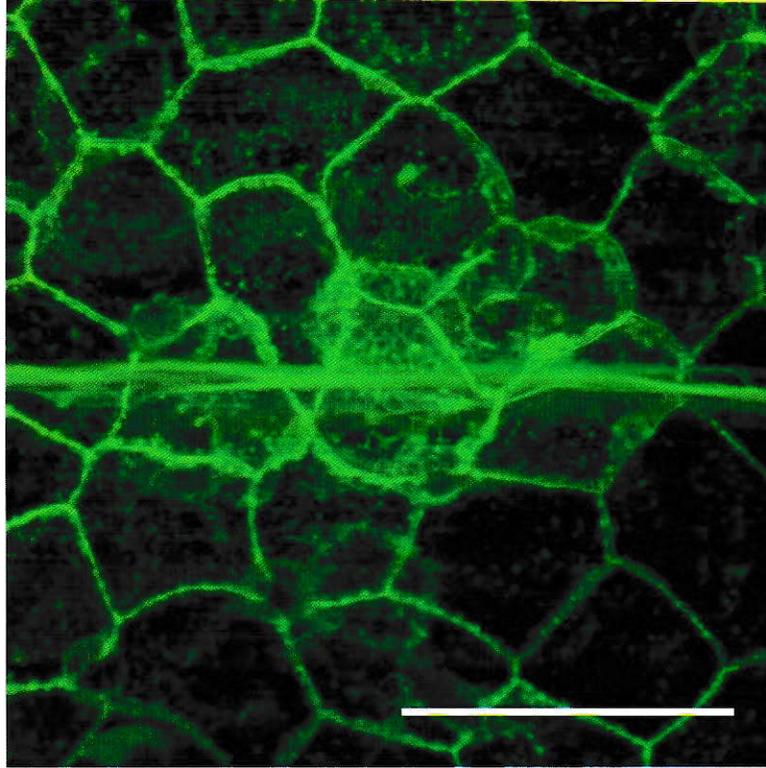


Figura 11 Reparación de las piel posterior al daño. Larva trasgenica *Tg(-8.0cldnB:lynGFP)* evidenciando la reparación de la piel 24hpd. Barra $50\mu\text{m}$.

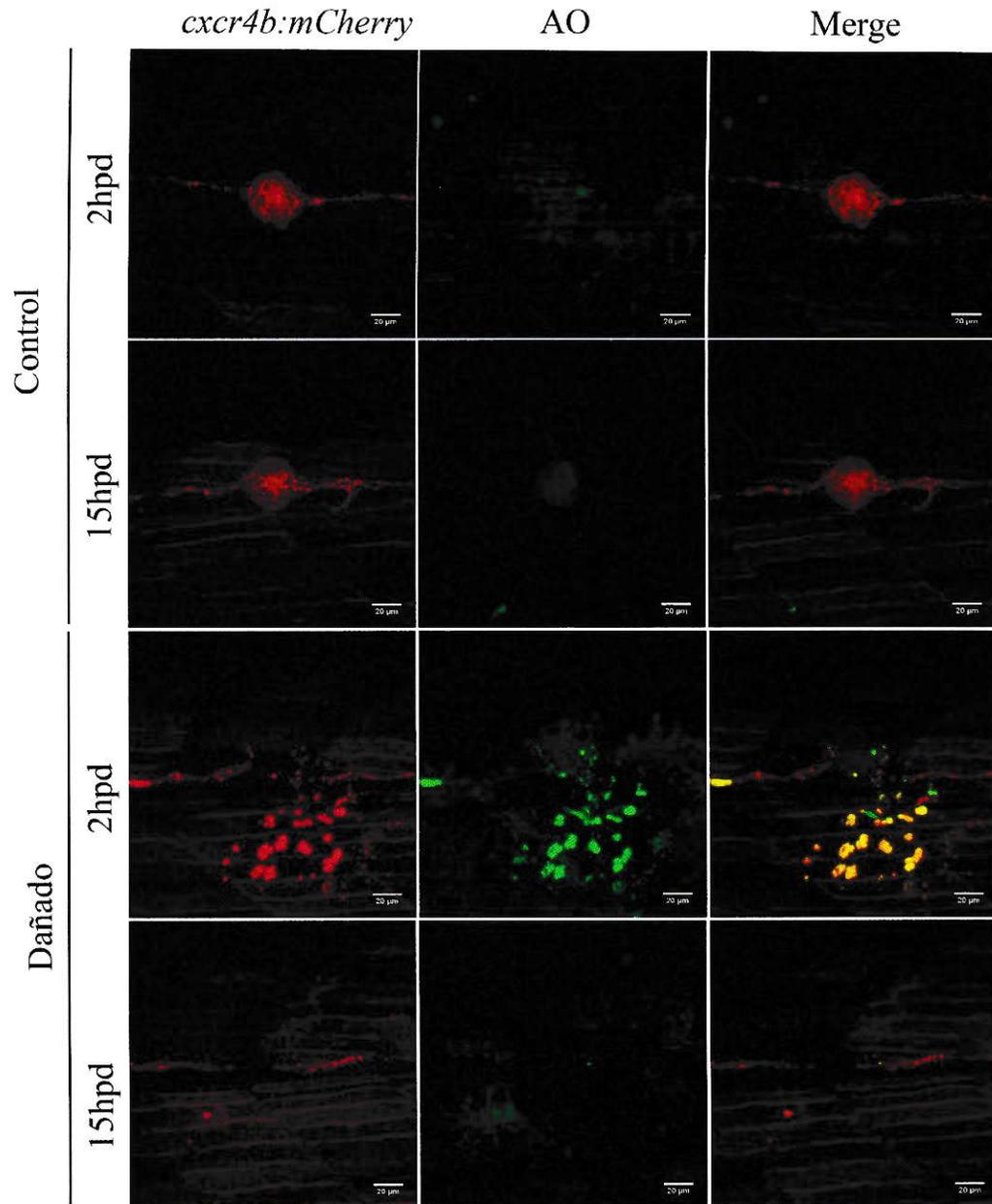


Figura 12: Muerte celular posterior al daño. Daño generado por la aplicación de 2 pulsos de corriente de $8\mu\text{A}$ durante 2seg cada uno. “Rojo”, *tg(cxcr4b:mRFP)*; “Verde y Rojo”, anaranjado de acridina (AO). Escala $20\mu\text{m}$

1.1.4.2. Daño al nervio de la línea lateral posterior

Mediante el uso de la línea transgénica *tg(BACNeuroD:GFP)*, que expresa GFP en las neuronas del ganglio de la línea lateral, analizamos la integridad y comportamiento de los axones de la línea lateral posterior luego de la electroablación de un neuromasto. Como consecuencia del daño, todos los axones del nervio fueron interrumpidos (Figura 13B, cabezas de flechas blancas y Figura 14A y E, asterisco) y se indujo la degeneración de la porción caudal de estos (Figura 14A y E, cabezas de flechas; 100%, n=30, 3 experimentos independientes). Luego de 30hpd, el nPLL regenera por crecimiento de los axones interrumpidos (Figura 14B, C, E, F). Durante dicho proceso, observamos la defasciculación de una fracción de los axones (Figura 13C, cabeza de flecha amarilla y Figura 14B, C, E, F; flechas blancas), que persistió en la zona de daño durante la regeneración del neuromasto. Como consecuencia de la neurectomía, se generan dos condiciones contrapuestas en los neuromastos adyacentes a la zona de daño: (1) la de los neuromastos más rostrales al daño (L1, L2 y los neuromastos secundarios) que se mantienen correctamente inervados y, (2) la de los neuromastos caudales al daño (L4-L8) que pierden su inervación de manera temporal. Luego de la regeneración axonal, todos los neuromastos quedan correctamente inervados restituyéndose la condición inicial.

Nervio de la línea lateral posterior

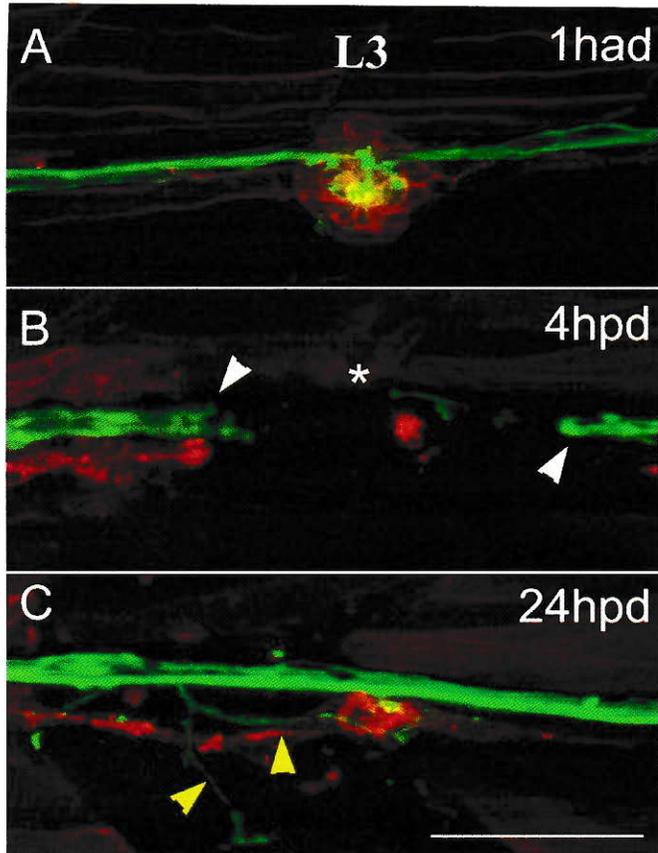


Figura 13: La electroablación del neuromasto L3 resulta en una axotomía del nervio de la línea lateral posterior. Larva *tg(cxcr4b:mCherry;BACNeuroD:GFP)*, 1h antes del daño en el neuromasto L3 (1had, A). 4h posteriores al daño (4 hpd, B) mostrando la completa axotomía del nervio de la línea lateral (B, cabezas de flechas blancas). Y 24h posteriores al daño (24hpd, C), mostrando la restauración del nervio de la línea lateral posterior y la defasciculación de algunos axones (C, cabeza de flechas amarillas). Barra 200 μ m.

Nervio de la línea lateral posterior

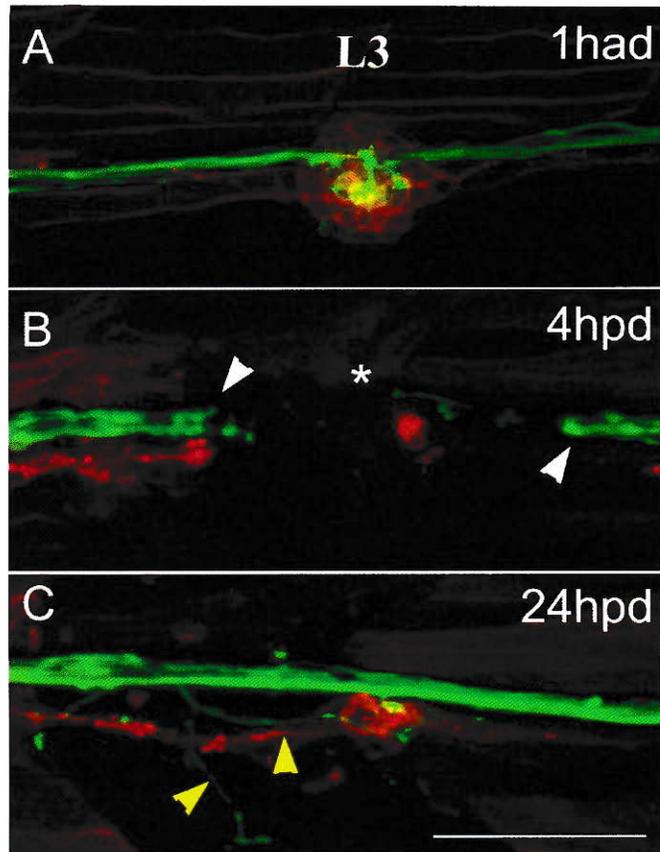


Figura 13: La electroablación del neuromasto L3 resulta en una axotomía del nervio de la línea lateral posterior. Larva *tg(cxcr4b:mCherry;BACNeuroD:GFP)*, 1h antes del daño en el neuromasto L3 (1had, A). 4h posteriores al daño (4 hpd, B) mostrando la completa axotomía del nervio de la línea lateral (B, cabezas de flechas blancas). Y 24h posteriores al daño (24hpd, C), mostrando la restauración del nervio de la línea lateral posterior y la desfasciculación de algunos axones (C, cabeza de flechas amarillas). Barra 200 μ m.

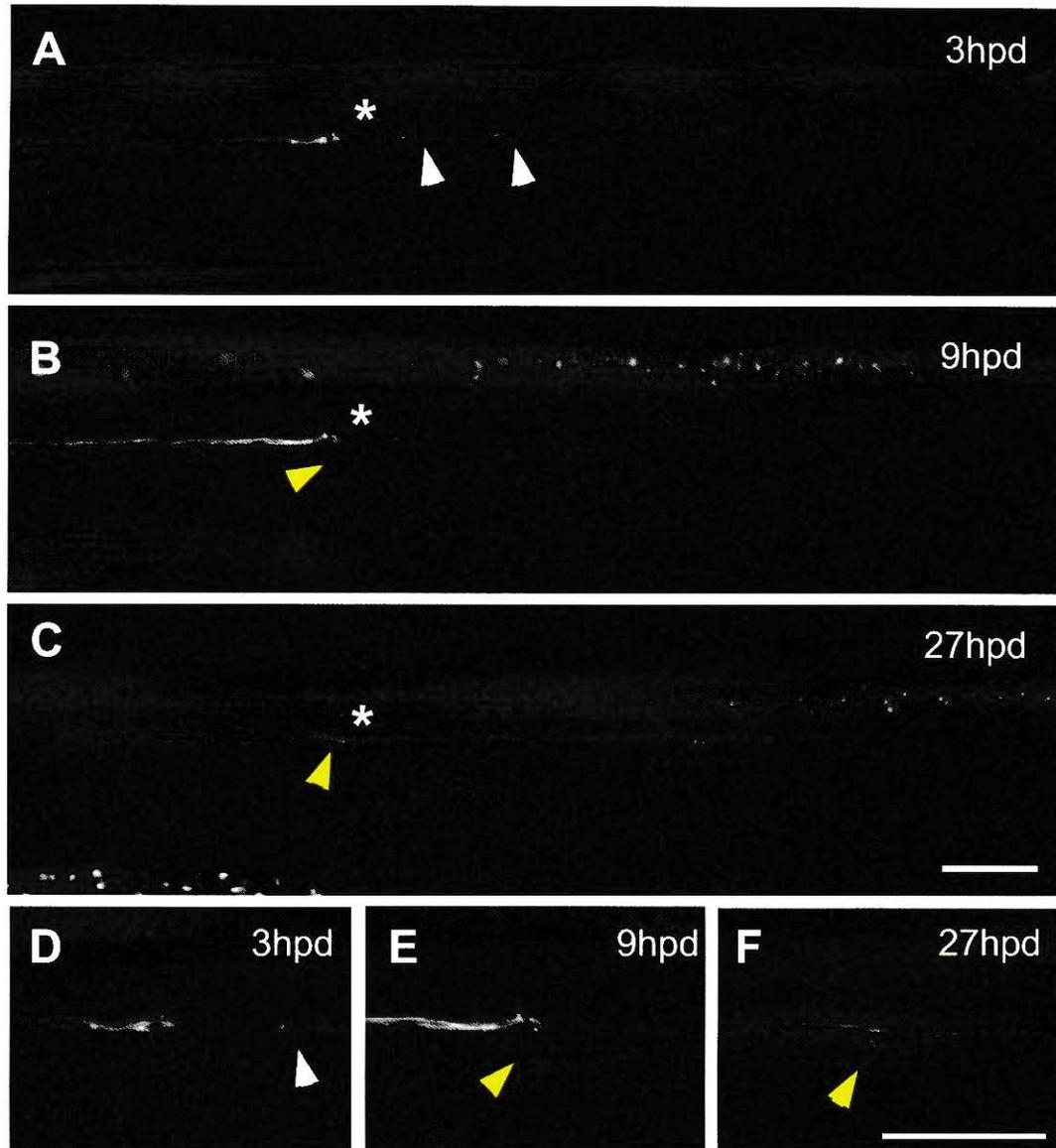


Figura 14: Comportamiento del nPLL durante la regeneración de neuromasto, posterior al daño con el electrodo. El daño generado al nervio de la línea lateral tras aplicación en el Nm L3, de 2 pulsos de corriente de $8\mu\text{A}$ durante 2 seg cada uno. *tg(BACNeuroD:GFP)* a 3hpd (A, D), 9hpd (B, E), 27hpd (C, F). Paneles inferiores (D, E, F), magnificación de la zona de daño (A-C, asterisco). Degeneración de región caudal al daño (A, D, cabezas de flechas blancas); Axones defasciculados (cabezas de flechas amarillas, B, C, E, F). Barra $100\mu\text{m}$.

1.1.4.3. Daño en las células de Schwann asociadas al nervio de la línea lateral posterior.

Se examinó la condición de las células de Schwann en el sitio de daño en razón de su capacidad de inhibir la proliferación de las INC. Las células de Schwann de la PLL expresan GFP en la línea transgénica FoxD3:GFP. Observamos que, como resultado del daño, las células de Schwann ubicadas por debajo del neuromasto (Figura 15A, cabeza de flecha blanca) son eliminadas en el punto de aplicación de la corriente (Figura 15B, asterisco). Se genera un espacio entre las células de Schwann sobrevivientes en ambos extremos del sitio de aplicación de la corriente (Figura 15A, cabezas de flechas amarillas). Esta separación es restaurada luego de 24hpd (Figura 15C, n=30, 3 experimentos independientes). También observamos que, como consecuencia de la electroablación, las células de Schwann ubicadas caudales al daño presentaron una reducción de la expresión de GFP (Figura 16J, flecha amarilla con respecto a flecha blanca). Para evaluar si las células de Schwann sufren un proceso de dediferenciación producto de la neurectomía, analizamos la expresión de la proteína básica de la mielina (MBP), un marcador de maduración de ellas. Usando un anticuerpo que reconoce la MBP, observamos que esta disminuyó en las células de Schwann caudal al daño (Figura 16 A y B, cabeza de flecha amarilla versus blanca) coincidente con la pérdida de GFP (Figura 16J, flecha amarilla con

respecto a flecha blanca) y con la región de degeneración del nPLL (Figura 14 A, B, D y E, cabezas de flechas blancas).

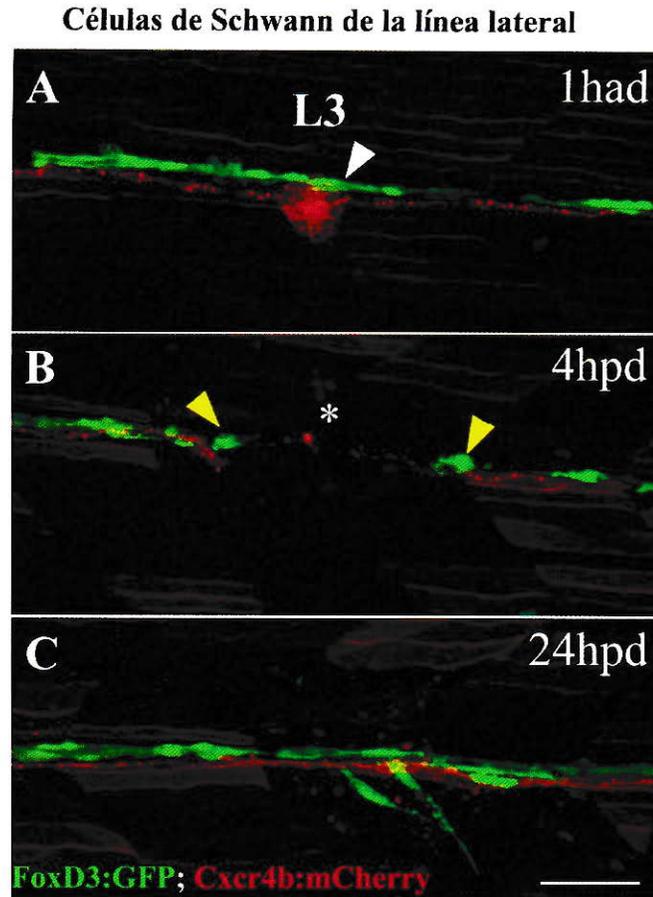


Figura 15: La electroablación del neuromasto L3 resulta en la eliminación de las células de Schwann ubicadas bajo el neuromasto L3. Larva *tg(cxcr4b:mCherry;foxD3:GFP)*, 1h antes del daño en el neuromasto L3 (1had, A). 4h posteriores al daño (4 hpd, B) mostrando el completo distanciamiento de las células de Schwann (B, cabezas de flechas amarillas). Y 24h posteriores al daño (24hpd, C), mostrando la restauración de la continuidad de las células de Schwann. Barra 200 μ m.

La dinámica de la pérdida de expresión de MBP y GFP, se observa en la Figura 16, donde es posible apreciar que, a 3hpd, existe una pérdida de MBP y FoxD3 en la zona de daño (Figura 16 I-J, asterisco). Además, es posible observar la disminución de GFP en la región caudal al daño (Figura 16 I-J, flecha amarilla con respecto a flecha blanca), disminución que persiste a 24hpd (Figura 16 K-L). En relación a la expresión de MBP, a 24hpd fue observada la pérdida de este marcador en las células de Schwann caudales al daño (Figura 16 K y L), pero este se recupera a las 48hpd (Figura 16 M y N). Esta pérdida de MBP, no es consecuencia de la muerte de las células de Schwann en esta región, debido a que aún es posible observar la expresión de FoxD3:GFP (Figura 16L), sugiriendo que correspondería a un fenómeno de pérdida o retraso en su diferenciación.

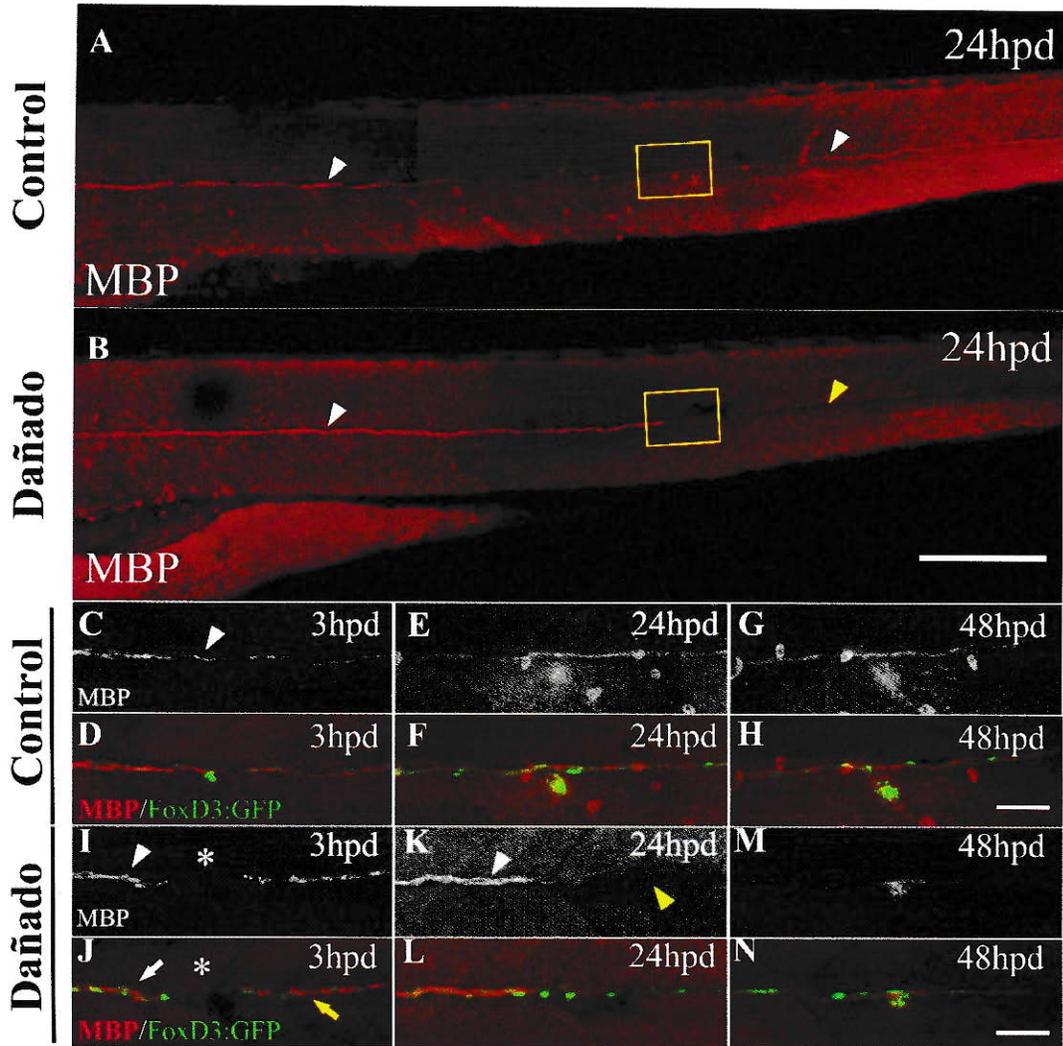


Figura 16: Pérdida temporal de expresión de MBP en las células de Schwann posterior al daño. Inmunodetección de la proteína básica de la mielina (MBP) posterior al daño en larvas transgénicas *Tg(foxd3:GFP)* (A-N). Expresión de MBP en larva transgénica *Tg(foxd3:GFP)* 96hpf, 24hpd (A-B). Larva control (A), Larva dañada (B). Expresión de MBP en larva control 3hpd (C), 24hpd (E), 48hpd (G); larva dañada 3hpd (I), 24hpd (K), 48hpd (M). Combinación de expresión de FoxD3 y MBP en larva control 3hpd (D), 24hpd(F), 48(H); larva dañada 3hpd (J), 24hpd(L), 48(N). Expresión de MBP (cabeza de flecha blanca, A, B, C, I) pérdida de expresión de MBP (cabeza de flecha amarilla, B, K). Zona de daño mostrada de C-N (rectángulo amarillo, A, B). Zona de daño (asterisco, I, K). Disminución de GFP (comparar flecha amarilla y flecha blanca en J). Barra 200µm (B); Barra 50µm (N).

1.2. Caracterización del comportamiento de neuromastos cercanos al daño por electroablación.

Antecedentes no publicados del laboratorio muestran que, junto al fenómeno de regeneración de la aleta caudal de peces adultos, se regenera la línea lateral. Durante dicho proceso, se observó una respuesta bifásica en el número de células ciliadas que componen el neuromasto más cercano a la zona de corte. En este neuromasto se observa una etapa inicial en la que el número de células ciliadas disminuye significativamente por debajo de los controles, y una segunda etapa, en que se observa un incremento estadísticamente significativo con respecto a los controles (Camila Mardones, datos no publicados). Otros antecedentes en pez cebra (Dufourcq y col., 2006) y en axolote (Jones y Corwin, 1993), muestran regeneración de la línea lateral completa a partir de las células remanentes del órgano que se dediferenciarían y luego formarían una nueva línea lateral. Con el objetivo de analizar el efecto del daño generado por electroablación, examinamos los diferentes tipos celulares presentes en los neuromastos más próximos al sitio de la intervención.

1.2.1.1. Células totales.

Como consecuencia del daño en el neuromasto L3, se generaron dos condiciones diferentes hacia ambos lados del sitio de electroablación: (1) la de los neuromastos rostrales al sitio de daño (L1-L2), que se encuentran inervados por el nPLL y en presencia de células de Schwann diferenciadas (MBP+) y (2) la de los neuromastos caudales al daño (L4-L8) los que fueron temporalmente denervados (30h aproximadamente) y que permanecen en presencia de células de Schwann de-diferenciadas por aproximadamente 48h. Dada la capacidad de las células de Schwann de inhibir la proliferación de las células de la línea lateral, cuantificamos mediante tinción nuclear TO-PRO-3 en larvas fijadas el número de células totales que componen los neuromastos L2 (rostral al daño) y L4 (caudal al daño). Como se observa en la Figura 17, la eliminación total de un neuromasto no tiene efecto alguno en el número de células totales que componen los neuromastos vecinos, sin importar si estos están o no inervados, o si están o no en presencia de células de Schwann completamente diferenciadas. Se muestra así, que la denervación temporal de un neuromasto no tiene efecto en el número de células que lo componen. Además, a partir de este resultado, se concluye que el factor inhibitorio que producen las células de Schwann: a) se produce aún en un estado indiferenciado o, b) mantiene su actividad en el medio extracelular de por lo menos 48h.

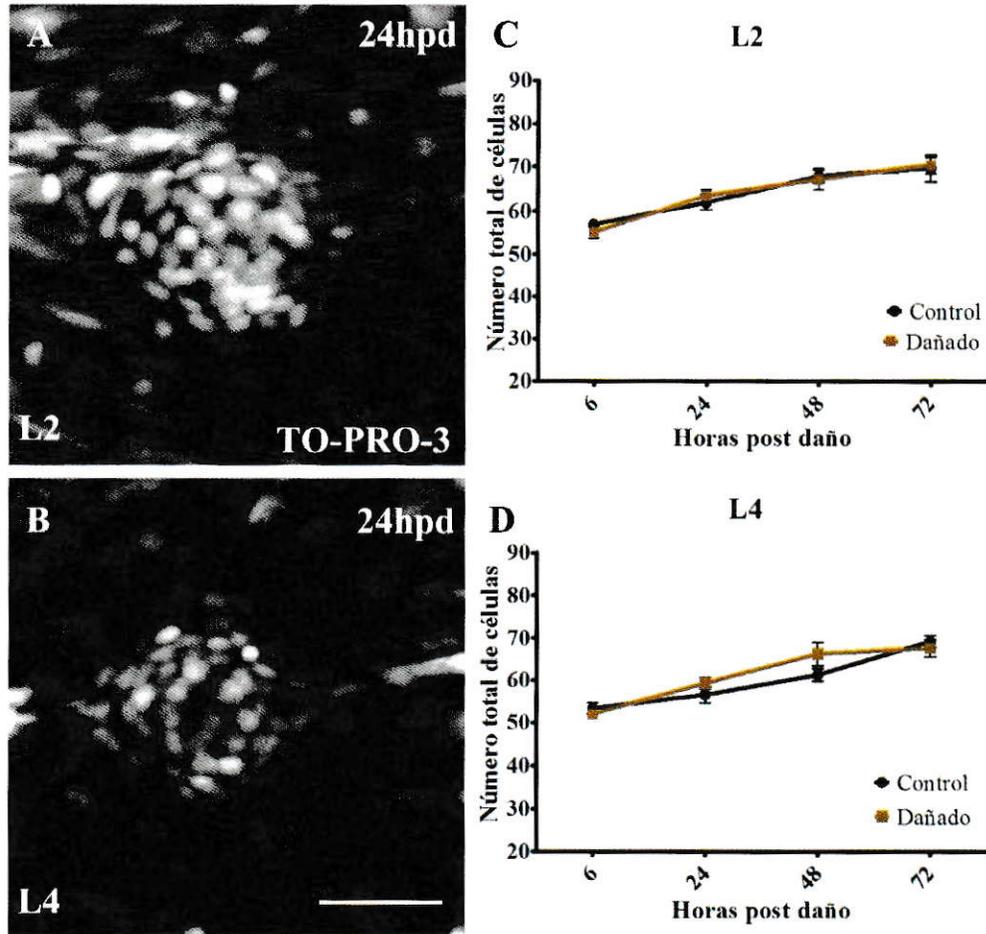


Figura 17 Cuantificación del número total de células en neuromastos L2 y L4.

La cuantificación de células totales se realizó mediante tinción nuclear TO-PRO-3 en larvas fijadas a 6, 24, 48, 72hpd. Neuromasto L2 24hpd (A), neuromasto L4 24hpd (B), núcleos TO-PRO-3 del neuromasto (A-B). Cuantificación del número total de células L2 (C), L4 (D). (n=10, 3 experimentos independientes). Barra 25µm.

1.2.1.2. Células ciliadas

A continuación, cuantificamos el número de células ciliadas en los neuromastos L2 (neuromasto rostral al daño, no denervado) y L4 (neuromasto caudal al daño, neuromasto denervado) mediante el uso de la línea *tg(brn3C:GFP)* que expresa GFP en las células ciliadas completamente diferenciadas. Como se

observa en la Figura 18, la eliminación total de un neuromasto no tiene efecto en el número de células ciliadas que componen los neuromastos vecinos, sin importar si estos están o no inervados, o si están o no en presencia de células de Schwann completamente diferenciadas. Además considerando que el número de células totales que componen el neuromasto no se ve alterado asumimos que la proporción de células ciliadas en ambos neuromastos no se ve afectada.

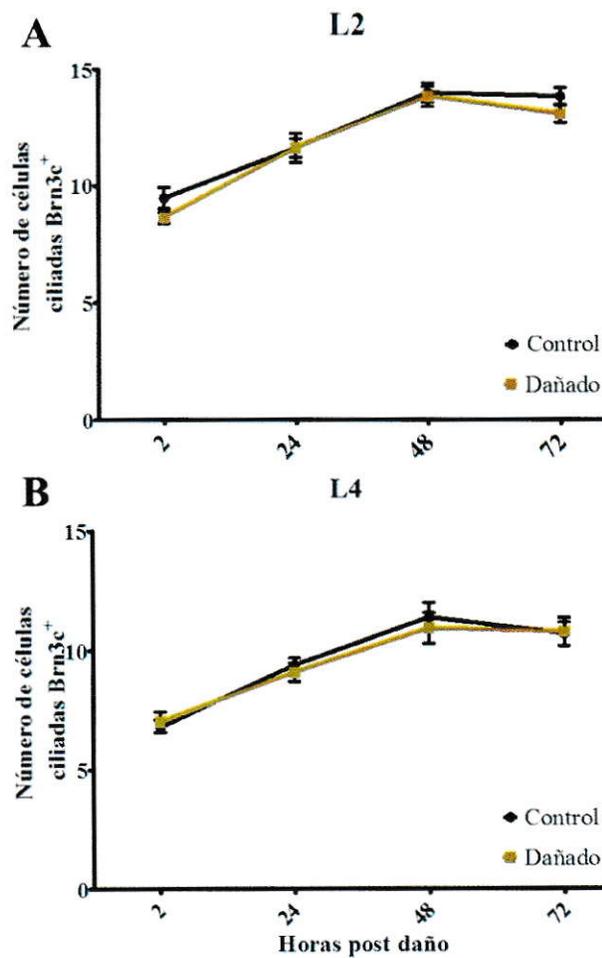


Figura 18: Cuantificación del número de células ciliadas en los neuromastos de la PLL. Neuromastos de la línea lateral posterior (L2-L4; A-B). L2, neuromasto rostral al daño; L4 neuromasto caudal al daño. Brn3c, células ciliadas

diferenciadas *tg(brn3c:GFP)*. n=15 (incluye solo peces que presentaron regeneración del neuromasto L3 regenerados).

1.2.1.3. Células del manto

Un tercer componente celular del neuromasto corresponde a las células del manto, las cuales han sido propuestas como una población progenitora, capaz de dar origen a las células ciliadas posterior a la eliminación de estas. Además, en la salamandra fue descrito que luego del corte de la cola, un nuevo primordio emerge desde las células del último neuromasto sobreviviente para regenerar la línea lateral amputada (Jones y Corwin, 1993). El número de células del manto fue cuantificado mediante el uso de la línea transgénica ET20:GFP y TO-PRO-3 como marca nuclear (Figura 19, cabezas de flechas). De manera similar a lo que ocurre con las células ciliadas y células totales, no existe cambio del número de células ET20 positivas en los neuromastos no intervenidos (Figura 17 y 18), independiente de si el neuromasto estaba o no inervado por el nPLL, o si estaba en presencia de células de Schwann completamente diferenciadas. Si consideramos los resultados antes mencionados de células totales y células ciliadas, la proporción de células ET20 positivas tampoco se ve alterada, mostrando que la denervación temporal y la ausencia de células de Schwann diferenciadas no tienen efecto en la especificación celular de las células del manto en el neuromasto, ni en la proliferación de las células que lo componen (Figura 17, 18 y 19).

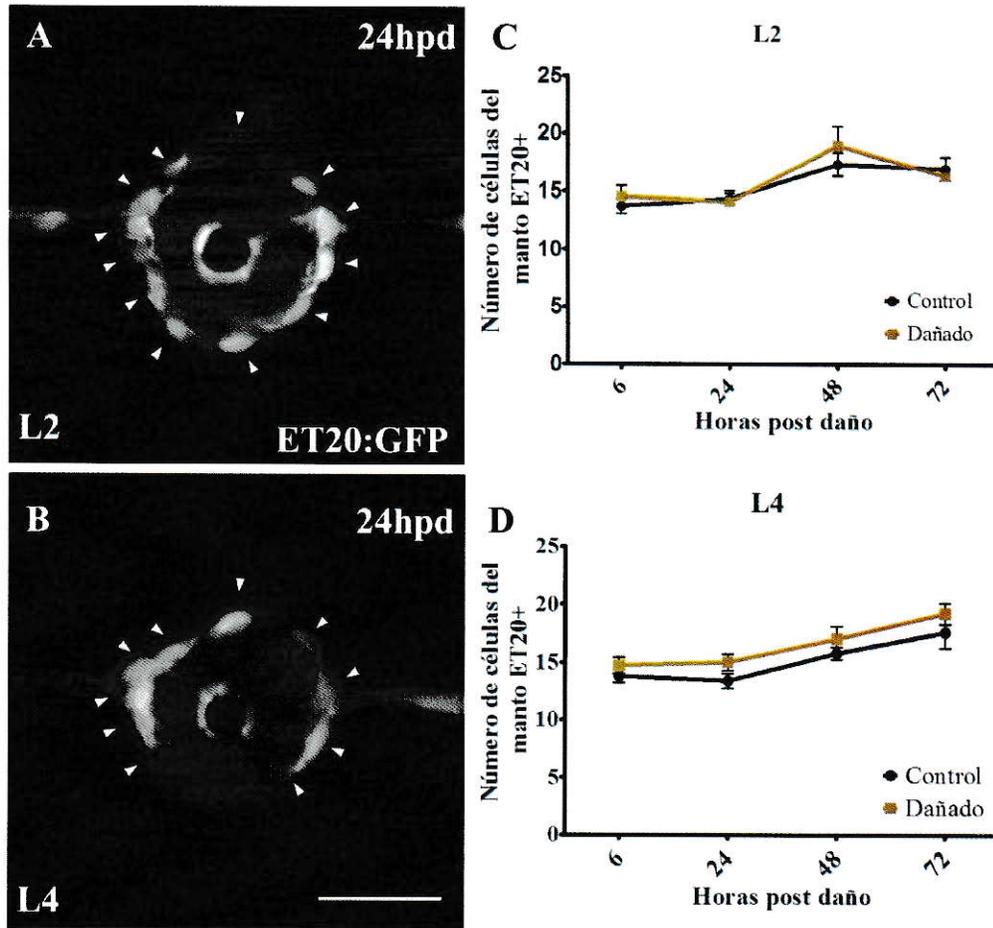


Figura 19: Cuantificación del número de células del manto en neuromastos L2 y L4. La cuantificación de células del manto se realizó mediante conteo de núcleos TOPRO3+ ET20+ en larvas fijadas a 6, 24, 48, 72hpd. Neuromasto L2 24hpd (A), neuromasto L4 24hpd (B). Cuantificación número de células del manto en neuromasto L2 (C), L4 (D). Flechas células del manto. n=10, 3 experimentos independientes. Barra 25µm.

Células de soporte.

La cuarta población de células que encontramos en el neuromasto, corresponde a las células progenitoras basales que expresan de manera específica el factor de transcripción Sox2. Esta población de células son las responsables de

proliferar y diferenciarse para regenerar un neuromasto dañado. Con el objetivo de analizar el efecto del daño, denervación y estadio de diferenciación de las células de Schwann en el número de células Sox2 positivas y/o su proporción en el neuromasto, se realizó inmunohistoquímica contra la proteína Sox2, y se examinaron los neuromastos L2 y L4 (Figura 20A-B). Al igual que los otros tipos celulares del neuromasto, no hay cambios en el número de células Sox2 positivas (Figura 20C-D).

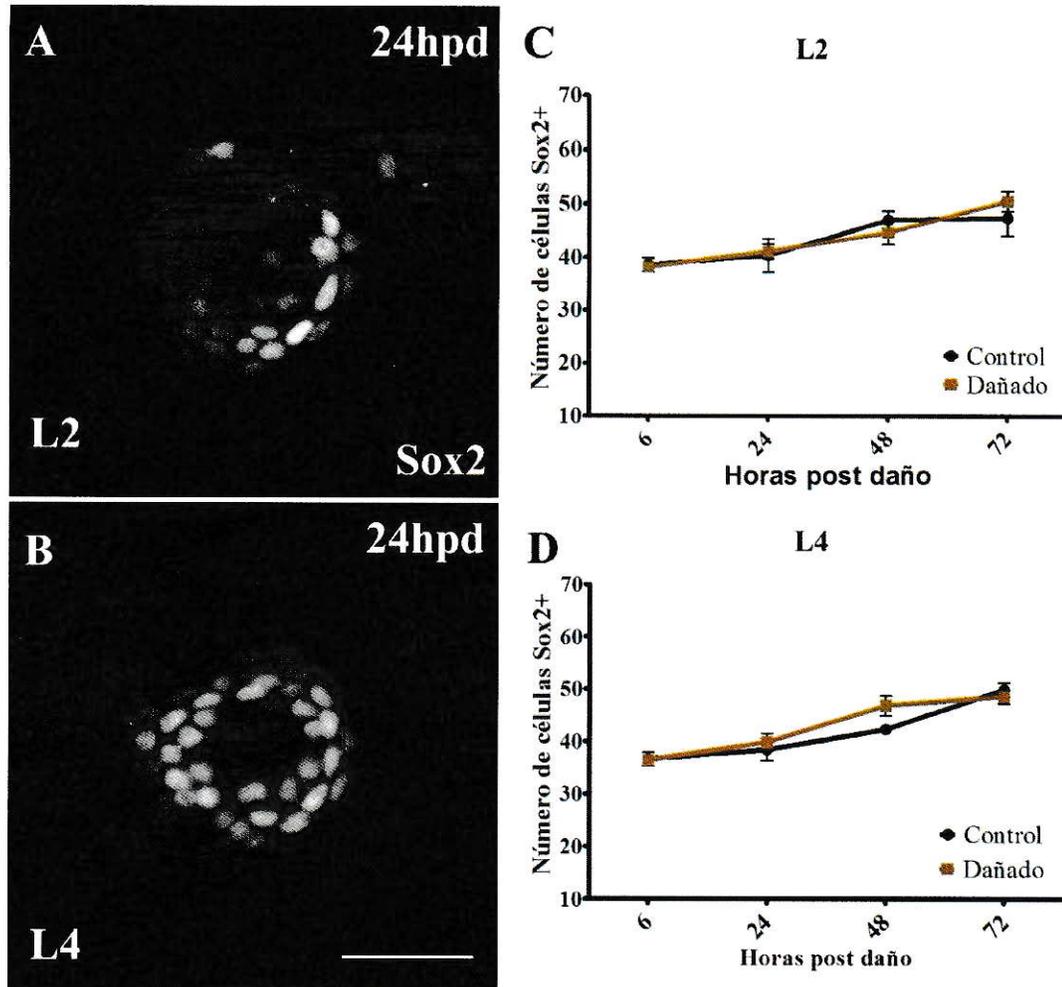


Figura 20 Cuantificación del número de células de soporte Sox2+ en neuromastos L2 y L4. La cuantificación de células de soporte Sox2+ se realizó mediante conteo de núcleos TOPRO3+ Sox2+ en larvas fijadas a 6, 24, 48, 72hpd. Neuromasto L2 24hpd (A), neuromasto L4 24hpd (B). Cuantificación número de células de soporte en neuromasto L2 (C), L4 (D). n=10, 3 experimentos independientes. Barra 25µm.

En conjunto, estos resultados muestran que el daño generado por el electrodo tiene un efecto local que no altera el número de células de los neuromastos vecinos. Además muestran que la denervación y pérdida de MBP en

las células de Schwann por periodos de hasta dos días, no tienen efecto en los neuromastos.

2. Mediante estudios de linaje celular *in vivo*, detectar la ubicación inicial de las células que darán origen al nuevo neuromasto.

2.1. Determinar el origen de las células progenitoras que darán origen al nuevo neuromasto.

2.1.1. Acumulación de células interneuromásticas en la zona de daño.

Durante el desarrollo larval y juvenil del pez cebra, las células interneuromásticas (INCs) forman los neuromastos intercalares (entre los neuromastos primarios) cuando sufren un proceso de alejamiento de la línea media por el paso del primordio secundario (Grant y col., 2005). Por otro lado, las INC forman neuromastos supernumerarios en peces que carecen de células de Schwann (Grant et al., 2005; López-Schier y Hudspeth, 2005; Lush y Piotrowski, 2014). Ambos resultados demuestran que las INC son progenitores multipotentes, capaces de formar neuromastos completos y que este potencial se ve inhibido por las células de Schwann. Dado este contexto, hipotetizamos que las INC cercanas a la zona de daño serían las progenitoras del neuromasto que regenera luego que se realizara electroablación de un neuromasto. Mediante el uso de la línea doble transgénica *cxcr4b:mCherry*; ET20:GFP que expresa GFP en las INCs y mCherry en todos los componentes de la línea lateral, observamos el comportamiento de las INCs luego de electroablacionar el neuromasto L3 (Figura 21A, asterisco).

Mediante el seguimiento *in vivo* y por adquisición de imágenes de tiempo extendido (*time lapse*) se observó que las INCs más cercanas a la brecha generada por el daño (Figura 20A, cabezas de flechas) comienzan un proceso de migración convergente desde ambos extremos que culmina entre las 15 y 21hpd, cuando se cierra la brecha (Figura 21 A-B). Desde las 21hpd hasta el final del fenómeno de regeneración fue observada una acumulación progresiva de células GFP positivas en la zona de daño (Figura 21C). Durante el mismo periodo de tiempo se observa que en algunas de estas células disminuye la expresión de GFP (Figura 21 C, cabezas de flechas amarillas). Dado que en los neuromastos de los peces ET20:GFP, GFP se expresa en las células del manto, esta pérdida de la marca fluorescente sugiere que las células acumuladas están adquiriendo otros destinos de diferenciación. En la Figura 21D se muestra la formación de un nuevo neuromasto que presenta el anillo característico de las células del manto marcadas con GFP en la periferia y células mCherry centrales (ver Figura 19A). La duración del proceso de acumulación de células y la formación del neuromasto regenerado es variable y tarda entre 48 y 72h, lo que explica la diferencia observada al medir el número de neuromastos regenerados en estos dos tiempos (ver Figura 9).

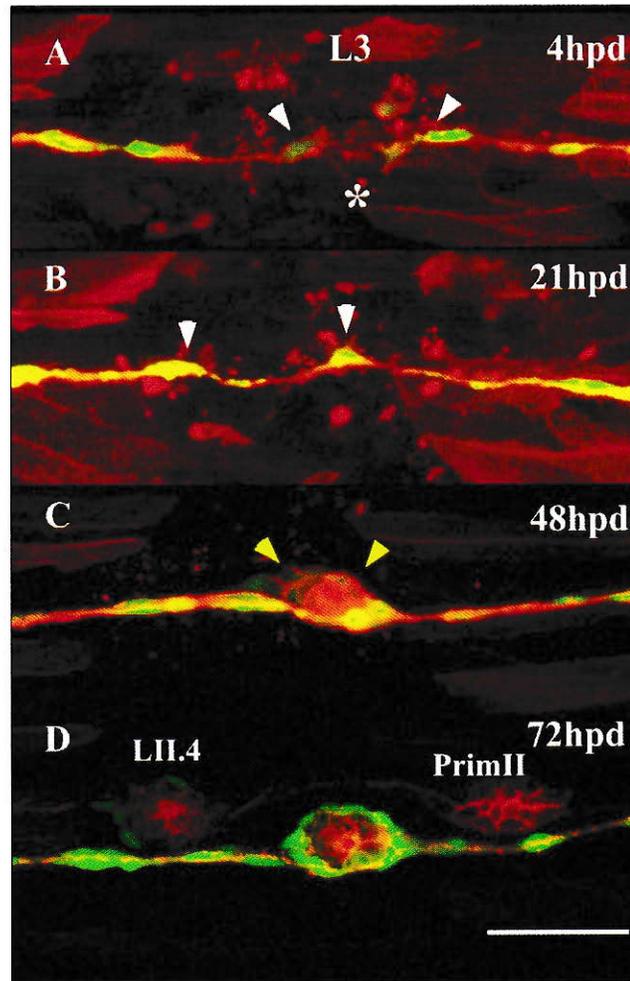


Figura 21 Acumulación de INC en la zona de daño. Larvas doble transgénicas *tg(cxcr4b:mCherry;ET20:GFP)* dañadas en el neuromasto L3 (A-D). 4hpd (A), 21hpd (B), 48hpd (C), 72hpd (D). INC que flanquean la zona de daño 4hpd (cabeza de flecha blanca, A) y su posición resultante durante las primeras 21hpd (cabeza de flecha blanca, B). Disminución del GFP en el transgénico ET20:GFP (cabeza de flecha amarilla, C). Neuromasto 4 de la línea lateral secundaria (LII.4, D). Primordio de la línea lateral secundaria (PrimII, D) Barra 50 μ m.

2.1.2. El neuromasto regenerado proviene íntegramente de células interneuromásticas.

Nuestras observaciones sugieren que la formación del neuromasto que ocurre luego de la electroablación ocurre por contribución exclusiva de INC. Los experimentos fueron hechos con la línea transgénica ET20:GFP, en la cuál tanto las INCs como las células del manto de los neuromastos expresan GFP. En este escenario, es posible que las células del manto de los neuromastos vecinos pudiesen contribuir a la regeneración de un neuromasto electroablacionado. Para dilucidar por completo el origen del neuromasto regenerado, generamos peces genéticamente mosaicos a través del trasplante de células desde peces donantes (Tg(Ubiquitina:RFP)) en estadio de 3-4hpf a peces hospederos silvestres, en estadios similares. Se espera con esto, obtener un porcentaje pequeño de embriones que posean INC marcadas con RFP en un fondo genéticamente silvestre (sin marca). A los 3dpf, fueron seleccionados los peces transplantados que poseían una o pocas INCs RFP positivas y se hizo electroablación en el neuromasto adyacente. La Figura 22 muestra uno de las larvas procesadas de esta manera como ejemplo. Luego del daño en el neuromasto L2 (Figura 22A, asterisco), la INC marcada que se encuentra adyacente al punto de electroablación hacia el lado rostral del pez prolifera y sus descendientes se acumulan (24hpd, Figura 22B, flecha blanca). A las 72hpd, se observa el neuromasto L2 regenerado y que está constituido casi en su totalidad de células rojas, es decir, descendientes de la INC única presente antes del daño (Figura 22C, L2). Sólo dos de las células que

componen este nuevo neuromasto no son RFP positivas, sugiriendo que al menos dos células progenitoras son responsables de regenerar el neuromasto. Sugerimos que la INC ubicada inmediatamente caudal a la brecha de daño contribuye también al proceso de regeneración. Repetimos a continuación el experimento de trasplante usando peces Ubiquitina:RFP pero, en este caso, los embriones hospederos fueron transgénicos ET20:GFP. Observamos que, de manera similar al experimento anterior, la célula marcada prolifera y las células hijas se acumulan (Figura 23A-D) para luego diferenciarse y formar parte del neuromasto regenerado (Figura 23 E-H). Mediante este experimento, se confirma que es necesario más de una célula interneuromástica para regenerar el neuromasto y que células de ambos extremos de la brecha generada por la electroablación contribuyen a la regeneración. Además, en este experimento observamos que una célula INC retiene la marca RFP, lo que sugiere que estas células auto renovarse (Figura 23G, flecha).



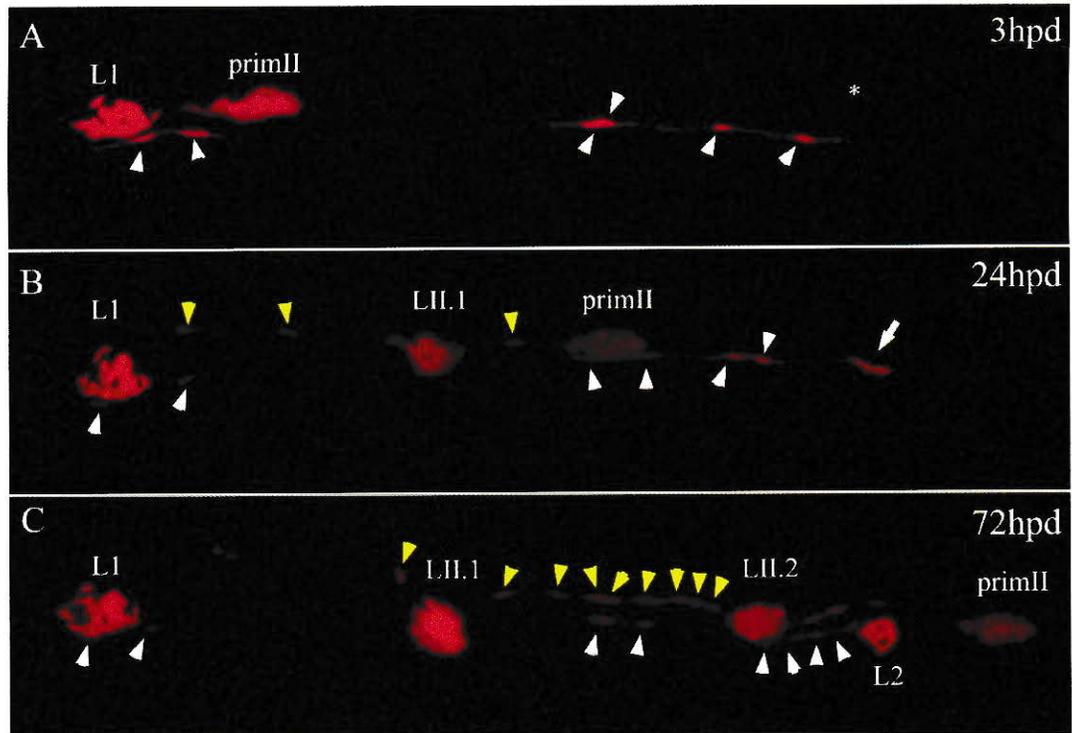


Figura 22: Células interneuromásticas son responsables de regenerar el neuromasto dañado. Larva silvestre de 72hpf trasplantada en estadio de 3-4hpf con células de embrión donante *Ubiquitina:RFP*. Primordio secundario (PrimII, A, B, C); primer neuromasto de la línea lateral primaria (L1); primer y segundo neuromasto de la línea lateral secundaria (LII.1 y LII.2 respectivamente); INC derivadas del primordio I (cabezas de flechas blancas, A, B, C); INC depositadas por el primordio secundario (cabeza de flechas amarillas, A, B, C). Zona de daño del neuromasto (asterisco). Neuromasto regenerado (L2).

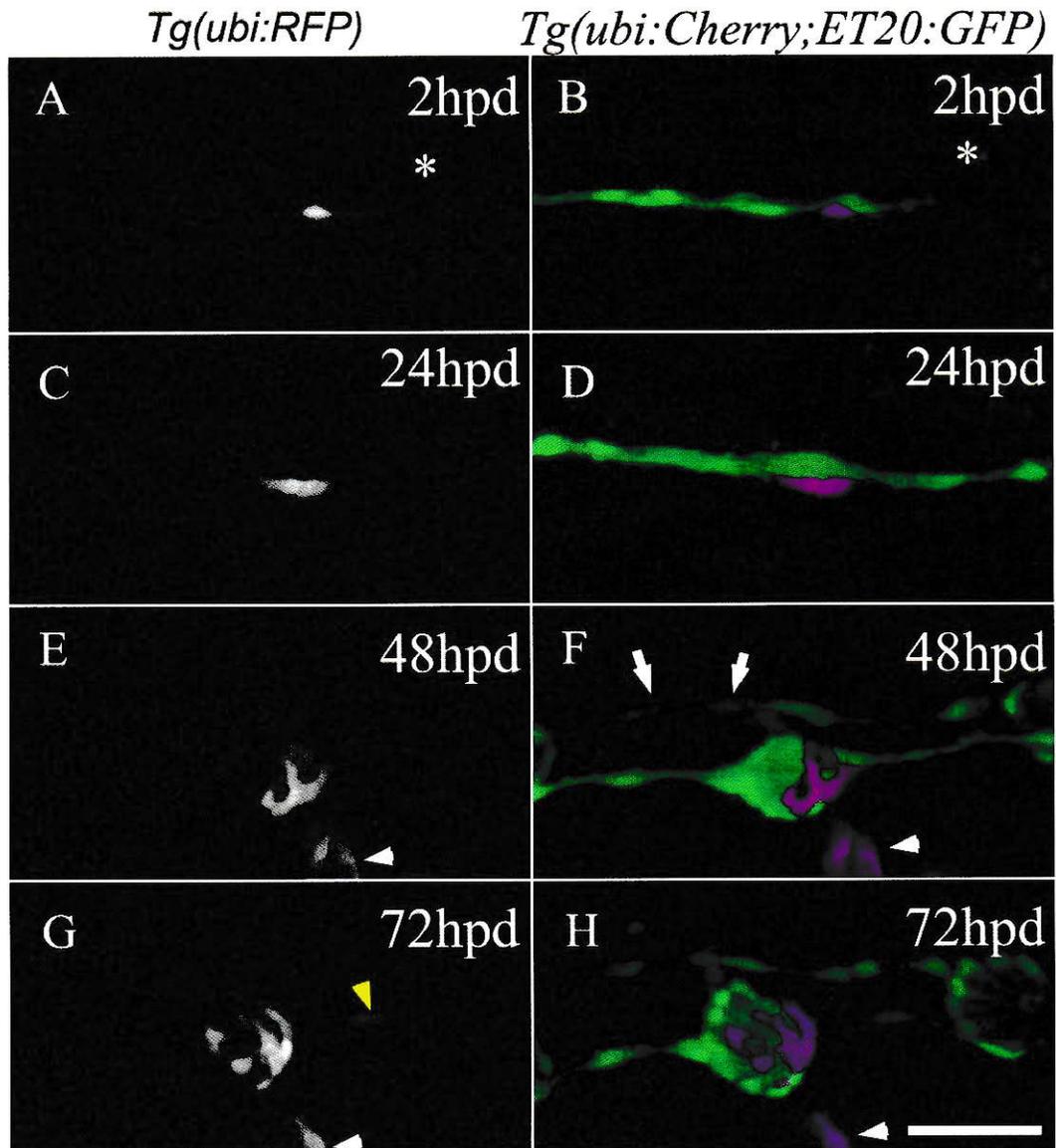


Figura 23 La regeneración de un neuromasto involucra al menos 2 células interneuromásticas. Larva *tg(ET20:GFP)* trasplantada con células de un embrión donante Ubiquitina:RFP A 2hpd (A-B), 24hpd (C-D), 48hpd (E-F) y 72hpd (G-H). Células trasplantadas (A, C, E, G), superposición *tg(ET20:GFP)* con células trasplantadas (B, D, F, H). zona de daño (asterisco). Células de la piel (Cabeza de flecha blanca, E, F, G, H). nueva célula interneuromástica (cabeza de flecha amarilla, G). INC de la línea lateral secundaria (flechas blancas, F). barra 50µm

Nuestros resultados permiten concluir que las INC son las únicas células responsables de regenerar el neuromasto posterior a su completa eliminación. Sin embargo, añadimos que esta capacidad está fuertemente controlada por un factor inhibitorio que proviene directa o indirectamente de las células de Schwann. Para aportar más antecedentes a este último fenómeno, primero, ¿qué ocurre en aquellos casos de electroablación de un neuromasto en que no hay regeneración?. Segundo, evaluamos el resultado de eliminar los neuromastos sin afectar las células de Schwann.

2.1.3. La aparición de un neuromasto producto del daño por electroablación no requiere un neuromasto preexistente.

Nuestros experimentos indican que la regeneración de los neuromastos luego de la electroablación ocurre en un microambiente carente de las señales que producen normalmente las células de Schwann y que inhiben la proliferación de las INCs y la formación de neuromastos intercalares (Figuras 15 y 16). Es decir, estaríamos replicando el fenómeno normal de alejamiento de las INCs de las células de Schwann para la formación de un nuevo neuromasto a partir de las INCs. De ser este el caso, hipotetizamos que efectuar una electroablación en cualquier punto de la línea lateral donde se encuentren las INCs (y no necesariamente donde haya un neuromasto) debería replicar el mismo fenómeno: la aparición de un nuevo neuromasto (en este caso, uno supernumerario). Para evaluar esta hipótesis utilizamos el mismo protocolo de daño descrito para generar un daño en las INCs ubicadas entre los neuromastos L1 y L2 (Figura 24A). Como

se muestra en la figura 24, bajo estas condiciones experimentales se observó la formación de un nuevo neuromasto en el sitio de la electroablación (Figura 24C). La cuantificación del fenómeno muestra que los porcentajes de generación son idénticos en ambos tiempos de observación a los que resultan de eliminar el neuromasto L3 y determinar su regeneración (Figuras 25C y D). Estos resultados sugieren que los mecanismos utilizados para la formación de un neuromasto intercalar podrían ser utilizados para la regeneración de un neuromasto luego de su eliminación.

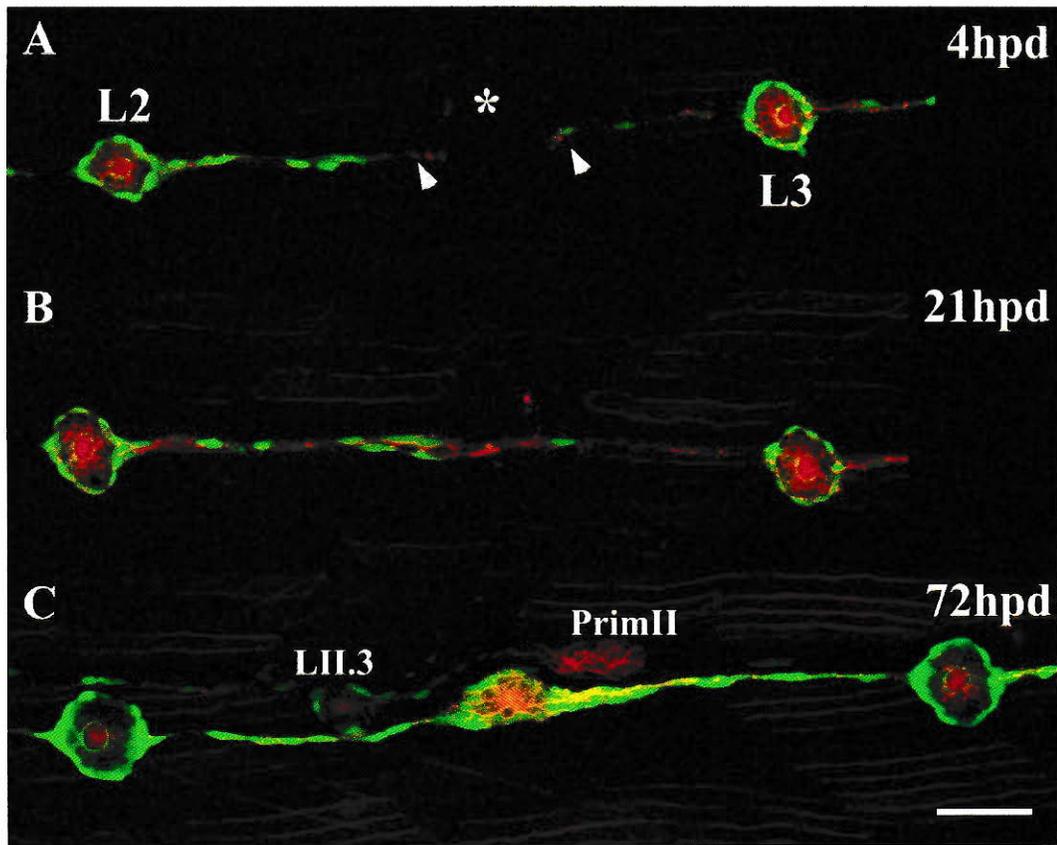


Figura 24 Daño local en las células interneuromásticas mediante electroablación induce la formación de un nuevo neuromasto. Larva transgénica ET20:GFP dañada entre el neuromasto L2 y L3 a 72hpf. 4hpd (A), 21hpd (B), 72hpd (C). zona de daño (asterisco, A). Células interneuromásticas que flanquean la zona de daño (cabezas de flechas blancas, A). tercer neuromasto de la línea lateral secundaria (LII.3, C). Primordio de la línea lateral secundaria (PrimII, C). barra 50 μ m.

2.1.4. Las células de Schwann tienen un efecto inhibitorio en la regeneración de los neuromastos.

Dada la importancia de las células de Schwann en la activación de las INCs, que, a su vez, originan los neuromastos regenerados, nos planteamos el objetivo de evaluar su participación en el proceso. Es posible eliminar completamente las

células de Schwann de las larvas de pez cebra usando el inhibidor de kinasas ErbB (AG1478) (Lyons y col., 2005). La vía ErbB es necesaria para la migración de los precursores de las células de Schwann a lo largo del nervio de la línea lateral durante el desarrollo del sistema. Como se observa en la Figura 25, en una larva transgénica FoxD3:GFP (marcador de las células de Schwann), el tratamiento desde las 10 hasta las 58hpf, es suficiente para eliminar completamente las células de Schwann de la PLL (Figura 25A y B, cabeza de flechas blancas). En esta condición experimental es posible observar la aparición de neuromastos supernumerarios (Figura 25 B, cabezas de flechas amarillas) característico de este tipo de inhibición. Se realizó ablación del neuromasto L3 como se describió anteriormente y se cuantificó el porcentaje de neuromastos que regeneran. Se observó que la formación de un nuevo neuromasto ocurre en el 100% de los casos analizados (n=75, 3 experimentos independientes). Además, la recuperación del neuromasto ocurre en este porcentaje ya a las 48 hpd, cuando normalmente, la regeneración sólo alcanza el 30% de los casos (Figura 25C). Este resultado vincula directamente a las células de Schwann con el proceso regenerativo e indica que las INCs tienen el potencial de formar neuromastos y sólo requieren de la remoción del factor inhibitorio para proliferar y diferenciarse en estas estructuras sensoriales.

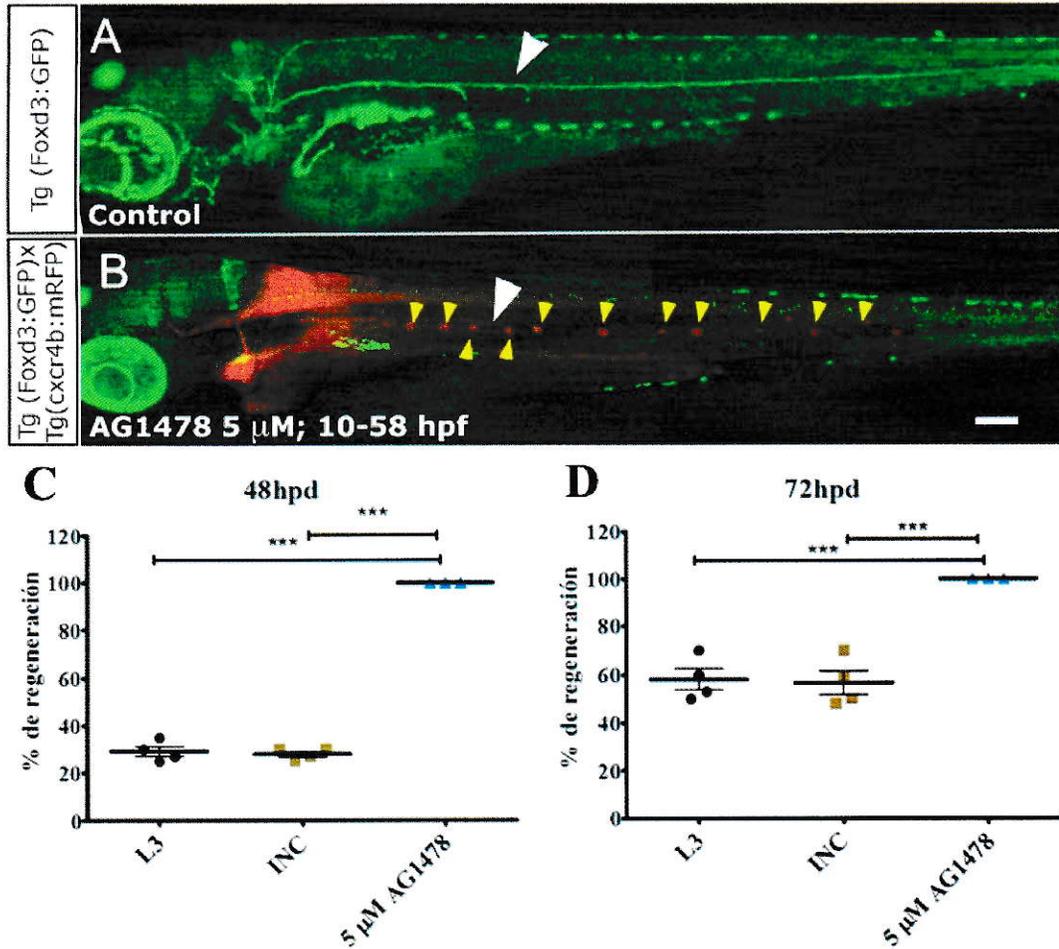


Figura 25: Efecto inhibitorio de las células de Schwann en la regeneración de neuromasto único. Larvas doble transgénicas *tg(cxcr4b:mCherry;foxd3:GFP)* control (A), tratadas desde las 10hpf hasta las 58hpf con 5 μ M de AG1478 (B). Cuantificación del porcentaje de regeneración en larvas doble transgénicas *tg(cxcr4b:mCherry;foxd3:GFP)* a 48hpd (C) y 72hpd (D). L3, larvas dañadas en el neuromasto L3; INC, larvas dañadas en INC entre L1-L2; 5 μ M AG1478; larvas tratadas con dicho inhibidor. Neuromastos supernumerarios (flechas amarillas, B)

2.1.5. En ausencia de regeneración, las células interneuromásticas proliferan pero no se diferencian.

Para analizar el comportamiento de las INCs en condiciones donde no se observó regeneración, realizamos el experimento de transplante desde peces ubi:RFP a peces ET20:GFP y registramos la conducta de una célula INC marcada en un caso no regenerativo. Bajo esta condición experimental, pudimos observar que durante las primeras 24h luego del daño, existe proliferación y migración de INCs que forman un cúmulo en la brecha (Figura 26A-F, cabeza de flechas amarillas). Sin embargo, a diferencia de la condición regenerativa, a las 72hpd no fue posible observar una progresiva acumulación ni una organización de estas INC en la zona de daño. En cambio, se observó una reversión del cúmulo y una redistribución de las INCs a lo largo de la línea lateral (Figura 26B-C; D-F cabezas de flechas amarillas). Esta redistribución, en conjunto con la ausencia de un nuevo neuromasto en la zona de daño, sugieren que las INC fueron capaces de proliferar pero no de diferenciarse.

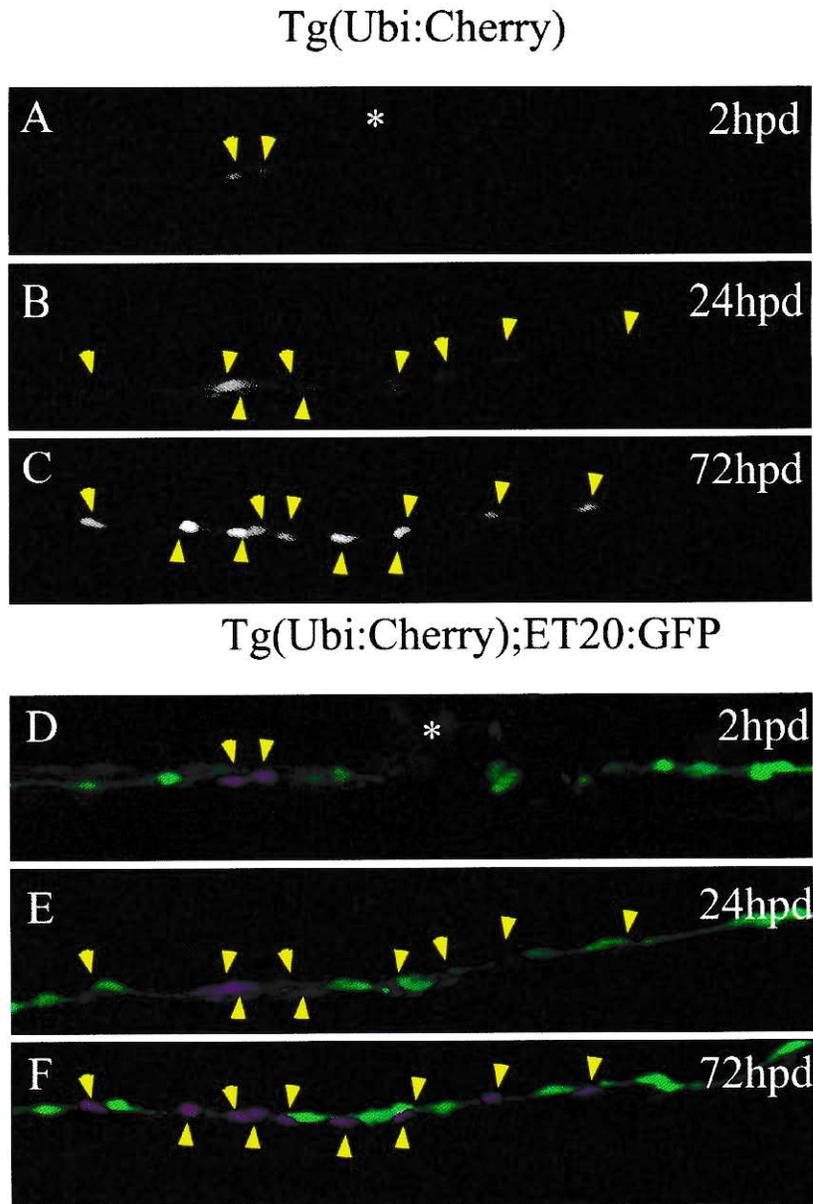


Figura 26: En ausencia de regeneración existe proliferación y reorganización de las células interneuromásticas. Larva transgénica ET20:GFP trasplantada con células de un embrión donante Ubiquitina:RFP A 2hpd (A, D), 24hpd (B, E) y 72hpd (C, F) que no regeneró el neuromasto dañado. Células trasplantadas (A, B, C). Superposición Et20:GFP con células trasplantadas (D, E, F). Zona de daño (asterisco, A y D). INC trasplantadas (flechas amarillas, A-F).

2.2. Identificar la secuencia temporal de aparición de cada tipo celular durante la regeneración del neuromasto.

Nos interesó, por último, describir la secuencia temporal de aparición de los diferentes tipos celulares del neuromasto que aparecen luego del daño y confirmar que las INCs pueden dar lugar a derivados de todos los linajes propios del neuromasto. Para ello, usamos una batería de marcadores de diferenciación.

Mediante inmunodetección de Sox2 en larvas transgénicas ET20:GFP, observamos que, a diferencia de las células del manto (ET20+, Sox2+), las INC sólo expresan ET20+ y no Sox2. Como se observa en la Figura 27A y Figura 28A, en la zona de daño (asterisco) solo es posible encontrar INC ET20+Sox2-, descartando la existencia de células del manto ET20+Sox2+; y de células de soporte ET20-, Sox2+ (progenitores basales). Más tarde en el proceso de regeneración, se observó una acumulación de células en la zona de daño (Figura 27B y 28B, 24hpd) de las cuales 95,5±5,5% (10 peces, 3 experimentos independientes) son ET20+, a diferencia de un neuromasto control, en el cual sólo un 25,5±5,6% (10 peces de 3 experimentos independientes) de ellas son ET20+ (Figura 27E). Sin embargo, en cuanto a la expresión de gen Sox2, encontramos dos condiciones, una de ellas en la que la totalidad de las células ET20+ son Sox2+ (75% de los peces analizados) y otro 25% en los cuales un 0% de las células Et20+ son Sox2 positivas (Figura 28D).

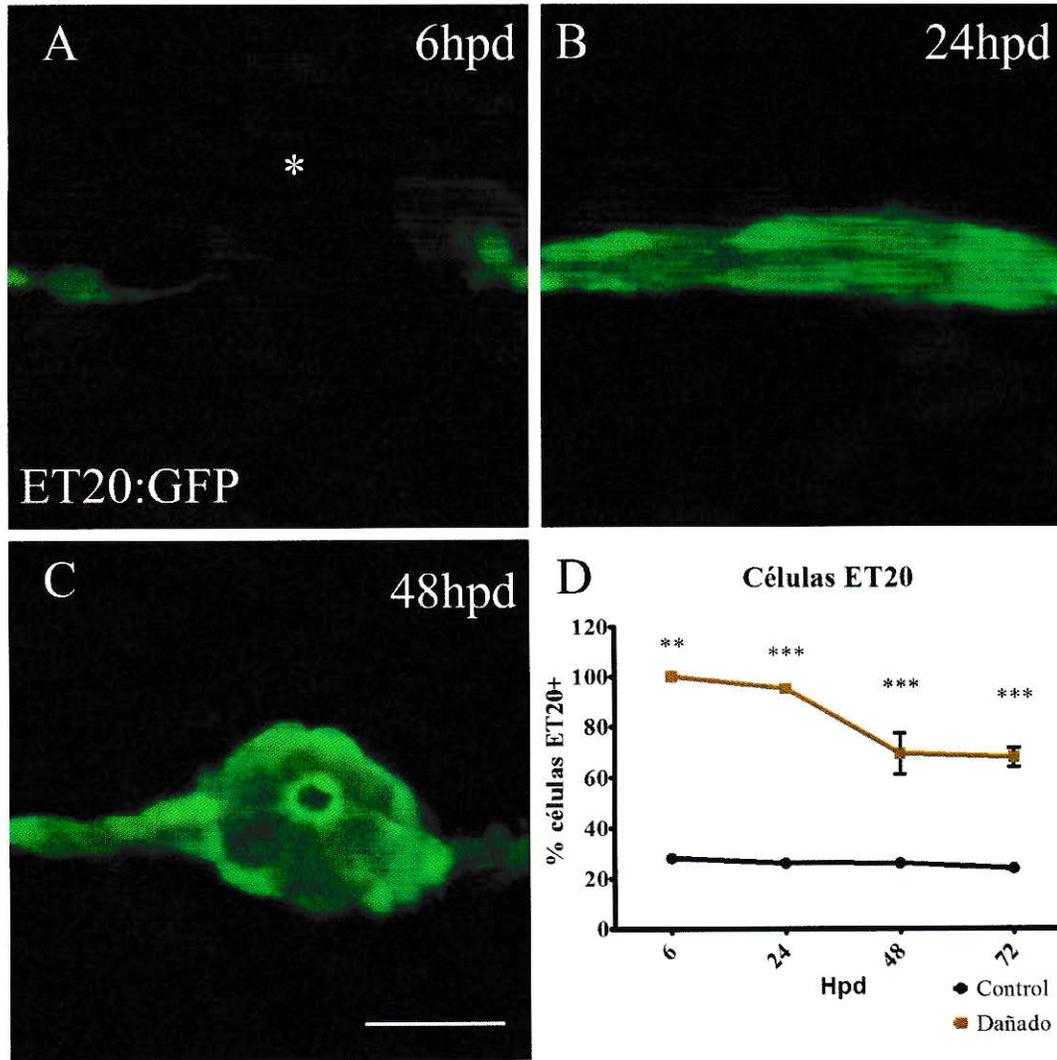


Figura 27: Acumulación y diferenciación de las células interneuromásticas en la zona de daño. *tg(ET20:GFP)* durante el proceso de regeneración. 6hpd (A), 24hpd (B), 48Hpd (C). Cuantificación de porcentaje de células ET20 en el neuromasto L3 a 6, 24, 48, 72hpd (D). n=10, 3 experimentos independientes. Barra 25 μ m.

Existe entonces una rápida activación del gen Sox2 y una rápida diferenciación de las INC Et20+ Sox2- a Sox2+ en el proceso regenerativo. Lamentablemente, debido a la estabilidad de la proteína fluorescente verde, no

podemos seguir con precisión la pérdida del marcador ET20+ y, por lo tanto, no podemos conocer la identidad exacta de todas las células acumuladas. La presencia de GFP en todas las células nos indica un origen común desde una INC ET20+. A falta de otros marcadores de células del manto, no podemos demostrar diferenciación de INCs a células del manto, pero sí la adquisición del marcador de progenitor basal Sox2. Entre 24 y 72h después del daño, observamos un continuo aumento del número de células en el neuromasto en regeneración (Figura 29). A diferencia de lo ocurrido a 24hpd, el porcentaje de células que expresan GFP en la línea ET20:GFP disminuye desde 95,1±4,9% (10 peces de 3 experimentos independientes) a 69,2±25,3% (10 peces de 3 experimentos independientes; el aumento en la desviación estándar da cuenta de las poblaciones que regeneran a 48 vs 72hpd).

Este cambio sugiere una segunda ola de diferenciación que genera las 4 poblaciones celulares identificables por su posición en el neuromasto y por los diferentes marcadores que exhiben: células ET20+;Sox2+ (periféricas en el neuromasto, con morfología de célula del manto, núcleo compacto y condensado en tinción TOPRO3), ET20+; Sox2- (externas a la roseta del neuromasto, con características morfológicas de INC, núcleo alargado, condensado en tinción TOPRO3); ET20-;Sox2+ (periféricas y basales en neuromasto, núcleo redondo condensado en tinción TOPRO3); ET20-Sox2- (centrales-apicales en neuromasto, núcleo redondo poco condensado en tinción TOPRO3, flecha amarilla en Figura 27 c (Figura 27C, 29C). Durante este periodo de tiempo, es posible observar la organización progresiva de las células Et20+ Sox2+, en un patrón característico de

las células del manto, formando un anillo periférico basal, con una apertura apical en el neuromasto. Como se observa en la Figura 30A-D, durante la regeneración del neuromasto en peces *tg(excr4b:mCherry;brn3c:GFP)* es posible observar la diferenciación de las células centrales de este neuromasto (Figura 30C-D, flechas blancas).

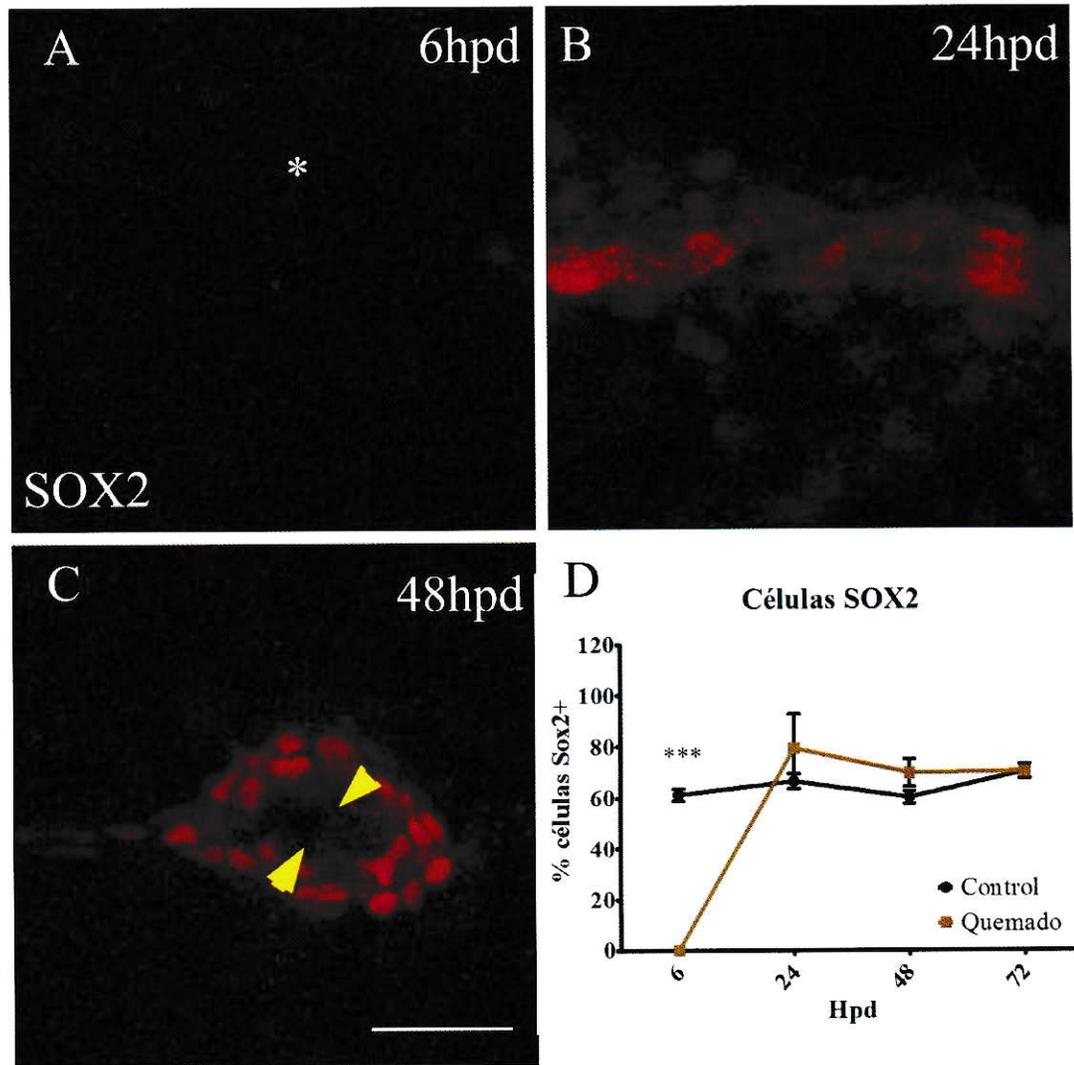


Figura 28: Acumulación y diferenciación de las células interneuromásticas en la zona de daño. Immunodetección de la proteína Sox2 durante el proceso de

regeneración. 6hpd (A), 24hpd (B), 48Hpd (C). Cuantificación de porcentaje de células Sox2⁺ en el neuromasto L3 a 6, 24, 48, 72hpd (D). n=10, 3 experimentos independientes. Barra 25µm.

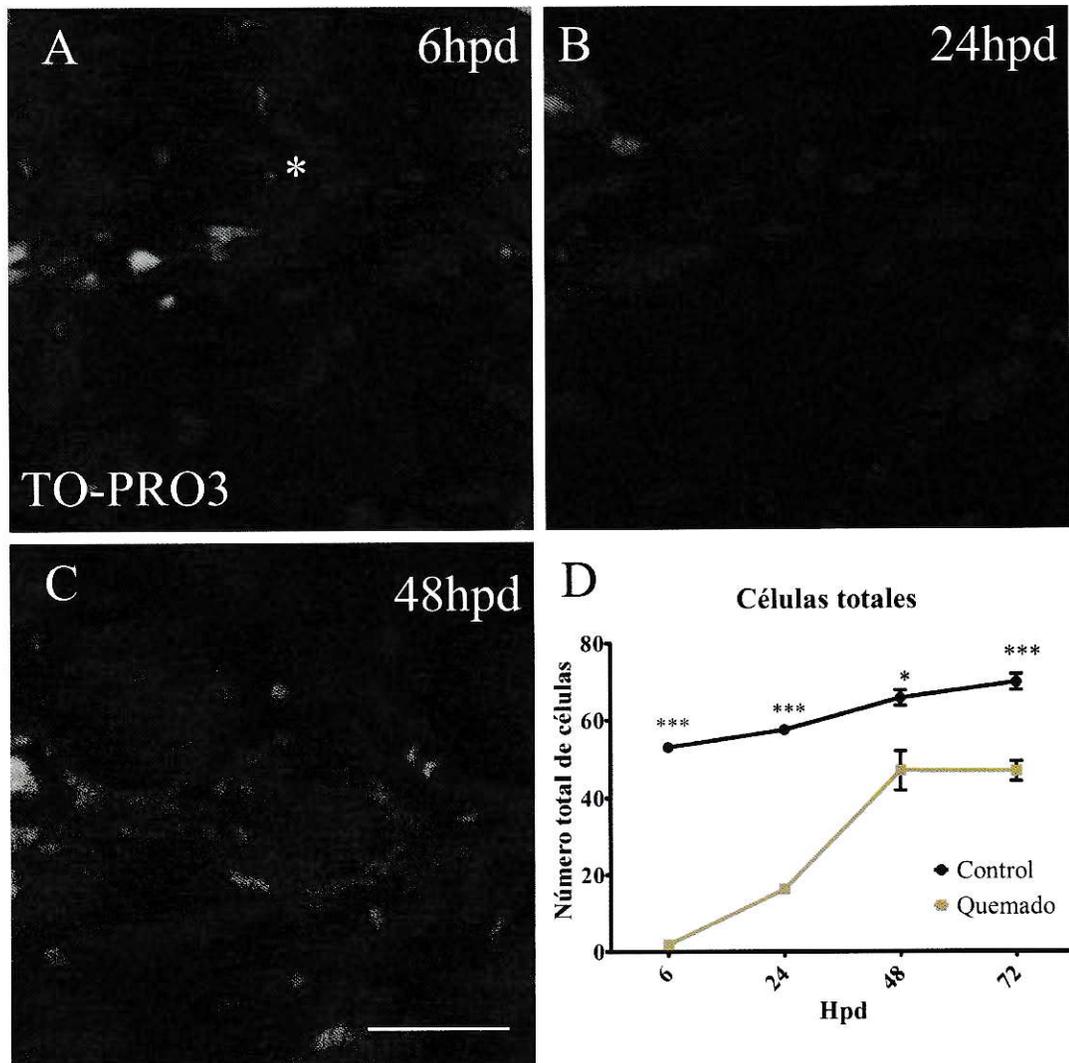


Figura 29: Incremento progresivo del número de células en la zona de regeneración. Núcleos TO-PRO-3 positivos en la zona de daño durante el proceso de regeneración. 6hpd (A), 24hpd (B), 48hpd (C). Cuantificación del número de núcleos en el neuromasto L3 a 6, 24, 48, 72hpd (D). n=10, 3 experimentos independientes. Barra 25µm.

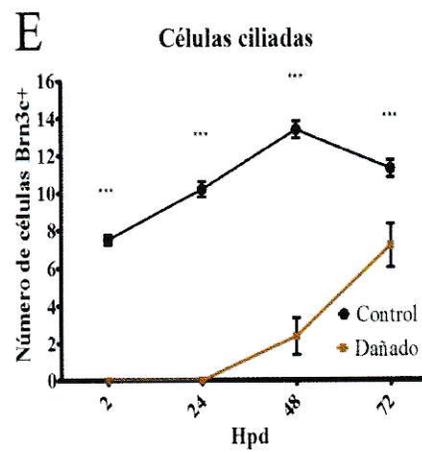
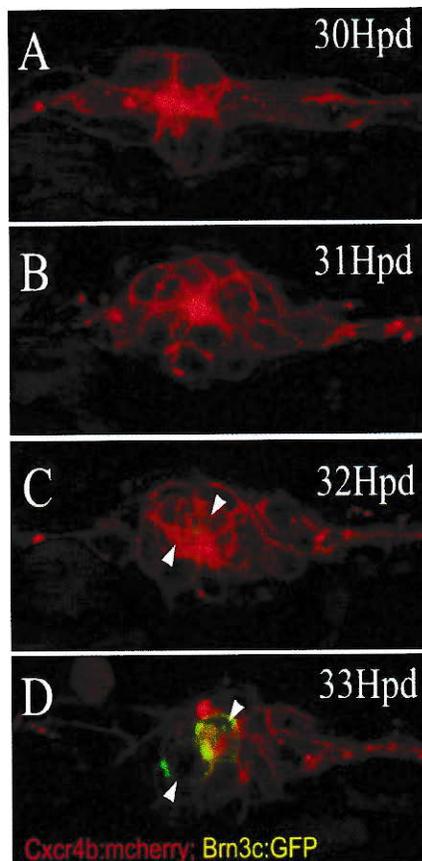


Figura 30: Diferenciación de células centrales del neuromasto hacia linaje de célula ciliada Brn3c positiva. Larva doble transgénica *tg(cxcr4b:mCherry;*

brn3c:GFP) entre 30-33hpd (A-D) Flechas blancas, células centrales expresando GFP. Cuantificación del número de células ciliadas Brn3c+ en el neuromasto L# en larvas controles y dañadas a 2, 24, 48, 72hpd.

2.2.1. La activación de las células interneuromásticas como mecanismo de regeneración requiere la formación de un ambiente permisivo.

Trabajos previos del laboratorio demostraron que incubación de larvas de pez cebra en sulfato de cobre en altas concentraciones ($>100\mu\text{M}$) eliminan permanentemente las células de los neuromastos y no es posible observar regeneración de ellos (Hernández y col., 2006; Hernández y col., 2007; Olivari y col., 2008). En esta condición, las INCs no se dañan ya que el cobre ejerce su toxicidad exclusivamente sobre los neuromastos, único lugar donde hay contacto de las células de la línea lateral con el medio exterior. Repetimos el experimento en larvas de 72hpf y observamos, al cabo de 2h, la generación de brechas en la línea de INCs que corresponde a la ubicación previa de los neuromastos, que han sido destruidos por el cobre (Figuras 31 B y C). Ninguno de estos peces regeneró sus neuromastos en los 3 días siguientes (0% de regeneración, $n=75$, 3 experimentos independientes). El resultado demuestra que la generación de una brecha o espacio en el continuo de la línea lateral no es suficiente para inducir la proliferación, diferenciación o morfogénesis en las INCs para producir nuevos neuromastos. Como hipotetizamos que la regeneración sólo ocurre al generarse una brecha que incluya la desaparición local de las células de Schwann, realizamos una electroablación 24h después del daño con sulfato de cobre (Figura 31D,

recuadro blanco). Al cabo de 2 días, fue posible observar la aparición de un nuevo (y único) neuromasto, ubicado precisamente en el sitio de daño por electroablación (control solo cobre 0% a 24hpd, 0% a 48hpd, 0% a 72hpd n=100, 3 experimentos independientes; tratados cobre más electroablación 0% a 24hpd, 19,99% \pm 1,75% a 48hpd, 38,48% \pm 2,16% a 72hpd n=100, 3 experimentos independientes. Este resultado demuestra, primero, que las INCs mantienen intacta su capacidad de generar neuromastos después del tratamiento con sulfato de cobre. Segundo, demuestra que es necesario generar un daño más allá del neuromasto (a mayor profundidad) para inducir la regeneración, un daño en el tejido que incluya a las células de Schwann o al microambiente celular que las rodea.

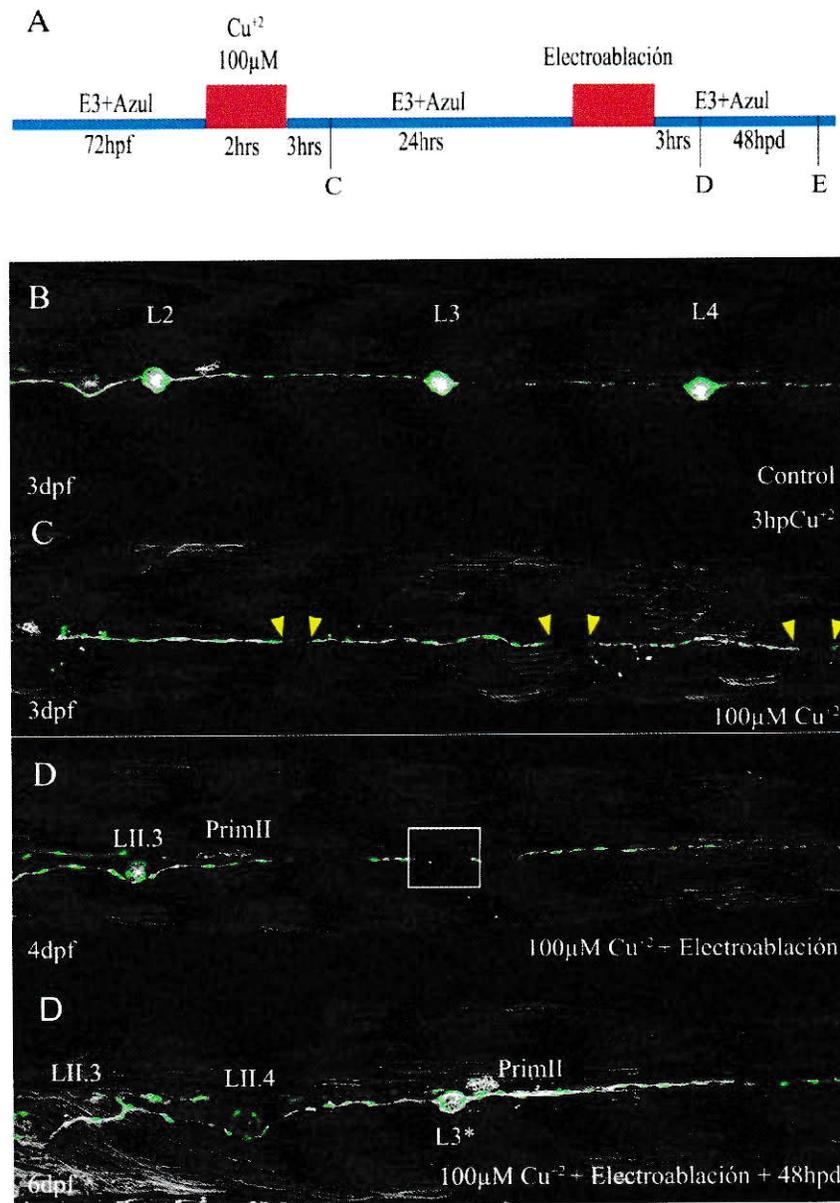


Figura 31 Microambiente local generado por la electroablación permite la activación de las células interneuromásticas. Representación esquemática del planteamiento experimental (A). Larva control doble transgénica *tg(cxcr4b:mCherry;et20:GFP)* (gris; verde, respectivamente) de 72hpf (B). Larva doble transgénica *tg(cxcr4b:mCherry;et20:GFP)* 3h posterior al tratamiento con 100μM de sulfato de cobre durante 2h (C). INC que flanquean la zona donde previamente existió un neuromasto (cabeza de flechas amarillas, B). Larva doble transgénica

tg(cxcr4b:mCherry;et20:GFP) 27h posterior al tratamiento con 100 μ M de sulfato de Cobre durante 2h y 3h posterior a la electroablación de las célula interneurómicas ubicadas en el recuadro blanco (D). Larva doble transgenica *tg(cxcr4b:mCherry;et20:GFP)* 48h posterior a la electroablación (E). tercer y cuarto neuromasto de la línea lateral secundaria (LII.3 y LII.4 respectivamente, D, E). primordio de la línea lateral secundaria (PrimII, D, E). Neuromasto regenerado (L3*).

V. Discusión

La regeneración tisular es un mecanismo considerado como parte del desarrollo del individuo, debido a que utiliza mecanismos celulares y moleculares involucrados en la formación de la estructura o tejido durante la embriogénesis y el desarrollo post-embriionario. En este trabajo nos interesó indagar en los mecanismos celulares que gobiernan la regeneración tisular y, de qué forma el microambiente celular especializado o nicho condiciona la conducta de las células progenitoras responsables de regenerar un órgano o tejido. Bajo esta problemática, el modelo de la línea lateral del pez cebra otorga grandes ventajas para estudiar estas preguntas. Este modelo, por un lado, presenta una diversidad celular acotada, lo que permite seguir con relativa facilidad los mecanismos involucrados en la diferenciación celular. Por otro lado, el órgano posee una complejidad estructural que es clave para su función, lo que exige que las células deban estar correctamente organizadas para mantener su función.

La respuesta a daño en la línea lateral ha mostrado que coexisten diversos mecanismos de regeneración, incluso considerando los distintos protocolos experimentales usados o la edad de los animales (Dufourcq y col., 2006; Hernández y col., 2006; Hernández y col., 2007; Olivari y col., 2008). En este trabajo, abordamos uno de los problemas aún no resueltos en el área, que apunta a identificar las células que participan directa o indirectamente en el proceso regenerativo. En particular, hipotetizamos que la pérdida de un órgano completo, el neuromasto, permitiría observar directamente la contribución de células vecinas

que pertenezcan o no al sistema de la línea lateral original. Si bien, existían evidencias que mostraban que la línea lateral regenerada proviene íntegramente de precursores del mismo linaje, no se estableció si este origen es uni o multiclonal, cuáles son las características de los progenitores, ni si hay un rol para las células circundantes, en particular, el nervio y células gliales subyacentes.

1. Electroablación como método de eliminación local de neuromastos.

Uno de los obstáculos detectados al inicio del trabajo fue la ausencia de metodologías adecuadas para la eliminación de un neuromasto único en estadios larvales y que nos permitieran estudiar la contribución de los neuromastos o INC vecinos al daño. Es por ello que desarrollamos una metodología, que denominamos electroablación (Moya-Díaz y col., 2014), la cual consiste en la aplicación local de pulsos de corriente para eliminar células. Existen antecedentes que muestran que un daño específico a un solo axón y no al tejido circundante, pueden generar aberraciones a la trayectoria de regeneración y que la complementación del daño al axón único con un daño al tejido circundante, es suficiente para inducir la correcta regeneración (Rieger y Sagasti, 2011). En consecuencia, la electroablación surge como un método adecuado para estudiar el proceso en un contexto más cercano a la realidad, debido a que si bien no es una metodología de daño específico al neuromasto son la microscopia multifotón (O'Brien y col., 2009) o los daños químicos (Curado y col., 2008; Hernandez y col., 2011), al ser un daño localizado, nos permitió estudiar en un contexto más

cercano a un daño real como la interacción célula progenitora/nicho modula la regeneración. Encontramos que la aplicación local de corriente (2 pulsos de $8\mu\text{A}$ durante dos *seg* cada uno) fue suficiente para eliminar completamente el neuromasto. Junto con la pérdida del neuromasto, comprobamos que también se genera daño en los tejidos subyacentes al neuromasto tales como el nervio de la línea lateral, las células de Schwann que se encuentran inmediatamente por debajo del neuromasto y el tejido muscular bajo el neuromasto.

2. Pérdida temporal de inervación y su implicancia en el estado de diferenciación de las células de Schwann.

De manera similar a lo observado previamente por nuestro laboratorio por electroablación (Ceci y col., 2014) y por microscopia multifotón (Villegas y col., 2012), observamos que la porción caudal del nervio de la línea lateral comienza un proceso de degeneración Walleriana, que culmina con la eliminación de todos los restos axonales desde la región de daño hacia caudal. Luego de 30hpd, el nervio regenera por crecimiento de los axones interrumpidos. Esta degeneración axonal perturba el estado de diferenciación de las células de Schwann asociadas al nervio ya que tiene por consecuencia la pérdida o retraso en su proceso de diferenciación (Garratt y col., 2000; Perlin y col., 2011; Lyons y col., 2005; Newbern y Birchmeier, 2010; Rojas-Muñoz y col., 2009). Este fenómeno de pérdida o retraso en la diferenciación de las células de Schwann, no sigue la misma secuencia temporal que la pérdida del nLLP, el cual es restaurado dentro de las primeras 30hpd. En el caso de las células de Schwann, la pérdida de la proteína básica de la

mielina (MBP), un marcador de diferenciación de estas células, es evidente a partir de las 24hpd, y permanece hasta aproximadamente las 48hpd, donde existe una recuperación paulatina del marcador. Esta pérdida de MBP, no es causada por la muerte de las células de Schwann, lo cual fue elegantemente demostrado (Ceci y col., 2014) (Figura 16J).

3. Células interneuromásticas son responsables de regenerar el neuromasto tras su eliminación.

Los antecedentes obtenidos mediante técnicas de análisis clonal (Tu y Johnson, 2011), y de incorporación de análogos de timidina (Dufourcq y col., 2006) en pez cebra y por seguimiento *in vivo* en axolote (Jones y Corwin, 1993), revelan que luego del corte de cola, existe un incremento en la proliferación en el neuromasto más próximo al sitio de daño y que la línea lateral caudal tiene células con capacidad de formar una nueva línea lateral sobre la cola regenerada. Sin embargo, en nuestro laboratorio se demostró que el tratamiento de larvas de 3 dpf con altas concentraciones de sulfato de cobre ($>100\mu\text{M}$) elimina permanentemente los neuromastos y no es posible observar regeneración de ellos a pesar que las INC no se vean afectadas (Hernández y col., 2006; Hernández y col., 2007; Olivari y col., 2008). Estas diferencias en la capacidad de responder al daño no ha sido explicada hasta el momento, desconociéndose si es una característica adquirida en los estadios adultos o bien, si existen otros mecanismos celulares involucrados en la activación de las células progenitoras. Es por ello que nos planteamos identificar las células responsables de restaurar un neuromasto tras su completa eliminación.

En trabajos no publicados de nuestro laboratorio (Seminario de Título de Camila Mardones), se muestra que luego del corte de cola en peces adultos, existe migración de células Et20:GFP positivas desde la línea lateral remanente hacia el tejido en regeneración. Por otro lado, evidencias de otros grupos han mostrado el potencial de las INC para formar todos los tipos celulares del neuromasto cuando se forman los neuromastos intercalares en el desarrollo post larval (Grant y col., 2005; Lush y Piotrowski, 2014; López-Schier y Hudspeth, 2005). En este trabajo, observamos que, de manera similar a la formación de un neuromasto intercalar, existe acumulación de INCs en la zona de daño lo que conduce a la formación de un nuevo neuromasto. Mediante experimentos de transplante de células desde peces donantes ubiquitina:RFP, a peces en un fondo genético silvestre (sin marca), observamos que las INC circundantes al daño son responsables de manera exclusiva de regenerar un neuromasto. Además, observamos que un mínimo de 2 INC forman por completo el nuevo neuromasto y ambas células contribuirían a la formación de todos los tipos celulares del neuromasto y que no existiría una restricción de linaje en ellas. Interesantemente observamos que además de la formación de todas las células del neuromasto, las INC pueden formar nuevas INC ya sea cuando el neuromasto fue regenerado o bien cuando hay ausencia de regeneración, lo que sugiere que estas células pueden dividirse asimétricamente y auto renovarse cumpliendo con las características de una célula progenitora multipotente (madre).

4. Rol de las células interneuromásticas en la correcta inervación del nuevo neuromasto.

La electroablación del neuromasto, tiene como consecuencia un daño al nervio de la línea lateral y a las células de Schwann. Observamos que una fracción de los axones seccionados se defasciulan y permanecen inmóviles hasta la regeneración del neuromasto, reinervándolo. Si no regenera el neuromasto, los axones se retraen, posiblemente conectándose con células ciliadas en otros neuromastos. Las INC expresan GDNF (*glial cell line-derived neurotrophic factor*), factor trófico que en la línea lateral es importante para el seguimiento del primordio de la línea lateral por parte del nervio (Schuster y col., 2010) . En el trabajo mencionado, los autores hipotetizan que, en ausencia de glia, durante la regeneración, los axones de la línea lateral siguen a las INC. Considerando estos datos, las INC podrían estar ejerciendo un rol en la guía axonal, función que sería interesante analizar más en detalle.



5. Células de Schwann como reguladores espaciales y temporales de la regeneración.

Las células de Schwann asociadas al nervio de la línea lateral, han sido previamente propuestas como agentes reguladores de la proliferación y diferenciación de las INC (Grant y col., 2005; Lush y Piotrowski, 2014; López-Schier y Hudspeth, 2005). Al ser estas últimas las células responsables de la regeneración de un nuevo neuromasto, analizamos la participación de las células de Schwann en la regulación espacial y temporal de la regeneración mediada por las INC. En cuanto a la regulación espacial, observamos que, a pesar de la desdiferenciación (pérdida de expresión de MBP y disminución de expresión de FoxD3) de las células de Schwann ubicadas caudal al daño, nunca observamos la aparición de nuevos neuromastos en regiones caudales al punto de aplicación de la corriente. Este resultado sugiere dos posibles interpretaciones. La primera, es que la capacidad de inhibición de las células de Schwann sobre la activación de las INC es independiente del estado diferenciado de estas (reflejado por la expresión de MBP). La segunda, es que el factor inhibitorio generado por las células de Schwann, el cual ha sido postulado como un factor secretado (Lush y Piotrowski, 2014) y de acción a corta distancia, puede perdurar en el medio extracelular, manteniendo a las INC en un estado quiescente. Esto último, sugiere que la pérdida o retraso en la diferenciación de las células de Schwann y/o la destrucción de la matriz extracelular por la electroablación, generaría un microambiente permisivo para dicha proliferación (Figura 32). Es en este contexto que nosotros

realizamos 2 experimentos para evaluar esta hipótesis. El primero fue realizar un daño en las INC presentes entre dos neuromastos (L1 y L2, Figura 24A), lo cual indujo la formación de un “nuevo neuromasto” donde con anterioridad no existía. En el segundo, se eliminaron todos los neuromastos con daño químico severo para impedir su regeneración y, luego de 24h, se electroablacionaron las INC presentes en el miosepto horizontal; el resultado fue la formación de un solo neuromasto en el punto de aplicación de daño (Figura 31). En conjunto, estos resultados muestran que es necesario formar un microambiente local permisivo para la proliferación y diferenciación de las INC y, además, que el sistema sea capaz de evitar la formación temprana de nuevos neuromastos por pérdida temporal de inervación y dediferenciación de las células de Schwann (Figura 32) Hasta el momento se desconoce la naturaleza de este factor inhibitorio, y si esta efectivamente asociado a la matriz extracelular.

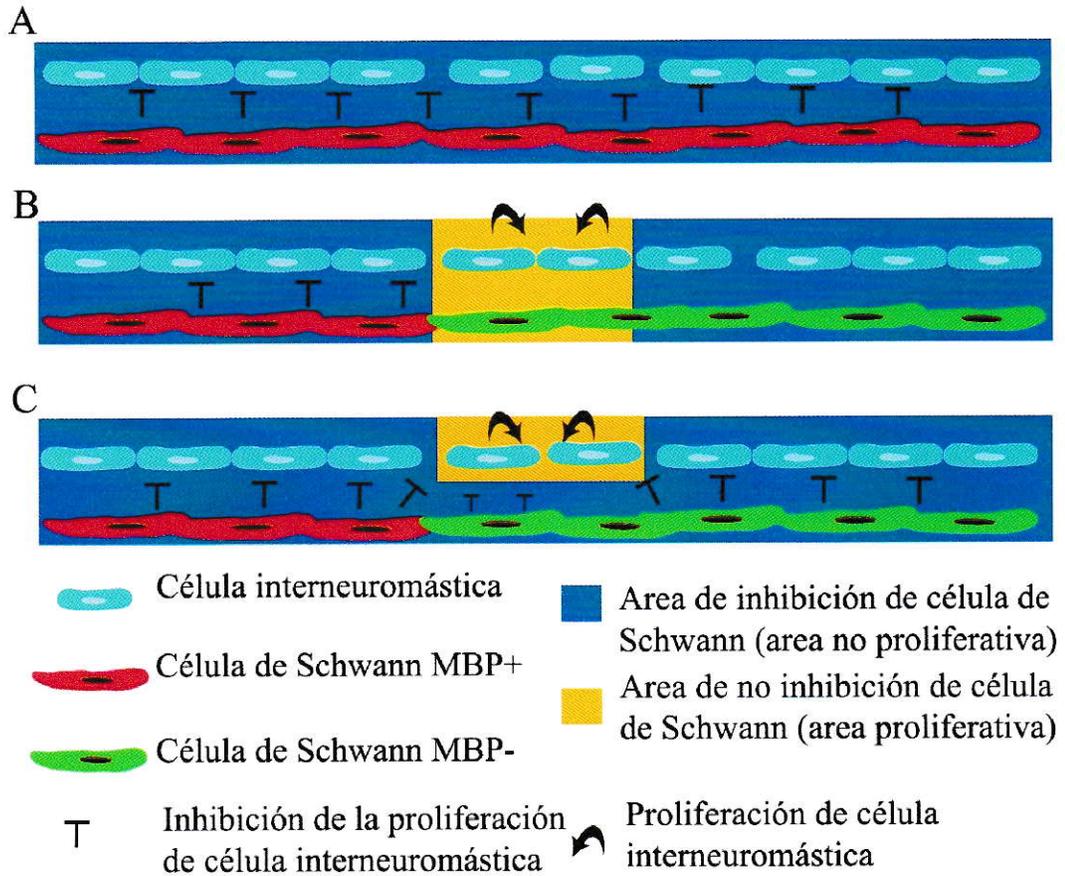


Figura 32 Modelos posibles de inhibición. Representación esquemática de los dos escenarios posibles de inhibición por parte de las células de Schwann sobre la proliferación de las células interneuromásticas (B y C). El recuadro azul en (A, B y C) representa el área de inhibición de la proliferación de las células de Schwann sobre la proliferación de células interneuromásticas. El recuadro naranja en (B y C) representa el área permisiva para la proliferación de las células interneuromásticas. Bajo condiciones normales (sin daño) las células de Schwann son capaces de inhibir la proliferación de las INC en toda la extensión. En B y C se muestran los dos escenarios posibles que explicarían por qué solo existe proliferación en el punto de daño y no desde el daño hacia caudal. Uno de ellos (B) es el cual las células de Schwann MBP negativas son incapaces de inhibir la proliferación de las INC, de esta forma en conjunto el daño generado en el punto de aplicación de la corriente daña y elimina la matriz extracelular que contiene el factor inhibitorio, permitiendo así la proliferación de las INC, solo en el punto de daño y no en otra zona debido al factor presente en la matriz extracelular. El segundo modelo (C) es el cual las

celulas de Schwann MBP negativas aún son capaces de inhibir la proliferación de las INC, pero debido al daño en la matriz extracelular causado por el electrodo, las células de Schwann comienzan a secretar el factor de inhibición en conjunto con la remodelación de la matriz extracelular, de esta forma generando una ventana temporal en la cual pueden proliferar y diferenciarse las INC.

En cuanto a la regulación temporal de la formación de un nuevo neuromasto, realizamos experimentos de regeneración de neuromastos en ausencia de las células de Schwann. Las larvas tratadas con el inhibidor farmacológico de la vía ErbB, no presentaban células de Schwann en la línea lateral y por tanto estaban en proceso de formación de neuromastos supernumerarios. Bajo este planteamiento experimental, ablacionamos el neuromasto L3 y observamos que la regeneración ocurre en un 100% de los casos, situación que contrasta con el 29,2% (48hpd) o 40% (72hpd) bajo la condición control. Este resultado sugiere que la ausencia de células de Schwann en el nervio de la línea lateral posterior, genera un escenario permisivo para la proliferación de las INC que se ve reflejado en los porcentajes de regeneración. Esta observación da cuenta que además de inhibir la proliferación de las INC, las células de Schwann son responsables de que aproximadamente un 40% de los neuromastos ablacionados no regeneren.

6. ¿Efecto local del daño o mecanismos celulares diferentes?

Por un lado, en los modelos de corte de la cola en peces cebra adultos (Dufourcq y col., 2006) y en axolotes (Jones y Corwin, 1993), se observó un incremento en la proliferación en el neuromasto más cercano al sitio de

amputación. Los autores sugieren (no está formalmente demostrado) que las células del manto son las células responsables de proliferar y generar un nuevo primordio migratorio que regenera la línea lateral caudal. Analizamos en primera instancia el efecto sistémico de del daño sobre el número de células que componen los neuromastos vecinos (uno rostral y uno caudal al daño, L2 y L4 respectivamente) y sobre la composición celular de estos (proporción de cada uno de los tipos celulares). Observamos que a diferencia del modelo adulto, no existen cambios en el número de células que componen los neuromastos vecinos al neuromasto afectado en larvas. En cuanto a la composición celular de los neuromastos adyacentes al dañado, no observamos cambios en ningún tipo celular. Luego del daño, observamos sólo migración de INC y no la formación de un nuevo primordio. Para descartar que este sea solo un fenómeno propio de los estadíos larvales, y que la formación de un nuevo primordio sea el mecanismo por el cual se regenera la línea lateral caudal, electroablacionamos un neuromasto de la línea lateral caudal en peces adultos de 6 meses y observamos que existe regeneración de ese neuromasto único en aproximadamente un $16\% \pm 3\%$ de los casos y en ninguno de ellos observamos la formación de un nuevo primordio (Figura Suplementaria 1; n=10, 2 experimentos independientes). Estos resultados dan cuenta, por un lado, que la electroablación es un daño local que no afecta los neuromastos vecinos (Figura 17-20) y que la respuesta al daño por parte de la línea lateral puede ser diferente si existe o no contribución de ambos extremos del daño a la regeneración de la línea lateral. Para dilucidar esta hipótesis sería necesario

eliminar todas las INC desde el punto de daño hacia caudal y evaluar la formación de un nuevo primordio.

7. Diferenciación local de células interneuromásticas resulta en la aparición de todos los tipos celulares del neuromasto.

En este trabajo, además del efecto del microambiente en la regeneración, nos interesó describir la secuencia temporal de aparición de los diferentes tipos celulares del neuromasto que aparecen luego del daño y confirmar que las INCs pueden dar lugar a derivados de todos los linajes propios del neuromasto. Para ello, usamos una batería de marcadores de diferenciación, entre los cuales estaban (1) transgénicos *tg(brn3c:gfp)* (marcador de célula ciliada madura) y *tg(et20:gfp)* (como marcador de célula del manto e interneuromástica); (2) anticuerpos anti-Sox2 (como marcador de células progenitoras basales) y (3) Tinción nuclear TO-PRO-3 (usado para la cuantificación del número de células totales del neuromasto). Mediante el uso de estos marcadores, identificamos que la expresión del factor de transcripción Sox2 es un paso inicial clave para la regeneración. Este gen se expresa en las células progenitoras basales del neuromasto (Cristian Undurraga datos no publicados) (Hernández y col., 2007) y, en nuestros experimentos de daño total del neuromasto, se detecta a las 24hpd en las células acumuladas en la zona de daño y no así en territorios más lejanos. Correlacionamos la expresión de Sox2 en este grupo de células restringido como una evidencia más de la generación de un ambiente permisivo para la proliferación y diferenciación de las células interneuromásticas. Es posible plantear que el gen

sox2 puede ser el blanco del factor inhibitorio secretado por las células de Schwann y que el primer paso en la desinhibición, es la acumulación de Sox2. Sin embargo, las células acumuladas también mantienen la presencia de GFP dirigida por el promotor ET20, propio de las INC quiescentes y de las células del manto. De tal modo, no podemos descartar a las células del manto como células multipotentes, o bien, que sean estas un paso intermedio en el proceso de regeneración. Las hipótesis posibles de expliquen el proceso de diferenciación de los constituyentes del neuromasto regenerado, se esquematizan en la figura 33

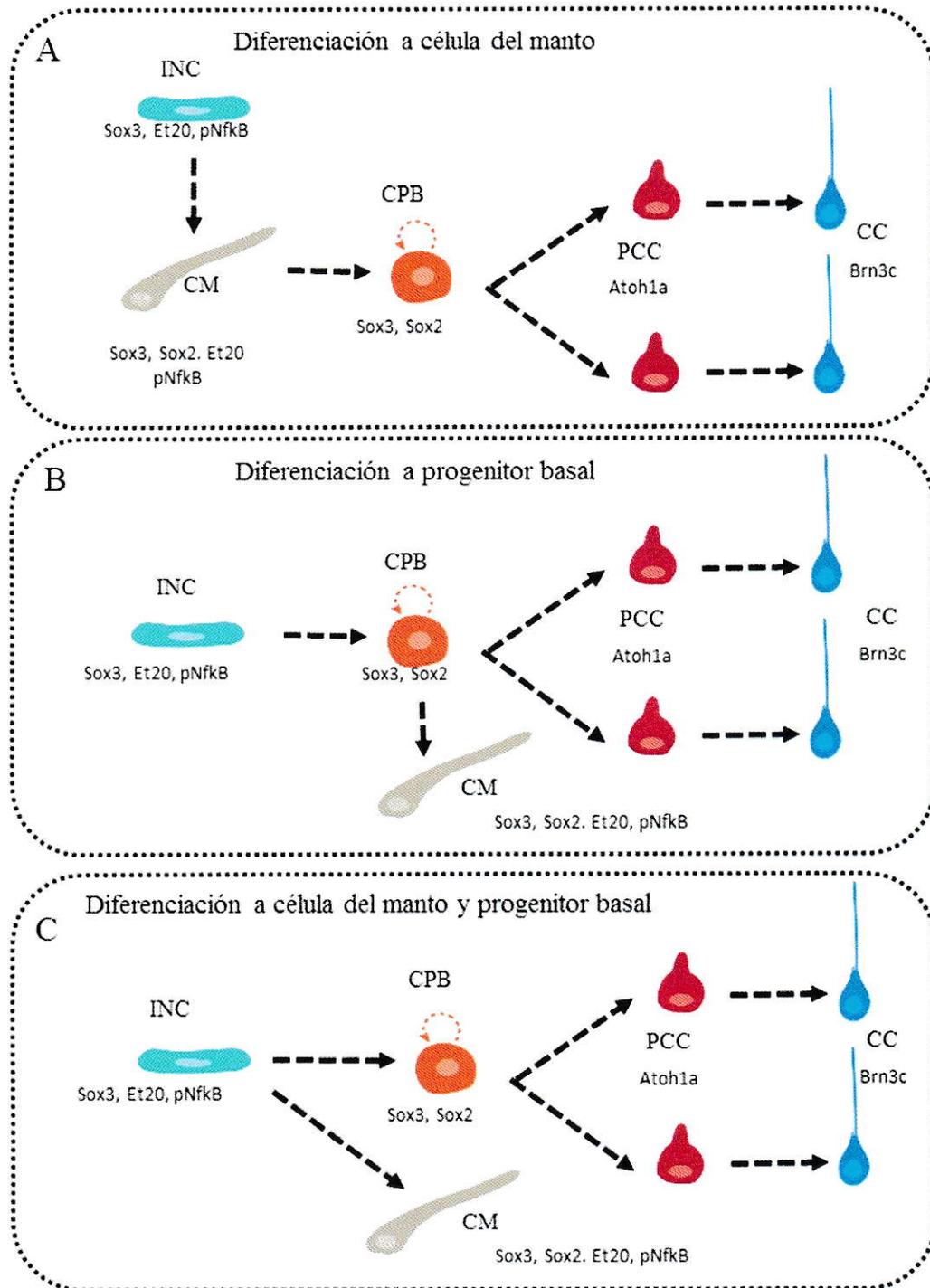


Figura 33. Posibles escenarios de diferenciación que no pudieron ser dilucidados. Representación esquemática de los posibles escenarios de diferenciación que no pudieron ser clarificados con los marcadores disponibles. Debido a la mantención

de la fluorescencia del transgenico ET20:GFP, no fue posible dilucidar si las células interneurómicas perdían el marcador “ET20” y se diferenciaban a célula progenitora basal (CPB) directamente (B) o bien la mantenían el marcador ET20 y se diferenciaban hacia CPB a través de una célula del manto (CM) (A). La tercera opción la diferenciación de las INC hacia ambos linajes CM y CPB por rutas diferentes (C). Célula precursora de célula ciliada (PCC), célula ciliada (CC).

Interesantemente, aunque todas las células derivadas de las INCs expresan Sox2 durante la regeneración, solo una pequeña población de ellas pierde este marcador y comienza un proceso de diferenciación hacia el linaje de célula ciliada. Estas células son solo las células centrales y más superficiales del proto-neuromasto, de manera similar a cómo ocurre durante la regeneración tras la pérdida de todas las células ciliadas. Este fenómeno da cuenta de cómo la auto-organización celular puede especificar pequeños territorios que son favorables para la diferenciación celular y permiten la correcta organización final de la estructura.

8. Adquisición de Sox2 como evento clave en la regeneración de neuromastos.

Interesantemente, uno de los primeros eventos que reportamos durante la regeneración del neuromasto posterior al daño, es la expresión de Sox2, un miembro de la familia de factores de transcripción “*SRY-Related HMG-Box*”. Estos factores de transcripción han sido descritos con varias funciones en el desarrollo de células ciliadas en diferentes modelos (Dabdoub y col., 2008; Kiernan y col., 2005; Munnamalai y Fekete, 2013; Neves y col., 2013) . Se ha

mostrado que la sobreexpresión de *sox2*, induce formación de parches sensoriales ectópicos en epitelios sensoriales de ratón y pollo (Pan y col., 2013a) . Además se ha reportado que activa directamente la expresión de *atoh1a*, gen clave para la especificación y diferenciación a célula ciliada. Dicha activación es transitoria, ya que la expresión de *atoh1a* no es mantenida con sobreexpresión de *Sox2* prolongada (Ahmed y col., 2012; Neves y col., 2012). Además, la expresión de *Sox2* se restringe eventualmente a las células de soporte como consecuencia de la expresión de *atoh1a* en las células ciliadas (ambos genes tienen funciones antagónicas en los procesos de proliferación y diferenciación) (Dabdoub y col., 2008) . De esta forma la adquisición de *sox2* y su posterior restricción parece ser un evento clave en la formación de parches sensoriales con capacidad de formar células ciliadas y que la pérdida de *sox2* en la región central apical del neuromasto en regeneración, cumpliría un rol fundamental en la correcta organogénesis del sistema. Dado que la expresión de *Sox2* es detectada mediante inmunohistoquímica, no podemos hacer un seguimiento a posteriori del destino de las células analizadas. Es decir, no podemos distinguir entre una acumulación de INC que terminará en un neuromasto regenerado o una "reparación" que formará sólo una línea continua de INC. Idealmente, trabajos futuros deberían abordar esta pregunta y generar además una correlación con la presencia o no del factor inhibitorio presuntivo que secretan las células de Schwann como elemento predictivo de la regeneración. Nos interesa, conocer además si este sistema de control de la proliferación y diferenciación celular por el microambiente, se replica en otros sistemas tisulares y más allá del pez cebra, en otros vertebrados.

VI. Bibliografía

- Ahmed, M., Wong, E. Y., Sun, J., Xu, J., Wang, F. and Xu, P.-X. X.** (2012). Eya1-Six1 interaction is sufficient to induce hair cell fate in the cochlea by activating Atoh1 expression in cooperation with Sox2. *Dev. Cell* **22**, 377–90.
- Bonfanti, L.** (2011). From hydra regeneration to human brain structural plasticity: a long trip through narrowing roads. *ScientificWorldJournal* **11**, 1270–99.
- Ceci, M. L., Mardones-Krsulovic, C., Sánchez, M., Valdivia, L. E. and Allende, M. L.** (2014). Axon-Schwann cell interactions during peripheral nerve regeneration in zebrafish larvae. *Neural Dev* **9**, 22.
- Coombs S, Görner P, Münz H.** (1989). The mechanosensory lateral line: neurobiology and evolution. New York: Springer.
- Curado, S., Stainier, D. Y. and Anderson, R. M.** (2008). Nitroreductase-mediated cell/tissue ablation in zebrafish: a spatially and temporally controlled ablation method with applications in developmental and regeneration studies. *Nat Protoc* **3**, 948–54.
- Dabdoub, A., Puligilla, C., Jones, J. M., Fritsch, B., Cheah, K. S., Pevny, L. H. and Kelley, M. W.** (2008). Sox2 signaling in prosensory domain specification and subsequent hair cell differentiation in the developing cochlea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 18396–401.
- Dufourcq, P., Roussigné, M., Blader, P., Rosa, F., Peyrieras, N. and Vríz, S.** (2006). Mechano-sensory organ regeneration in adults: the zebrafish lateral line as a model. *Mol. Cell. Neurosci.* **33**, 180–7.
- Gamba, L., Cubedo, N., Ghysen, A., Lutfalla, G. and Dambly-Chaudière, C.** (2010). Estrogen receptor ESR1 controls cell migration by repressing chemokine receptor CXCR4 in the zebrafish posterior lateral line system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 6358–63.
- Garratt, A. N., Britsch, S. and Birchmeier, C.** (2000). Neuregulin, a factor with many functions in the life of a schwann cell. *Bioessays* **22**, 987–96.
- Gilmour, D. T., Maischein, H.-M. M. and Nüsslein-Volhard, C.** (2002). Migration and function of a glial subtype in the vertebrate peripheral nervous system. *Neuron* **34**, 577–88.
- Gilmour, D., Knaut, H., Maischein, H.-M. M. and Nüsslein-Volhard, C.** (2004). Towing of sensory axons by their migrating target cells in vivo. *Nat. Neurosci.* **7**, 491–2.
- Gompel, N., Cubedo, N., Thisse, C., Thisse, B., Dambly-Chaudière, C. and Ghysen, A.** (2001). Pattern formation in the lateral line of zebrafish. *Mech. Dev.* **105**, 69–77.
- Grant, K. A., Raible, D. W. and Piotrowski, T.** (2005). Regulation of latent sensory hair cell precursors by glia in the zebrafish lateral line. *Neuron* **45**, 69–80.
- Haas, P. and Gilmour, D.** (2006). Chemokine signaling mediates self-organizing tissue migration in the zebrafish lateral line. *Dev. Cell* **10**, 673–80.

- Harris, J. A., Cheng, A. G., Cunningham, L. L., MacDonald, G., Raible, D. W. and Rubel, E. W.** (2003). Neomycin-induced hair cell death and rapid regeneration in the lateral line of zebrafish (*Danio rerio*). *J. Assoc. Res. Otolaryngol.* **4**, 219–34.
- Hernandez, P. P., Undurraga, C., Gallardo, V. E., Mackenzie, N., Allende, M. L. and Reyes, A. E.** (2011). Sublethal concentrations of waterborne copper induce cellular stress and cell death in zebrafish embryos and larvae. *Biol. Res.* **44**, 7–15.
- Hernández, P. P., Moreno, V., Olivari, F. A. and Allende, M. L.** (2006). Sublethal concentrations of waterborne copper are toxic to lateral line neuromasts in zebrafish (*Danio rerio*). *Hear. Res.* **213**, 1–10.
- Hernández, P. P., Olivari, F. A., Sarrazin, A. F., Sandoval, P. C. and Allende, M. L.** (2007). Regeneration in zebrafish lateral line neuromasts: expression of the neural progenitor cell marker *sox2* and proliferation-dependent and-independent mechanisms of hair cell renewal. *Dev Neurobiol* **67**, 637–54.
- Ho, R. K. and Kane, D. A.** (1990). Cell-autonomous action of zebrafish *spt-1* mutation in specific mesodermal precursors. *Nature* **348**, 728–30.
- Jones, J. E. and Corwin, J. T.** (1993). Replacement of lateral line sensory organs during tail regeneration in salamanders: identification of progenitor cells and analysis of leukocyte activity. *J. Neurosci.* **13**, 1022–34.
- Kiernan, A. E., Pelling, A. L., Leung, K. K., Tang, A. S., Bell, D. M., Tease, C., Lovell-Badge, R., Steel, K. P. and Cheah, K. S.** (2005). *Sox2* is required for sensory organ development in the mammalian inner ear. *Nature* **434**, 1031–5.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. and Schilling, T. F.** (1995). Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* **203**, 253–310.
- Ledent, V.** (2002). Postembryonic development of the posterior lateral line in zebrafish. *Development* **129**, 597–604.
- Liang, G.-H. H., Järlebark, L., Ulfendahl, M. and Moore, E. J.** (2003). Mercury (Hg^{2+}) suppression of potassium currents of outer hair cells. *Neurotoxicol Teratol* **25**, 349–59.
- Lush, M. E. and Piotrowski, T.** (2014). ErbB expressing Schwann cells control lateral line progenitor cells via non-cell-autonomous regulation of Wnt/ β -catenin. *Elife* **3**, e01832.
- Lyons, D. A., Pogoda, H.-M. M., Voas, M. G., Woods, I. G., Diamond, B., Nix, R., Arana, N., Jacobs, J. and Talbot, W. S.** (2005). *erbb3* and *erbb2* are essential for schwann cell migration and myelination in zebrafish. *Curr. Biol.* **15**, 513–24.
- López-Schier, H. and Hudspeth, A. J.** (2005). Supernumerary neuromasts in the posterior lateral line of zebrafish lacking peripheral glia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 1496–501.
- López-Schier, H., Starr, C. J., Kappler, J. A., Kollmar, R. and Hudspeth, A. J.** (2004). Directional cell migration establishes the axes of planar polarity in the posterior lateral-line organ of the zebrafish. *Dev. Cell* **7**, 401–12.
- Ma, E. Y. and Raible, D. W.** (2009). Signaling pathways regulating zebrafish lateral line development. *Curr. Biol.* **19**, R381–6.

- Metcalf, W. K., Kimmel, C. B. and Schabtach, E.** (1985). Anatomy of the posterior lateral line system in young larvae of the zebrafish. *J. Comp. Neurol.* **233**, 377–89.
- Millimaki, B., Sweet, E. and Riley, B.** (2010). Sox2 is required for maintenance and regeneration, but not initial development, of hair cells in the zebrafish inner ear. *Developmental Biology*.
- Moya-Díaz, J., Peña, O. A., Sánchez, M., Ureta, D. A., Reynaert, N. G., Anguita-Salinas, C., Marín, G. and Allende, M. L.** (2014). Electroablation: a method for neurectomy and localized tissue injury. *BMC Dev. Biol.* **14**, 7.
- Munnamalai, V. and Fekete, D. M.** (2013). Wnt signaling during cochlear development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **24**, 480–9.
- Neves, J., Parada, C., Chamizo, M. and Giráldez, F.** (2011). Jagged 1 regulates the restriction of Sox2 expression in the developing chicken inner ear: a mechanism for sensory organ specification. *Development* **138**, 735–44.
- Neves, J., Uchikawa, M., Bigas, A. and Giraldez, F.** (2012). The prosensory function of Sox2 in the chicken inner ear relies on the direct regulation of Atoh1. *PLoS ONE* **7**, e30871.
- Neves, J., Vachkov, I. and Giraldez, F.** (2013). Sox2 regulation of hair cell development: incoherence makes sense. *Hear. Res.* **297**, 20–9.
- Newbern, J. and Birchmeier, C.** (2010). Nrg1/ErbB signaling networks in Schwann cell development and myelination. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**, 922–8.
- Núñez, V. A., Sarrazin, A. F., Cubedo, N., Allende, M. L., Dambly-Chaudière, C. and Ghysen, A.** (2009). Postembryonic development of the posterior lateral line in the zebrafish. *Evol. Dev.* **11**, 391–404.
- Obholzer, N., Wolfson, S., Trapani, J. G., Mo, W., Nechiporuk, A., Busch-Nentwich, E., Seiler, C., Sidi, S., Söllner, C., Duncan, R. N., y col.** (2008). Vesicular glutamate transporter 3 is required for synaptic transmission in zebrafish hair cells. *J. Neurosci.* **28**, 2110–8.
- Olivari, F. A., Hernández, P. P. and Allende, M. L.** (2008). Acute copper exposure induces oxidative stress and cell death in lateral line hair cells of zebrafish larvae. *Brain Res.* **1244**, 1–12.
- O'Brien, G. S., Rieger, S., Martin, S. M., Cavanaugh, A. M., Portera-Cailliau, C. and Sagasti, A.** (2009). Two-photon axotomy and time-lapse confocal imaging in live zebrafish embryos. *J Vis Exp*.
- Pan, Y. A., Freundlich, T., Weissman, T. A., Schoppik, D., Wang, X. C., Zimmerman, S., Ciruna, B., Sanes, J. R., Lichtman, J. W. and Schier, A. F.** (2013a). Zebrow: multispectral cell labeling for cell tracing and lineage analysis in zebrafish. *Development* **140**, 2835–46.
- Pan, W., Jin, Y., Chen, J., Rottier, R. J., Steel, K. P. and Kiernan, A. E.** (2013b). Ectopic expression of activated notch or SOX2 reveals similar and unique roles in the development of the sensory cell progenitors in the mammalian inner ear. *J. Neurosci.* **33**, 16146–57.
- Parinov, S., Kondrichin, I., Korzh, V. and Emelyanov, A.** (2004). Tol2 transposon-mediated enhancer trap to identify developmentally regulated zebrafish genes in vivo. *Dev. Dyn.* **231**, 449–59.

- Perlin, J. R., Lush, M. E., Stephens, W. Z., Piotrowski, T. and Talbot, W. S.** (2011). Neuronal Neuregulin 1 type III directs Schwann cell migration. *Development* **138**, 4639–48.
- Reddien, P. W. and Sánchez Alvarado, A.** (2004). Fundamentals of planarian regeneration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 725–57.
- Rieger, S. and Sagasti, A.** (2011). Hydrogen peroxide promotes injury-induced peripheral sensory axon regeneration in the zebrafish skin. *PLoS Biol.* **9**, e1000621.
- Rojas-Muñoz, A., Rajadhyksha, S., Gilmour, D., Bebbler, F. van, Antos, C., Rodríguez Esteban, C., Nüsslein-Volhard, C. and Izpisua Belmonte, J. C.** (2009). ErbB2 and ErbB3 regulate amputation-induced proliferation and migration during vertebrate regeneration. *Dev. Biol.* **327**, 177–90.
- Rushworth, L. K., Kidger, A. M., Delavaine, L., Stewart, G., Schelven, S. van, Davidson, J., Bryant, C. J., Caddy, E., East, P., Caunt, C. J., y col.** (2014). Dual-specificity phosphatase 5 regulates nuclear ERK activity and suppresses skin cancer by inhibiting mutant Harvey-Ras (HRasQ61L)-driven SerpinB2 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
- Sapède, D., Gompel, N., Dambly-Chaudière, C. and Ghysen, A.** (2002). Cell migration in the postembryonic development of the fish lateral line. *Development* **129**, 605–15.
- Sarrazin, A. F., Nuñez, V. A., Sapède, D., Tassin, V., Dambly-Chaudière, C. and Ghysen, A.** (2010). Origin and early development of the posterior lateral line system of zebrafish. *J. Neurosci.* **30**, 8234–44.
- Schuster, K., Dambly-Chaudière, C. and Ghysen, A.** (2010). Glial cell line-derived neurotrophic factor defines the path of developing and regenerating axons in the lateral line system of zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 19531–6.
- Tu, S. and Johnson, S.** (2011). Fate Restriction in the Growing and Regenerating Zebrafish Fin. *Dev. Cell* **20**, 725–32.
- Valdivia, L. E., Young, R. M., Hawkins, T. A., Stickney, H. L., Cavodeassi, F., Schwarz, Q., Pullin, L. M., Villegas, R., Moro, E., Argenton, F., y col.** (2011). Lef1-dependent Wnt/ β -catenin signalling drives the proliferative engine that maintains tissue homeostasis during lateral line development. *Development* **138**, 3931–41.
- Villegas, R., Martin, S. M., O'Donnell, K. C., Carrillo, S. A., Sagasti, A. and Allende, M. L.** (2012). Dynamics of degeneration and regeneration in developing zebrafish peripheral axons reveals a requirement for extrinsic cell types. *Neural Dev* **7**, 19.
- Wada, H., Dambly-Chaudière, C., Kawakami, K. and Ghysen, A.** (2013). Innervation is required for sense organ development in the lateral line system of adult zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**, 5659–64.
- Xiao, T., Roeser, T., Staub, W. and Baier, H.** (2005). A GFP-based genetic screen reveals mutations that disrupt the architecture of the zebrafish retinotectal projection. *Development* **132**, 2955–67.
- Westerfield, M.** (2000). *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of*

Zebrafish (*Danio rerio*) (Eugene, OR: University of Oregon Press).

—

VII. Anexos

Caracterización del mutante G19

Durante un “screening” de mutaciones inducidas por ENU en el laboratorio de Stephen Wilson en UCL, aislamos un mutante (G19) con defectos en el “*patterning*” de la línea lateral. El fenotipo mutante se caracteriza por presentar un número reducido de neuromastos (Figura 34 y 41D), los cuales están distribuidos a intervalos irregulares comparados con los peces silvestres (Figura 35). La cuantificación del número total de células que componen cada neuromasto a 48 y 72hpf (Figura 36A y B respectivamente) muestra un número decreciente de células entre los Nms L1 y L4, condición que no ocurre en los peces silvestres, donde el número de células depositadas es constante. Esta disminución del número de células también se refleja en el número de células expresan el gen *atoh1a*⁺ (precursores de células ciliadas) (Figura 37A y B). Mientras el número de células depositadas en cada neuromasto es menor, la razón de células *atoh1a*⁺/células totales en cada neuromasto permanece constante (Figura 38A y B). Este resultado sugiere que el proceso de inhibición lateral que involucra la restricción de los territorios de expresión de *atoh1a*⁺ durante la morfogénesis de la línea lateral, no están afectados. El número de células que componen cada neuromasto (Figura 36C y D) y el número de células expresan el gen *atoh1a*⁺ (Figura 37C y D), muestran un incremento entre 48hpf y 72hpf en la condición sibling y mutante. Este resultado sugiere que no existe problema de proliferación en los neuromastos depositados. Por otra parte, la razón de células expresan el gen *atoh1a*⁺ del total

de células en cada neuromasto permanece constante a pesar del aumento de células en cada neuromasto entre 48hpf y 72hpf (Figura 38A y B) sugiriendo que no existe alteración en la diferenciación en el neuromasto en la condición mutante.

Un análisis de muerte celular, utilizando la técnica de TUNEL a las 36hpf (Figura 39 y 40) evidencia marca en el CNS, tubo neural y en el primordio de la línea lateral (Figura 40).

La inducción de muerte celular en el primordio de la línea lateral, mediante la inyección del morfolino de TCF7, no recapitula el fenotipo decreciente de células. Como se observa en la Figura 41, los peces morfantes para TCF7, presentan un número reducido de neuromastos respecto a la condición silvestre, la cual a su vez, no es estadísticamente diferente de la condición mutantes (Figura 41D). Por otro lado, los Nms se encuentran distribuidos de manera diferente a la condición mutante (Figura 41E y F). Estos además presentan un menor, pero constante, número total células de L1 a L4, que los peces controles (Figura 41A). Caso similar ocurre con el número de células que expresan el gen *atoh1a*⁺ (Figura 41B). Al igual que la condición mutante, la proporción de células *atoh1a*⁺ del total de células que componen cada neuromasto, permanece constante (Figura 41C).

Mediante análisis de segregantes; nosotros hemos asociado a esta mutación al cromosoma 1 y acotado está a un intervalo de 1,645 megabases.

Esta línea mutante sobrevive solo hasta el 4 o 5 día con formación de edemas lo que hace imposible su uso para evaluar regeneración de neuromastos.

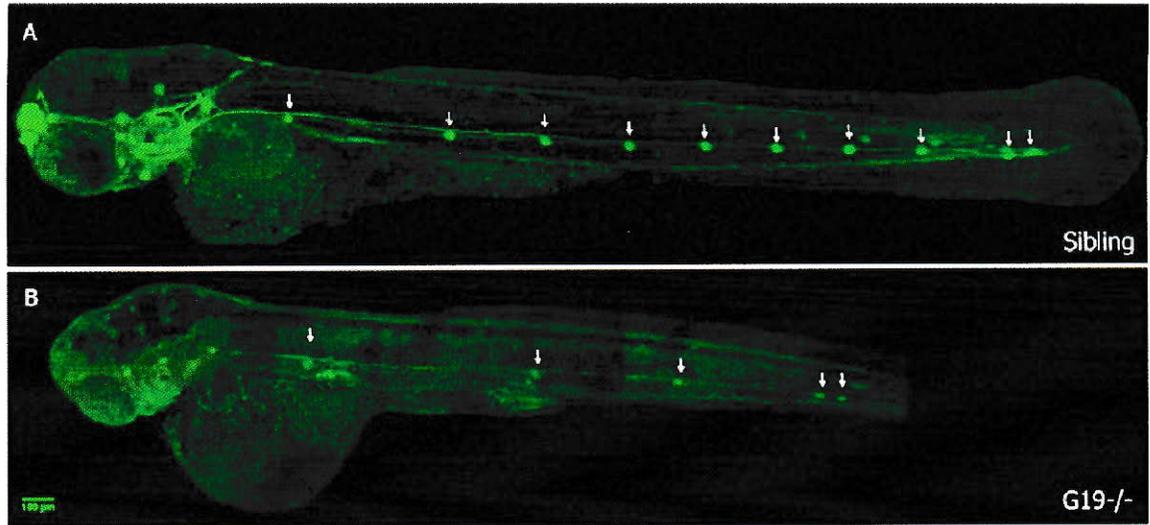


Figura 34: Mutante G19 presenta menos neuromastos en la línea lateral posterior. Caracterización del mutante G19 (A-B) vista lateral de G19 “sibling” (A), Mutante G19 (B) 3dpf Tg(-8.0cldnb:lynEGFP). Flechas indican posición de los neuromastos.

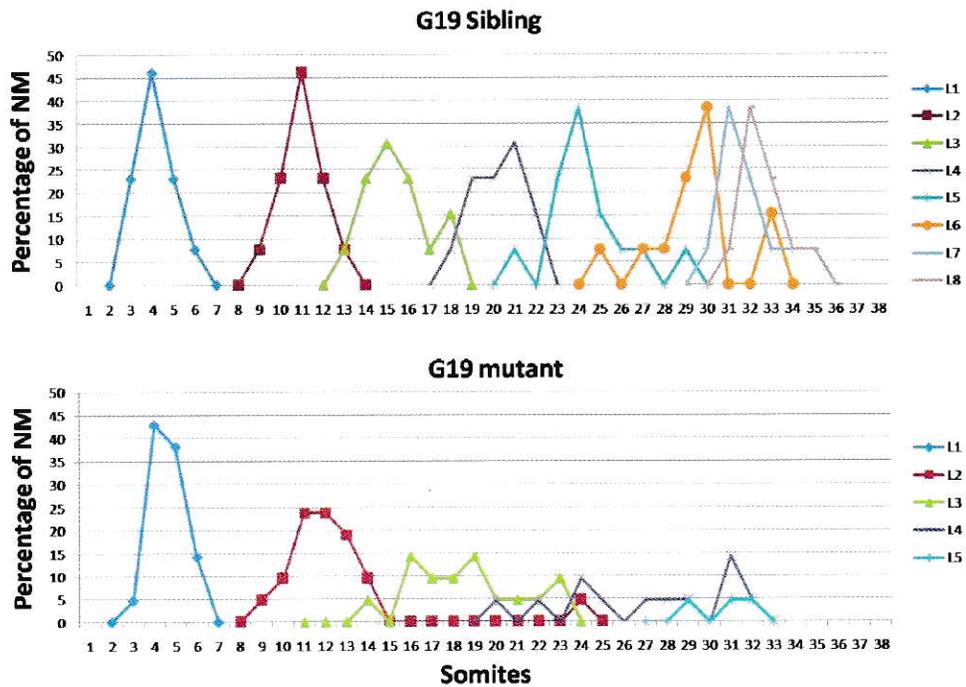


Figura 35: La posición de los neuromastos está afectada en el mutante G19. Histogramas mostrando el porcentaje de neuromastos /posición (somito) de los neuromasto en “sibling”, mutante G19.

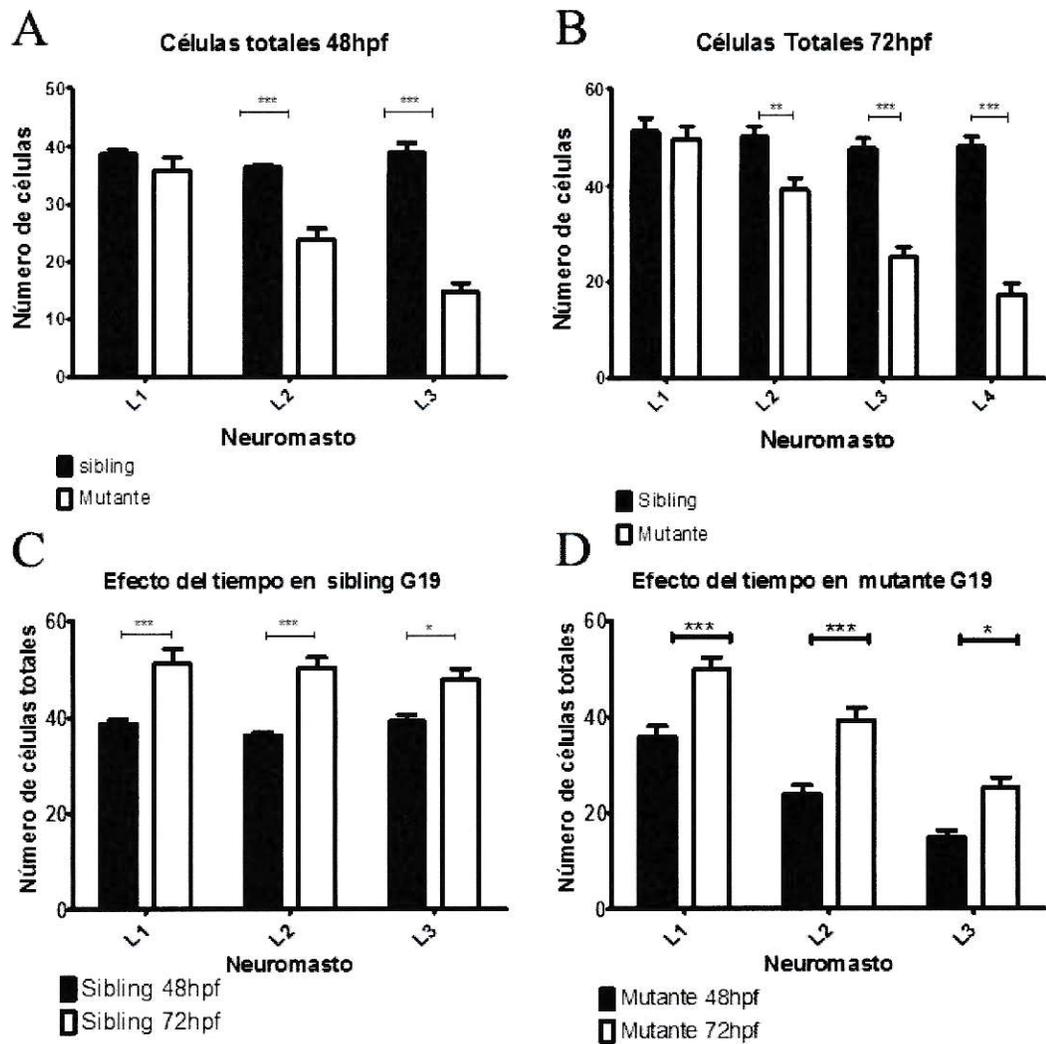


Figura 36: El número de células que componen cada neuromasto está afectado en el mutante G19. (A-B) cuantificación del número total de células de cada neuromasto en “sibling” G19 (barras negras) y mutante G19 (barras blancas) a 48hpf (A) y 72hpf (B). El número total de células fue cuantificado posterior a una tinción nuclear DAPI. (C-D) Efecto del tiempo en el número total de células de cada neuromasto “sibling” G19 (C) mutante G19 (D), a 48hpf (barras negras) y 72hpf (barras blancas).

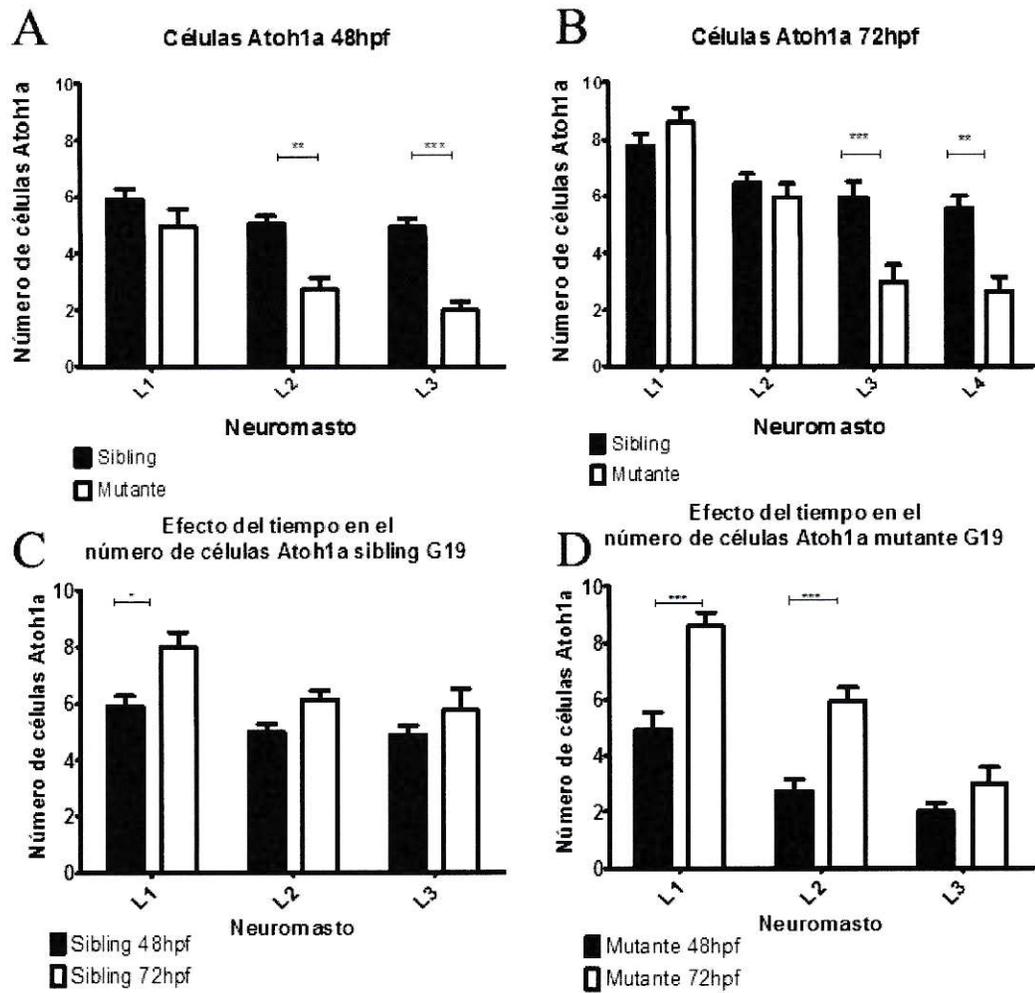


Figura 37: El número de células *atoh1a* positivas se ve afectado en el mutante G19. (A-B) Cuantificación de células *atoh1a*⁺ positivas en cada neuromasto “sibling” G19 (barras negras) y mutante G19 (barras blancas) a 48hpf (A) y 72hpf (B). Las células *atoh1a*⁺ fueron cuantificadas posterior a una tinción nuclear DAPI. (C-D) efecto del tiempo en el número de células *atoh1a*⁺ positivas en cada neuromasto, “sibling” G19 (C) y mutante G19 (D), a 48hpf (barras negras) y 72hpf (barras blancas).

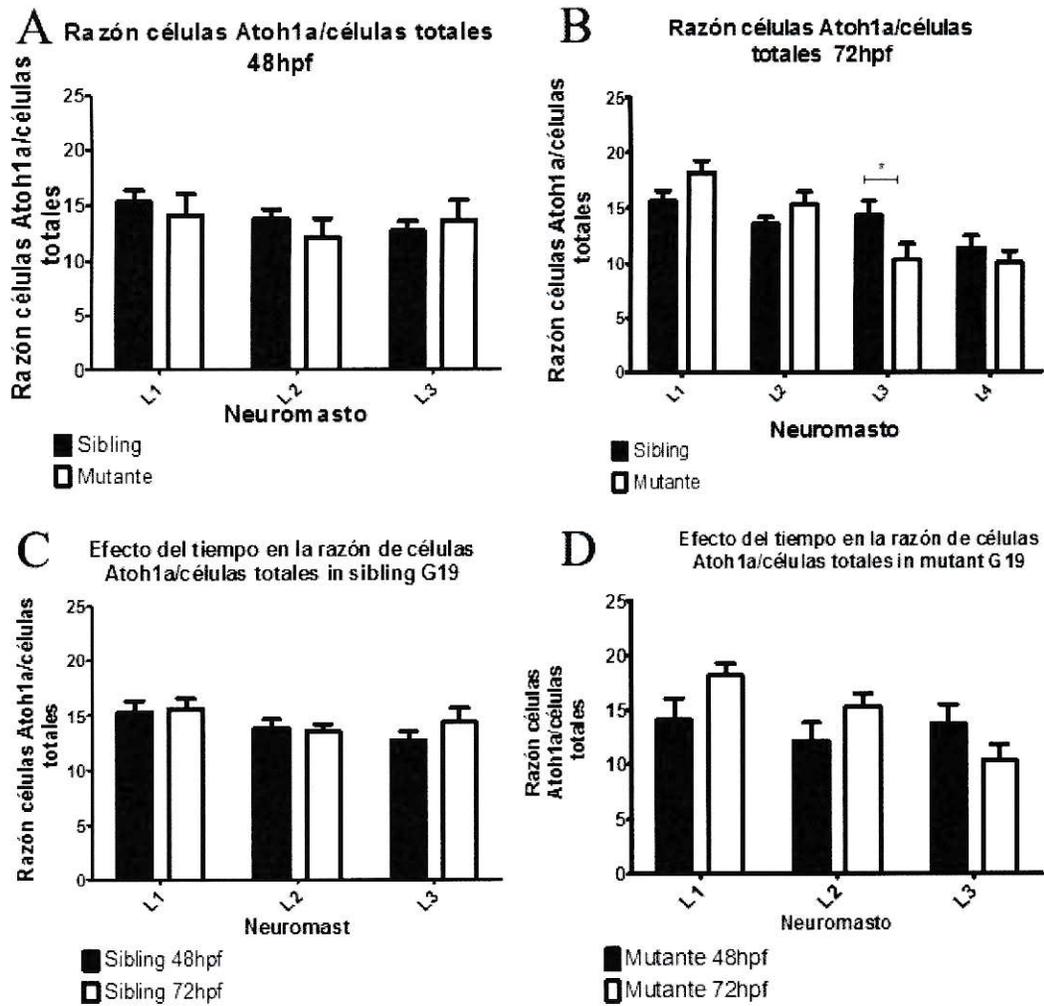


Figura 38: La composición celular del neuromasto no se ve afectada en el mutante G19. (A-B) porcentaje de células *atoh1a*⁺ del total de células que componen cada neuromasto en “sibling” G19 (barras negras) y mutante G19 (barras blancas) a 48hpf (A) y 72hpf (B). (C-D) Efecto del tiempo sobre el porcentaje de células *atoh1a*⁺del total de células que componen cada neuromasto en “sibling” G19 (barras negras) y mutante G19 (barras blancas) sibling G19 (C) G19 mutante (D), a 48hpf (barras negras) and 72hpf (barras blancas).

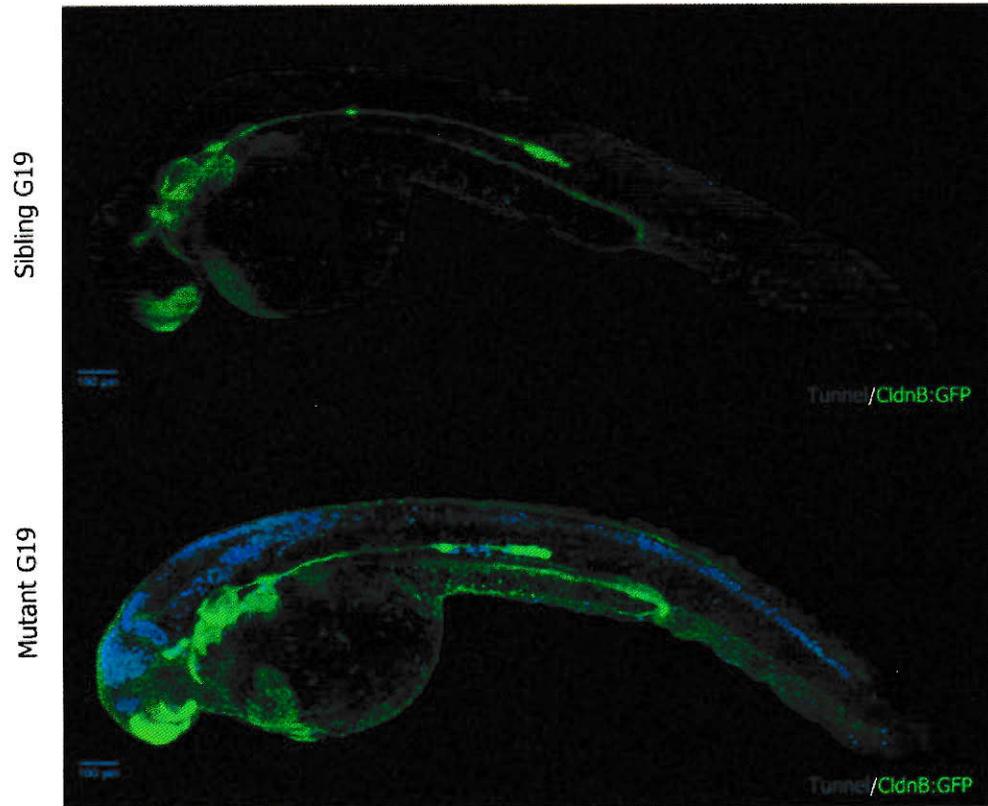


Figura 39: Mutante G19 presenta una muerte celular exacerbada. Ensayo de TUNEL muestra la presencia de apoptosis en el mutante G19 (abajo) y sibling (arriba) a 36hpf. La marca de TUNEL (pseudocoloreado azul) y en verde Tg(-8.0cldnb:lynEGFP), muestra una evidente apoptosis en el cerebro y tubo neural, además de muerte celular en el primordio de la línea lateral.

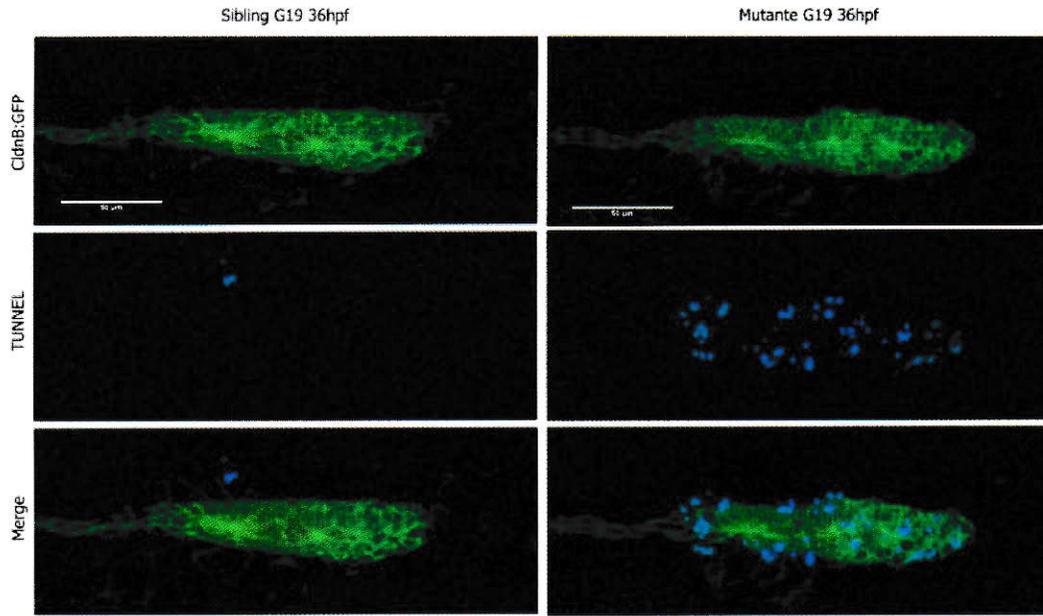


Figura 40: Ensayo de TUNEL en el primordio de la línea lateral posterior. TUNEL (pseudocoloreado azul) y en verde Tg(-8.0cldnb:lynEGFP), muestra una evidente apoptosis en la condición mutante a 36hpf en el primordio de la línea lateral posterior.

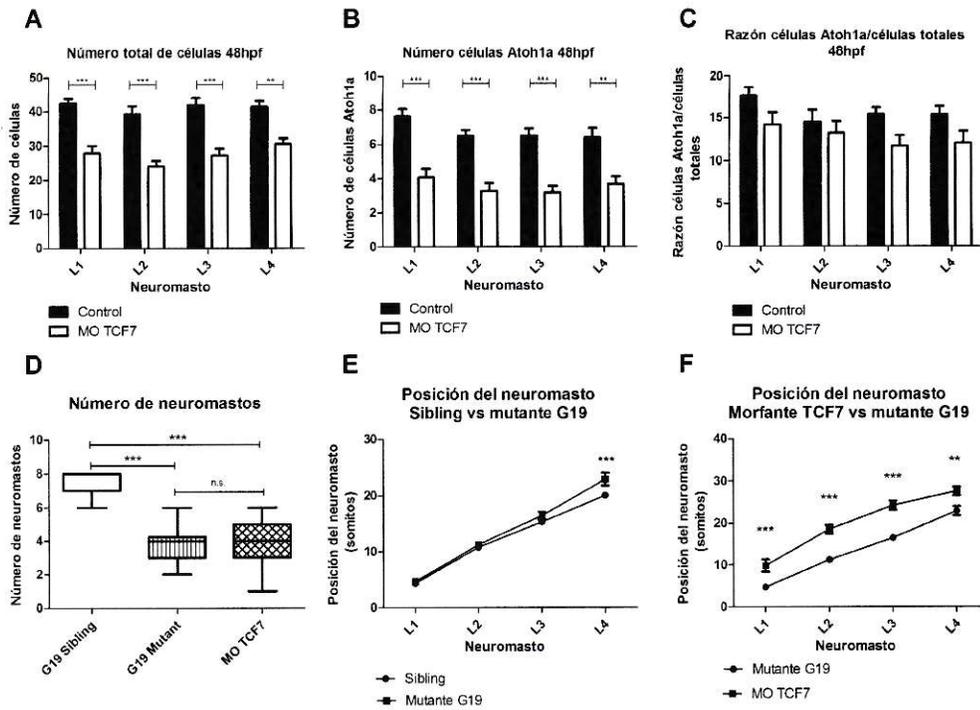


Figura 41: La inducción de muerte en el primordio por toxicidad de morfolino, no recapitula el fenotipo mutante. (A) Cuantificación del número de células totales en los neuromastos L1 a L4 en controles (barras negras) y morfantes de TCF7 (barras blancas) a 48hpf. (B) Cuantificación del número de células *atoh1a*⁺ en los neuromastos L1 a L4 en controles (barras negras) y morfantes de TCF7 (barras blancas). (C) Cálculo del porcentaje de células *atoh1a*⁺ del total de células que componen cada neuromasto en controles (barras negras) y morfantes de TCF7 (barras blancas) a 48hpf. (D) Número de neuromastos depositados a 72hpf en peces mutantes G19; “sibling G19”; morfantes de TCF7. (E-F) Patrón de depósito de neuromastos a 72hpf en peces (E) mutantes G19 y “sibling” G19; y en peces (F) mutantes G19 y morfantes de TCF7.

Imágenes suplementarias

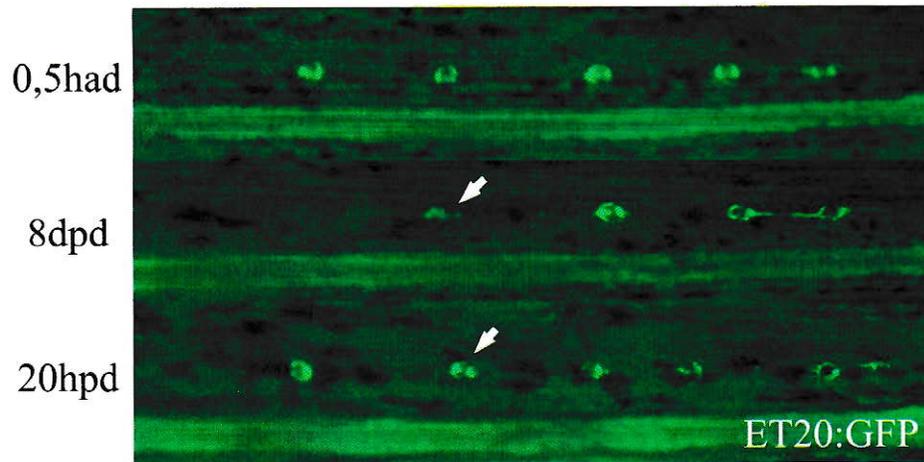


Figura 42 Regeneración de la Línea lateral caudal en peces adultos posterior a la electroablación. Cola de pez adulto electroablacionado en 2 neuromastos, donde se observa la regeneración de uno de ellos posterior a 20dpd (Flecha blanca).